

BASIDIOSPOROGÊNESE EM
Agaricus brasiliensis

KARINA MARJORIE SILVA HERRERA

2009

KARINA MARJORIE SILVA HERRERA

BASIDIOSPOROGÊNESE EM
Agaricus brasiliensis

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Biologia de Fungos Filamentosos, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Eduardo Alves

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Herrera, Karina Marjorie Silva.

Basidiosporogênese em *Agaricus brasiliensis* / Karina Marjorie
Silva Herrera. – Lavras : UFLA, 2009.

50 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. Ultraestrutura. 2. Basídios. 3. Basidiósporos. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.222

KARINA MARJORIE SILVA HERRERA

BASIDIOSPOROGÊNESE EM
Agaricus brasiliensis

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Biologia de Fungos Filamentosos, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 11 de dezembro de 2009

Lisete Chamma Davide UFLA

Cláudia Regina Gontijo Labory UFLA

Maurício Dutra Costa UFV

Prof. Eduardo Alves
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Para Luís e Júlia...

Infinitamente...

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela bolsa concedida.

À UFLA, pela minha formação profissional como bióloga e como mestre em Microbiologia Agrícola.

Ao orientador Eduardo Alves, pela oportunidade e confiança, por transferir a mim parcela do grande conhecimento que possui na área de microscopia eletrônica.

Ao coorientador Eustáquio Souza Dias, por ter me inserido no fascinante mundo dos cogumelos e assumido a função de “pai/orientador” desde a iniciação científica.

Aos professores do setor de Microbiologia: Patrícia Gomes Cardoso, Romildo da Silva e Rosane Freitas Schwan, pelo importante papel que desempenham como educadores.

Ao Paulinho, técnico do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais do DBI/UFLA.

A Ivani e Cidinha, responsáveis pelos laboratórios de Microbiologia do DBI/UFLA.

À Eloísa, técnica do laboratório de Microscopia Eletrônica do DFP/UFLA.

Ao colega Emerson, por ter cedido os cogumelos necessários para a realização deste trabalho.

A Cláudia Labory e família, pelo apoio e generosidade.

Aos colegas de turma do mestrado: Cláudia, Fabiana, Jessé, Luana, Luciana, Mara Elisa, Mariana, Maryeimy, Michelle, Paula e Tiago.

Aos colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica: Douglas, Fabiano, Gilvaine, Glauco, Julián, Luciane e Renato.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Aspectos taxonômicos.....	3
2.2 Consumo de cogumelos.....	3
2.3 Propriedades nutricionais e medicinais.....	4
2.4 Características vegetativas.....	5
2.5 Reprodução e ciclo de vida.....	6
2.6 Caracterização citológica por microscopia eletrônica.....	7
2.7 Variação do número de basidiósporos.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Material Biológico.....	10
3.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	10
3.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	12
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 Ultraestrutura das lamelas.....	15
4.2 Ultraestrutura dos basidiósporos.....	18
4.3 Estruturas de basídios.....	21

4.4 Variação do número de basidiósporos.....	26
5 CONCLUSÕES.....	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXOS.....	44

RESUMO

HERRERA, Karina Marjorie Silva. **Basidiosporogênese em *Agaricus brasiliensis***. 2009. 50 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

O cogumelo *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. é um fungo nativo do Brasil que apresenta grande perspectiva de utilização e consumo devido às suas propriedades nutricionais e medicinais, entretanto, estudos sobre a biologia básica da espécie são escassos. Este trabalho teve por objetivo estudar o processo de basidiosporogênese e a variação do número de basidiósporos em diferentes linhagens de *A. brasiliensis* durante o seu desenvolvimento. Para microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram utilizadas lamelas e basidiósporos da linhagem CS1 e, para microscopia eletrônica de varredura (MEV) lamelas das linhagens CS1, CS2, CS7, CS9 e CS10. Para MET os basidiósporos foram submetidos aos tratamentos de: 1) simples fixação, 2) vortexação com esferas de vidro e 3) hidrólise com HCl, para permeabilização da parede celular. As demais etapas de preparação das amostras para MET e MEV foram realizadas segundo protocolo padrão. O processo de basidiosporogênese pôde ser observado por meio da visualização de estruturas internas e externas em basídios e basidiósporos presentes na superfície das lamelas. Em MET foram observados núcleos, mitocôndrias, vacúolos e o septo doliporo nos basídios e o tratamento de hidrólise permitiu a observação de três camadas formadoras da espessa parede dos basidiósporos. Em MEV observou-se lamelas com basídios e basidiósporos em diferentes estágios, demonstrando que o desenvolvimento dessas estruturas ocorre de maneira assíncrona. Todas as linhagens exibiram hifas de conexão promovendo a ligação de basídios contíguos. Na CS2, os basidiósporos mostraram-se, com grande frequência, envolvidos por uma matriz extracelular, diferindo das demais linhagens que apresentam os basidiósporos livres. A espécie estudada possui frequência predominante de basídios tetraspóricos, com exceção da linhagem CS7, que apresenta uma maioria de basídios trispóricos.

*Comitê Orientador: Eduardo Alves – UFLA (Orientador), Eustáquio Souza Dias – UFLA

ABSTRACT

HERRERA, Karina Marjorie Silva. **Basidiosporogenesis in *Agaricus brasiliensis***. 2009. 50 p. Dissertation (Master degree in Agricultural Microbiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. is a fungus native from Brazil that has great potential for use and consumption due to its nutritional and medicinal properties, however, studies on the basic biology of the species are scarce. This work aimed to study the process of basidiosporogenesis and variation in the number of basidiospores in different strains of *A. brasiliensis* during its development. For transmission electron microscopy (TEM) lamellae and basidiospores of strain CS1 were used, and for scanning electron microscopy (SEM) lamellae of strains CS1, CS2, CS7, CS9 and CS10. To TEM the basidiospores were subjected to treatments of: 1) simple setting, 2) vibrated with glass beads and 3) hydrolysis with HCl, for permeabilization of the cell wall. The others steps of sample preparation for TEM and SEM were performed according to standard protocol. The process of basidiosporogenesis could be observed through the viewing of internal structures and external basidia and basidiospores present on the surface of the lamella. Nuclei, mitochondria, vacuoles and the septal pore were observed by TEM in the basidia and treatment of hydrolysis allowed the observation of three layers forming the thick wall of basidiospores. In SEM observed lamellae with basidia and basidiospores at different stages, showing that the development of these structures occurs asynchronously. All strains exhibited hyphae connecting promoting the connection of adjacent basidia. In CS2 the basidiospores showed, many times, involved in an extracellular matrix, differing from other strains that have free basidiospores. The species studied have predominant frequency of tetrasporic basidia, with the exception of strain CS7 that features a majority of basidia trisporic.

*Guidance Committee: Eduardo Alves – UFLA (Major Professor), Eustáquio Souza Dias – UFLA

1 INTRODUÇÃO

O cogumelo *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. é um fungo nativo do Brasil e encontrado naturalmente na região sudoeste de São Paulo. Pela característica de crescimento em campos abertos e ensolarados, passou a ser conhecido como cogumelo do sol, sendo consumido mundialmente como alimento terapêutico, desde que substâncias com atividade antitumoral foram descobertas em seus corpos de frutificação.

A. brasiliensis é considerado alimento de alto valor nutricional e apresenta propriedades medicinais que despertam grande interesse da comunidade científica. Por essa razão, o cultivo dessa espécie em escala comercial apresentou-se, no início da década de 1990, como uma alternativa de renda para muitas empresas e produtores rurais brasileiros, motivados pelo elevado preço do produto e condições climáticas favoráveis.

Entretanto, por se tratar de uma atividade relativamente recente no Brasil e o cultivo ser praticado ainda na ausência de embasamento técnico-científico os produtores passaram a enfrentar alguns problemas referentes às condições de cultivo e à falta de uniformidade na produção.

Com a crescente competição no mercado internacional, o aumento da produtividade e a redução de custos fazem-se imperativos para que o cultivo de *A. brasiliensis* seja economicamente viável. Além do desenvolvimento de novas técnicas de manejo e de cultivo, o melhoramento genético clássico constitui, a médio e a longo prazo, uma das estratégias mais importantes para a obtenção de linhagens mais produtivas e de melhor qualidade. Para tanto, é necessário conhecer bem o ciclo sexual do fungo, o seu comportamento nuclear e as diferenças genéticas e morfológicas entre as linhagens.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o processo de basidiosporogênese em *A. brasiliensis* e a variação do número de basidiósporos produzidos por basídio em diferentes linhagens, durante o seu desenvolvimento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos taxonômicos

O cogumelo *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. é um fungo filamentosos pertencente à divisão Basidiomycota, classe Basidiomycetes e ordem Agaricales, que apresenta cerca de trezentos gêneros e aproximadamente cinco mil espécies (Souza & Aguiar, 2004).

Na ordem Agaricales estão incluídos os fungos que apresentam corpo de frutificação visível a olho nu, estipe central separado do píleo, lamelas livres, acinzentadas quando jovens e marrom-escuras na maturidade (Urban et al., 2001).

O cogumelo do sol, inicialmente denominado *Agaricus blazei* Murrill (Heinemann, 1993), passou a ser designado por *Agaricus brasiliensis*, uma vez que Wasser et al. (2002) constataram que a espécie cultivada no Brasil era diferente do *Agaricus blazei* identificado por Murrill, em 1945. Ainda assim, permanece a polêmica acerca do nome da espécie (Wasser et al., 2005; Kerrigan, 2007; Wasser, 2007), considerada por Kerrigan (2005) como uma sinônimo para a espécie *Agaricus subrufescens* encontrada naturalmente na América do Norte. Todavia, muitos cientistas ao redor do mundo têm adotado a identificação de Wasser (Dias et al., 2008).

2.2 Consumo de cogumelos

Os cogumelos são utilizados na alimentação humana desde a antiguidade (Donini et al., 2006) e, embora sejam empregados mundialmente, seu consumo se encontra consolidado principalmente na cultura oriental (Chang, 1996).

Cerca de duas mil espécies de cogumelos comestíveis são conhecidas, mas apenas 25 são comercialmente cultivadas (Furlani & Godoy, 2008). Dentre as espécies da ordem Agaricales mais importantes na indústria de alimentos podem-se destacar: *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris), *Lentinula edode* (Shiitake), *Pleurotus ostreatus* (Shimeji) (Novaes & Novaes, 2005) e *Agaricus brasiliensis* (Cogumelo do sol) (Urben & Uriartt, 2002).

O cogumelo *A. brasiliensis* tem sido consumido mundialmente como alimento terapêutico, principalmente na forma de chás ou cápsulas (Escouto et al., 2005), sendo o Brasil o maior produtor mundial, sendo cerca de 95% da produção destinada à exportação para o mercado japonês (Tomizawa et al., 2007).

2.3 Propriedades nutricionais e medicinais

Os cogumelos comestíveis são, em geral, alimentos de alto valor nutricional, considerando-se que sua composição química varia de acordo com a espécie e linhagem avaliadas (Eira & Minhoni, 1996).

O cogumelo *A. brasiliensis* é um alimento rico em proteínas, fibras e minerais, com baixos teores de lipídios (Oliveira et al., 1999) e elevados teores de carboidratos, β -glicanas (Novaes & Fortes, 2005) e vitaminas, incluindo a tiamina, riboflavina, niacina, biotina, ácido ascórbico e outras relacionadas com o complexo B (Bononi & Trufem, 1986).

Além das propriedades nutricionais, a descoberta de substâncias com atividade antitumoral (Ohno et al., 2001), imunorregulatória (Takatu et al., 2001) e antimutagênica (Delmanto et al., 2001) tem atraído a atenção da comunidade científica.

Mizuno et al. (1990), fracionando os corpos de frutificação de *A. brasiliensis*, obtiveram dezessete polissacarídeos com atividade antitumoral.

Dentre esses polissacarídeos, destacam-se o β -D-glicano, ácido α -D-glicano, ácido β -D-glicano e proteínas complexas de RNA.

Os mecanismos de ação das substâncias bioativas presentes nos cogumelos ainda não estão completamente esclarecidos, mas evidências científicas sugerem que essas substâncias sejam capazes de modular a carcinogênese em diferentes estágios, promovendo benefícios aos portadores de diversos tipos de câncer (Fortes & Novaes, 2006).

2.4 Características vegetativas

Os basidiomicetos apresentam hifas septadas, as quais podem ser visualizadas a olho nu, como um emaranhado de fios delgados, denominado micélio (Alexopoulos et al., 1996).

A septação nos fungos filamentosos leva à formação de compartimentos individuais na hifa (Walther & Wendland, 2003) sendo, por isso, considerados como organismos multicelulares (Alexopoulos et al., 1996). Entretanto, apesar de separados por septos, os compartimentos não são completamente fechados (Loguercio-Leite et al., 2006).

Em eucariotos, existem vários tipos de conexão entre células que podem permitir a troca de material entre compartimentos adjacentes (Takats, 1959).

A anastomose entre hifas vizinhas permite a troca de núcleos bem como parte do citoplasma, sendo considerada importante para a obtenção de heterocariose em fungos (Chang & Hayes, 1978).

O grampo de conexão constitui-se de uma pequena ramificação emitida pela hifa, unindo compartimentos celulares vizinhos. Além disso, nos grampos de conexão, uma estrutura denominada septo dolipore pode ser facilmente observada por microscopia eletrônica de transmissão, sendo exclusiva de

basidiomicetos e relacionada com a troca de substâncias (Alexopoulos et al., 1996).

O cogumelo *A. brasiliensis* apresenta micélio multinucleado com número médio entre cinco e seis núcleos por compartimento celular (Labory et al., 2003), demonstrando uma organização nuclear diferente de basidiomicetos tipicamente dicarióticos (Dias et al., 2008).

2.5 Reprodução e ciclo de vida

A reprodução assexuada em fungos ocorre pela fragmentação do micélio ou pela produção de esporos assexuados, enquanto a reprodução sexuada se inicia pela germinação de esporos homocarióticos que darão origem a hifas primárias não férteis. O micélio produzido pela germinação do esporo de um fungo heterotálico é incapaz de autofertilização, podendo, entretanto, realizar cruzamento com um tipo sexual compatível (Alexopoulos et al., 1996).

No caso de um fungo homotálico, um micélio autofértil pode ser produzido pela germinação de esporos com núcleos “idênticos” sem nenhum fator de incompatibilidade (Chang & Hayes, 1978). Já para espécies pseudo-homotálicas, apesar da existência do fator de incompatibilidade, o micélio heterocariótico que se desenvolve a partir da germinação dos esporos é autofértil, sendo encontrado normalmente em fungos bispóricos com basidiósporos com dois núcleos de “mating type” diferentes (Alexopoulos et al., 1996).

O cogumelo *A. brasiliensis* produz basídios com quatro basidiósporos binucleados, indicando a ocorrência de uma terceira divisão nuclear (Labory et al., 2003). De acordo com os padrões de mitose pós-meiótica possíveis para *A. brasiliensis*, a terceira divisão nuclear poderia estar ocorrendo no interior do basidiósporo (Padrão D descrito por Duncan & Galbraith, 1972), ou no interior

do basídio, migrando dois núcleos já formados para dentro de cada basidiósporo (Padrão E apresentado por Mueller et al., 1993). Com a divisão ocorrendo nos basidiósporos, estes seriam obrigatoriamente homocarióticos, enquanto no basídio, diferentes combinações seriam formadas originando basidiósporos heterotáticos e homotáticos.

Segundo Duncan & Galbraith (1972), dois padrões de comportamento podem ser ocasionalmente encontrados dentro de uma mesma espécie. Em *Agaricus bisporus*, diferentes linhagens apresentam diferentes ciclos de vida (Callac et al., 2006), sendo aquelas em que operam simultaneamente mais de um ciclo de vida consideradas anfítáticas (Lange, 1952).

Dias et al. (2008) encontraram evidências de que a mitose pós-meiótica ocorre nos basidiósporos, o que os tornaria homocarióticos e, portanto, *A. brasiliensis*, uma espécie primariamente heterotática. Esses trabalhos evidenciam, portanto, a necessidade de maiores estudos sobre o comportamento nuclear e formação dos basidiósporos nessa espécie.

2.6 Caracterização citológica por microscopia eletrônica

Greuter & Rast (1975) utilizaram microscopia eletrônica de transmissão para obter detalhes ultraestruturais de esporos dormentes de *Agaricus bisporus*. Os autores observaram que esses esporos são normalmente binucleados, com citoplasma dominado por um ou mais corpos lipídicos algumas vezes associados com grânulos de glicogênio, presença de ribossomos livres, microcorpos (provavelmente glioxissomos) associados às mitocôndrias, estruturas semelhantes a vacúolos no local de ligação com o esterigma, parede com duas camadas externas espessas e uma fina camada próxima ao citoplasma. O retículo endoplasmático não foi observado e um poro germinativo pré-formado não foi

identificado, sugerindo que o tubo germinativo possa emergir de qualquer parte do esporo do cogumelo.

Em estudo realizado por Mims et al. (1987) três espécies de fungos *Exobasidium* foram examinadas por microscopia eletrônica de transmissão, permitindo a visualização de núcleos, nucléolos, complexo sinaptonêmico, ribossomos, mitocôndrias, fibras do fuso e gotículas de lipídeos. Além disso, a meiose I, II e terceira divisão nuclear também puderam ser observadas durante o desenvolvimento de basídios e basidiósporos.

O estudo da ultraestrutura de basídios e basidiósporos pode contribuir para um melhor entendimento da biologia básica dos gêneros, assim como possibilitar o esclarecimento de questões taxonômicas (Mims et al., 1987). Já estudos acerca da parede dos esporos e suas estruturas internas podem auxiliar no desenvolvimento de técnicas mais eficientes de fixação e coloração dos mesmos (Greuter & Rast, 1975).

2.7 Variação do número de basidiósporos

Durante levantamento de dados acerca do gênero *Agaricus* na Califórnia, Kerrigan (1982) observou que várias espécies reportadas na literatura como tetraspóricas apresentavam-se na natureza de forma heterogênea com relação ao número de basidiósporos.

Uma das causas levantadas para esse fenômeno em *Agaricus bisporus* é a exposição a baixas temperaturas, concluindo-se que o número de esporos por basídio em *A. bisporus* não é fixo, mas sim um dos aspectos dinâmicos no desenvolvimento do basidiocarpo que se encontra exposto a diversas condições ambientais (Kerrigan & Ross, 1987).

Analisando trabalhos de Elliott (1977) e Saksena et al. (1976), Kerrigan & Ross (1987) reconheceram na microscopia eletrônica de varredura uma

técnica mais apurada para a contagem de basidiósporos em relação à microscopia de luz, já que esta última gera uma frequência subestimada da heterogeneidade no número de basidiósporos considerando que basídios ambíguos são excluídos das contagens.

A. brasiliensis é uma espécie tipicamente tetráspórica, apesar de alguns basídios trispóricos terem sido observados. Diante desse fato, um estudo mais detalhado acerca da variação no número de basidiósporos em diferentes linhagens de *A. brasiliensis* torna-se necessário uma vez que basídios portando dois ou três esporos poderão produzir basidiósporos recebendo mais de um núcleo pós-meiótico, constituindo, conseqüentemente, um heterocário fértil se os núcleos forem sexualmente compatíveis (Dias et al., 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.1 Material biológico

O material biológico constituiu-se de basidiocarpos frescos resultantes da frutificação das linhagens CS1, CS2, CS7, CS9 e CS10 de *Agaricus brasiliensis*. Os basidiocarpos foram produzidos no Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais do Departamento de Biologia (DBI/UFLA), segundo protocolo descrito por Chang & Miles (2004), modificando-se apenas a duração das fases I e II, que foram de 14 dias.

3.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a observação em microscopia eletrônica de transmissão foram utilizadas lamelas e basidiósporos da linhagem CS1 de *A. brasiliensis*.

Lamelas de basidiocarpos em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 1) foram retiradas com o auxílio de uma pinça e cortadas à mão livre com bisturi em pedaços de no máximo 1 mm de largura, permanecendo imersas em fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001M), por um período de, no mínimo, 24 horas.



FIGURA 1 Basidiocarpos da linhagem CS1 de *A. brasiliensis* coletados em diferentes estágios de desenvolvimento

Já os basidiósporos colhidos pela abertura do píleo dentro de béqueres estéreis foram submetidos a três tipos de tratamento:

- 1) diretamente adicionados em fixador Karnovsky modificado;
- 2) diretamente adicionados em fixador Karnovsky modificado sendo vortexados por 30 segundos com duas esferas de vidro dentro de um microtubo (Greuter & Rast, 1975);

- 3) submetidos à hidrólise com HCl 1N em banho-maria, a 60°C, por 10 minutos, ressuspensos em água destilada gelada, lavados por mais duas vezes em água destilada à temperatura ambiente e, então, adicionados em fixador Karnovsky modificado (Labory et al., 2003).

Os basidiósporos de todos os tratamentos permaneceram em fixador Karnovsky modificado por um período de, no mínimo, 24 horas, sendo posteriormente ressuspensos em ágar 2% fundido, com temperatura aproximada de 60°C, solidificado em geladeira e o ágar cortado à mão livre com bisturi em cubos de 1 mm.

Após fixação das lamelas e basidiósporos, foi utilizado protocolo padrão para microscopia eletrônica de transmissão descrito por Bossola & Russell (1998) e adaptado por Alves (2004).

As amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,05M por três vezes de 10 minutos cada, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1,0% em água por 4 horas, lavadas por duas vezes de 15 minutos em água destilada e transferidas para solução de acetato de uranila a 0,5%, durante 12 horas, a 4°C. Em seguida, lavadas novamente em água destilada e desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, uma vez e 100% por três vezes).

O material foi incluído em gradiente crescente de Spurr/acetona 30% (8 horas), 70% (12 horas) e 100% por duas vezes de 24 horas cada, montado em moldes de silicone e submetido à polimerização em estufa a 70°C, por 48 horas.

Os excessos de resina nos blocos foram retirados com um aparelho de “Trimming”, sendo o acabamento realizado manualmente com o auxílio de uma lupa e lâmina de barbear. Secções ultrafinas (<100nm) foram confeccionadas utilizando-se de um ultramicrótomo Reichert-jung (ultracut).

Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de ouro (*golden slot grids*) e secos em raques de alumínio cobertos com formvar. As secções foram pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo por três minutos cada, secas ao ar e, em seguida, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80kv.

3.3 Microscopia eletrônica de varredura

Para observação em microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas lamelas das linhagens CS1, CS2, CS7, CS9 e CS10 de *A. brasiliensis*.

Quatro basidiocarpos de cada linhagem, cultivados em diferentes vasos, foram coletados logo após a abertura do píleo e, destes, quatro porções das lamelas foram retiradas de pontos equidistantes entre si e aproximadamente 5 mm distante da borda da lamela (Figura 2).

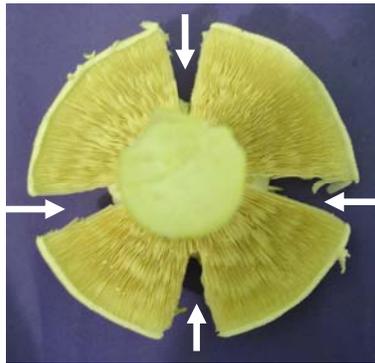


FIGURA 2 Basidiocarpo da linhagem CS1 de *A. brasiliensis* em que porções de lamelas foram retiradas de pontos equidistantes entre si (setas)

As lamelas coletadas foram cortadas à mão livre com bisturi em pedaços de, no máximo, 2 cm² e imersas em fixador Karnovsky modificado por um período de, no mínimo, 24 horas.

Após fixação, foi utilizado protocolo padrão para microscopia eletrônica de varredura descrito por Bossola & Russell (1998) e adaptado por Alves (2004).

As amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,05M por três vezes de 10 minutos cada, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1,0% em água por 4

horas, lavadas por três vezes em água destilada e desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, uma vez e 100% por três vezes).

Após desidratação, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituição da acetona por CO₂ e complementação da secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs* com fita de carbono sobre uma película de papel alumínio e cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050 para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40.

Para todos os campos avaliados nas diferentes linhagens foi utilizada a distância de trabalho (WD) de 10 mm e aumento = 3500X.

Por meio da seleção de uma área da lamela ao acaso foi estabelecido um valor fixo no eixo Y, percorrendo somente o eixo X (ou vice-versa) de forma que não houvesse sobreposição de imagens entre dois campos adjacentes ou que um mesmo campo fosse contabilizado mais de uma vez.

Basídios com estágio de desenvolvimento apropriado dentro de cada campo foram contabilizados. Uma vez que o estágio de basidiósporos completos não permite uma determinação adequada por microscopia eletrônica de varredura (Kerrigan & Ross, 1987), foram adotados os seguintes estágios para contagem: 1) esterigmas pré-formados, 2) basidiósporos em estágio inicial de intumescimento na extremidade do esterigma e 3) basidiósporos descarregados.

Foram avaliados 30 campos para cada basidiocarpo, totalizando 120 imagens para cada linhagem.

A frequência de basídios portando diferentes números de basidiósporos em *A. brasiliensis* foi estimada e a significância dos resultados determinada pelo teste de qui-quadrado por meio do programa computacional R versão 2.9.1. (R Foundation for Statistical Computing, 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ultraestrutura das lamelas

Nas observações realizadas em microscópio eletrônico de transmissão foi possível observar que as lamelas de *A. brasiliensis* consistem de células cilíndricas que se expandem e tornam-se clavadas durante o desenvolvimento (Figura 3).

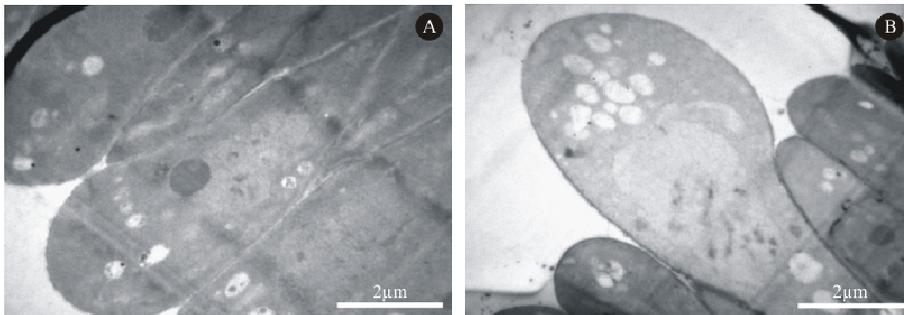


FIGURA 3 Eletromicrografia de transmissão de lamelas de *A. brasiliensis* mostrando basídios em forma de clava

Não foram observadas diferenças citológicas nas lamelas de basidiocarpos coletados em diferentes estágios de desenvolvimento. Foram visualizados alguns basídios com um (Figura 4A) ou dois núcleos (Figura 4B), mas nenhum com quatro ou mais.

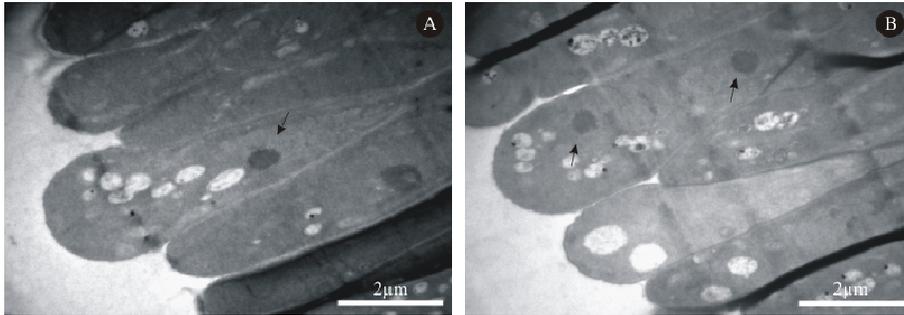


FIGURA 4 Eletromicrografia de transmissão de basídios de *A. brasiliensis* com (A) um e (B) dois núcleos. Setas indicam o nucléolo

Por meio de microscopia de fluorescência, Dias et al. (2008) conseguiram observar todo o processo meiótico nos basídios de *A. brasiliensis*. O fato de não serem observados basídios com quatro núcleos não significa que eles não estejam presentes, mas sim que, em cortes ultrafinos, de aproximadamente 60nm de espessura, um mesmo basídio pode ser seccionado dezenas de vezes e nem todas as estruturas, incluindo o núcleo, aparecem na mesma secção.

Outras estruturas frequentemente observadas foram as mitocôndrias (Figura 5A), vacúolos (Figura 5B e C) e o septo Doliporo (Figura 5D), sendo este último exclusivo dos fungos da divisão Basidiomycota.

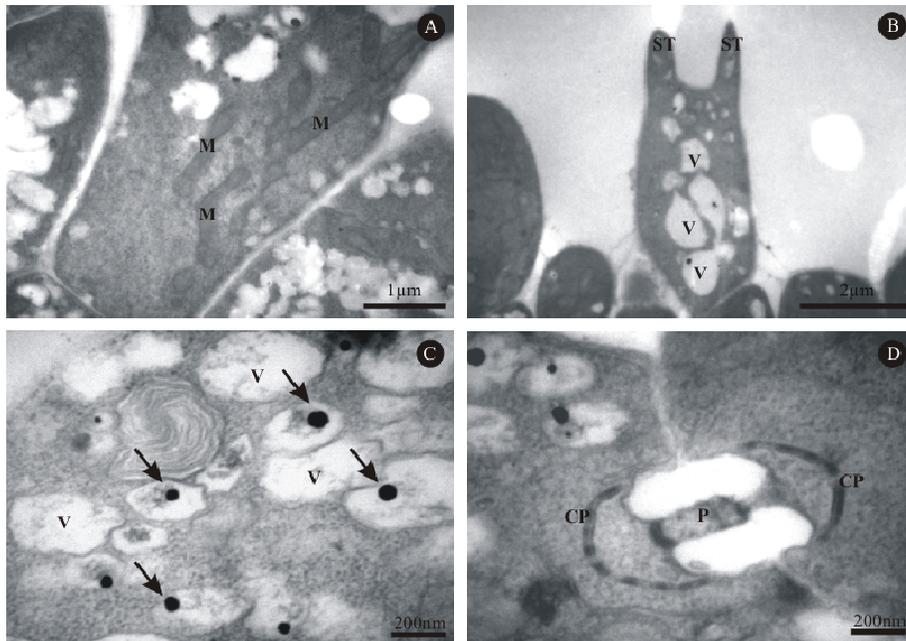


FIGURA 5 Eletromicrografia de transmissão de basídios de *A. brasiliensis* mostrando em A. Mitocôndrias (M), B. Esterigmas (ST) e vacúolos (V), C. Corpos esféricos indicados pelas setas e, D. Septo doliporo, formado pelo poro (P) e capa do poro (CP)

O número de mitocôndrias encontrado nos basídios de *A. brasiliensis* é variável, assim como sua forma e tamanho.

Segundo Westermann & Prokisch (2002), citados por Louguercio-Leite (2006), as mitocôndrias movem-se ativamente ao longo das vias citoesqueléticas e, frequentemente, mudam de forma, podendo ser alongadas ou ovais e de tamanho variado devido a eventos de fissão e fusão.

Os vacúolos, encontrados também em número e tamanho variado, realizam, de maneira geral, nos fungos, três funções básicas: (a) armazenamento

de nitrogênio e fosfato, (b) empacotamento e secreção de enzimas hidrolíticas e (c) síntese e secreção de polissacarídeos extracelulares (Griffin, 1994).

Com relação aos corpos esféricos (Figura 5C), presentes na maioria dos vacúolos, sua composição e função são desconhecidas.

Em *A. brasiliensis*, o poro do septo é coberto por uma membrana denominada capa do poro que parece consistir de um retículo endoplasmático modificado, sendo parte integral e funcional do aparato do septo. Acredita-se que a capa do poro atue na seleção e troca de componentes entre células vizinhas (Alexopoulos et al., 1996).

4.2 Ultraestrutura dos basidiósporos

De acordo com Greuter & Rast (1975), a espessa parede dos esporos fúngicos oferece dificuldades para fixação e coloração dos mesmos, muitas vezes impossibilitando a visualização e o conhecimento de suas estruturas internas.

A grande maioria dos basidiósporos que foram diretamente fixados em Karnovsky modificado ou vortexados com esferas de vidro mostraram-se vazios (Figura 6 A, B, C e D), sendo o citoplasma completamente perdido durante o processo de preparo para microscopia eletrônica de transmissão.

Dentre os tratamentos testados para permeabilizar a parede dos basidiósporos de *A. brasiliensis*, aquele que apresentou melhor resultado foi o de hidrólise com HCl (Figura 6 E e F).

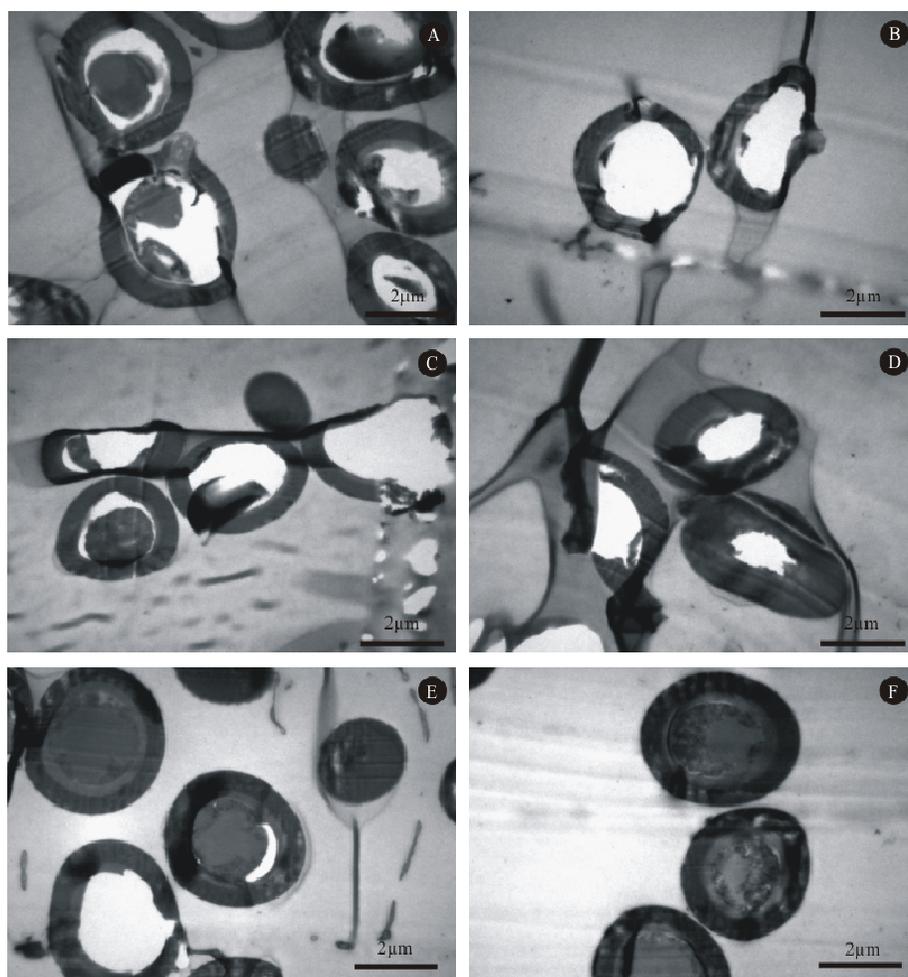


FIGURA 6 Eletromicrografia de transmissão de basidiósporos de *A. brasiliensis*. A-B. Basidiósporos fixados em Karnovsky. C-D. Basidiósporos vortexados com esferas de vidro e fixados em Karnovsky. E-F. Basidiósporos hidrolisados e fixados em Karnovsky

Os basidiósporos de *A. brasiliensis*, assim como em *Agaricus bisporus* (Greuter & Rast, 1975), apresentam parede celular formada por três camadas

(Figura 7 A), sendo duas mais espessas (W1 e W2) e uma mais delgada (W3) próxima ao citoplasma.

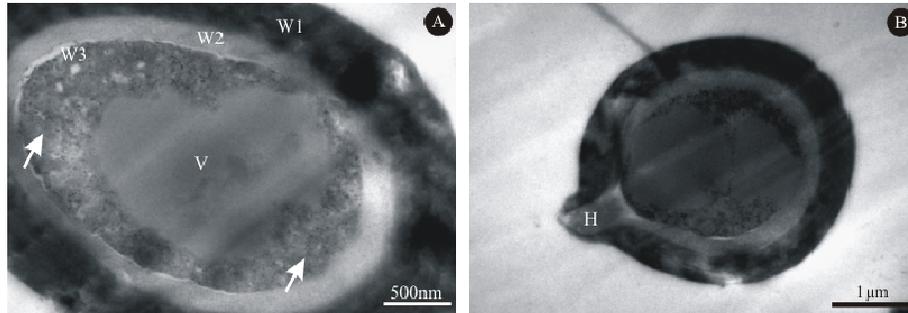


FIGURA 7 Eletromicrografia de transmissão de basidiósporos de *A. brasiliensis*. A. Camadas formadoras da parede celular (W1, W2 e W3), vacúolo (V) e região de grânulos de glicogênio indicados pelas setas. B. Apêndice Hilar (H)

A camada mais externa (W1) corresponde à camada de maior espessura e densidade. A camada do meio (W2) é menos eletrodensa e parece cobrir continuamente a região de ligação com o esterigma–apêndice hilar (Figura 7 B). Já a camada interna (W3) é dificilmente observada por ser a mais delgada e responsável por fazer a ligação da parede com o citoplasma do basidiósporo.

Poros germinativos pré-formados na parede dos basidiósporos não foram observados. Segundo Hein (1930), citado por Greuter & Rast (1975), o tubo germinativo pode emergir de qualquer parte do basidiósporo, entretanto, analisando as imagens obtidas, julgamos que este poderia ser mais facilmente emergido através do apêndice hilar, onde a terceira camada não está presente.

Dias et al. (2008) relatam a presença de dois núcleos em basidiósporos maduros de *A. brasiliensis*, entretanto, nenhum núcleo foi identificado nas secções examinadas.

Greuter & Rast (1975) visualizaram, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, mitocôndrias, ribossomos e corpos lipídicos em basidiósporos de *A. bisporus* e, assim como o núcleo, essas estruturas não foram observadas nos basidiósporos de *A. brasiliensis*.

O citoplasma dos basidiósporos de *A. brasiliensis* parece conter apenas um grande vacúolo e grânulos (Figura 7 A), provavelmente de glicogênio, que constitui a principal reserva energética dos fungos.

4.3 Estruturas de basídios

As lamelas de *A. brasiliensis* apresentam como estruturas de reprodução sexuada basídios que se ligam aos basidiósporos por meio dos esterigmas (Figura 8A). Os basidiósporos, quando maduros, apresentam-se ovais e túrgidos, com uma cicatriz, denominada apêndice hilar (Figura 8B), que indica o ponto de liberação do esterigma.

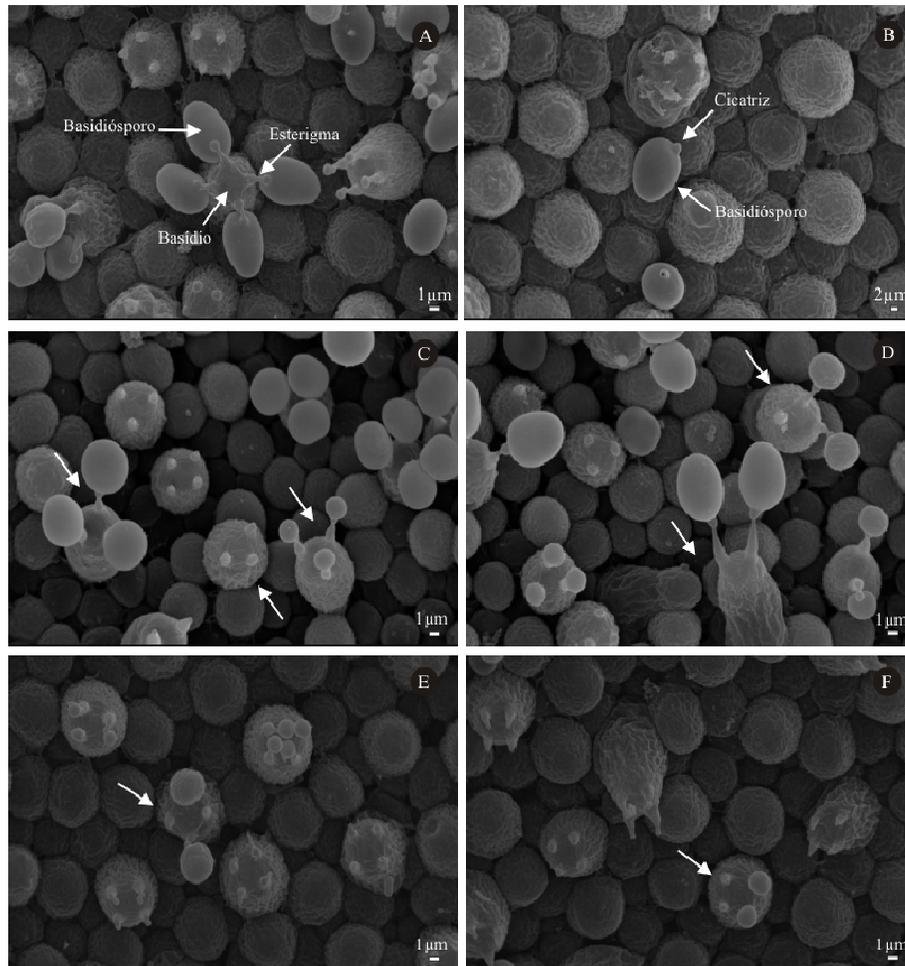


FIGURA 8 Eletromicrografia de varredura de lamelas de *A. brasiliensis*. A. Basidiósporos ligados ao basídio. B. Cicatriz no basidiósporo. C-D. Desenvolvimento assincrônico de basídios e basidiósporos em uma mesma região. E-F. Diferentes estágios de desenvolvimento dos basidiósporos em um mesmo basídio

Todas as linhagens de *A. brasiliensis* apresentam lamelas com basídios e basidiósporos em diferentes estágios (Figura 8 C-D), demonstrando que o desenvolvimento dessas estruturas ocorre de maneira assincrônica.

Este fenômeno pode ser considerado vantajoso para o fungo, uma vez que a maturação dos basidiósporos se dá gradativamente, estendendo o processo de liberação por mais tempo, assim permitindo que o fungo encontre condições ambientais favoráveis para germinação.

Além de basídios em diferentes estágios de desenvolvimento, foram observados também, num mesmo basídio, esterigmas com basidiósporos em fase inicial ou avançada de desenvolvimento e esterigmas sem basidiósporos (Figura 8 E-F), os quais podem ter sido liberados ou ainda não terem sido iniciados.

Outra possibilidade é que nem todos os esterigmas de um basídio produzam basidiósporos, sendo estes abortados. Dessa forma, os basidiósporos desenvolvidos poderiam receber mais de um núcleo advindo da meiose no basídio e sendo os núcleos de *mating types* distintos, gerados basidiósporos autoférteis.

Esse comportamento foi sempre observado aos pares, ou seja, dois esterigmas com basidiósporos e dois esterigmas sem basidiósporos. Essa observação constitui uma evidência de que dois esterigmas podem de fato não dar origem aos seus basidiósporos, podendo os núcleos migrarem para os outros esterigmas.

Na linhagem CS2 foram observados basidiósporos envolvidos por uma matriz (Figura 9).

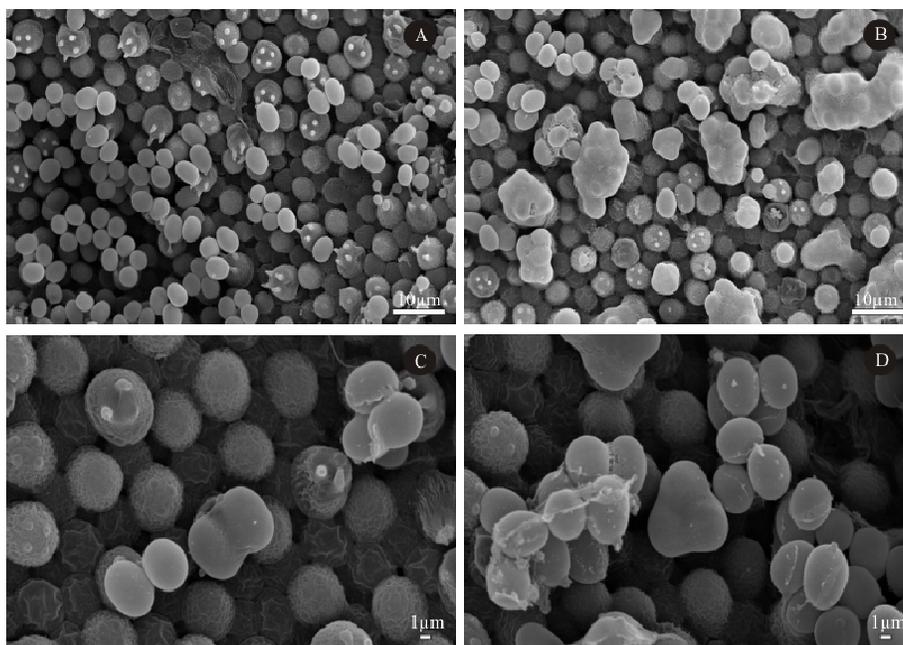


FIGURA 9 Eletromicrografia de varredura de lamelas de *A. brasiliensis* mostrando (A) basidiósporos livres e (B-C-D) basidiósporos da linhagem CS2 envolvidos por uma matriz

Não se conhece a composição e as causas de produção dessa matriz, o que ela representa no processo de dispersão e germinação dos basidiósporos. Entretanto, caso esses basidiósporos sejam viáveis e passíveis de liberação normal, o cruzamento interno poderia ser favorecido, garantindo a formação de dicários e a consequente geração de indivíduos com capacidade de completar o ciclo sexual.

O fenômeno mais curioso, observado em todas as linhagens, foi a observação de hifas de conexão entre basídios diferentes ligando um esterigma a outro (Figura 10). Na figura 10C é possível observar a formação de um

basidiósporo a partir da fusão entre as hifas de conexão, o que pode sugerir que a fusão dessas hifas aconteça antes da produção dos basidiósporos.

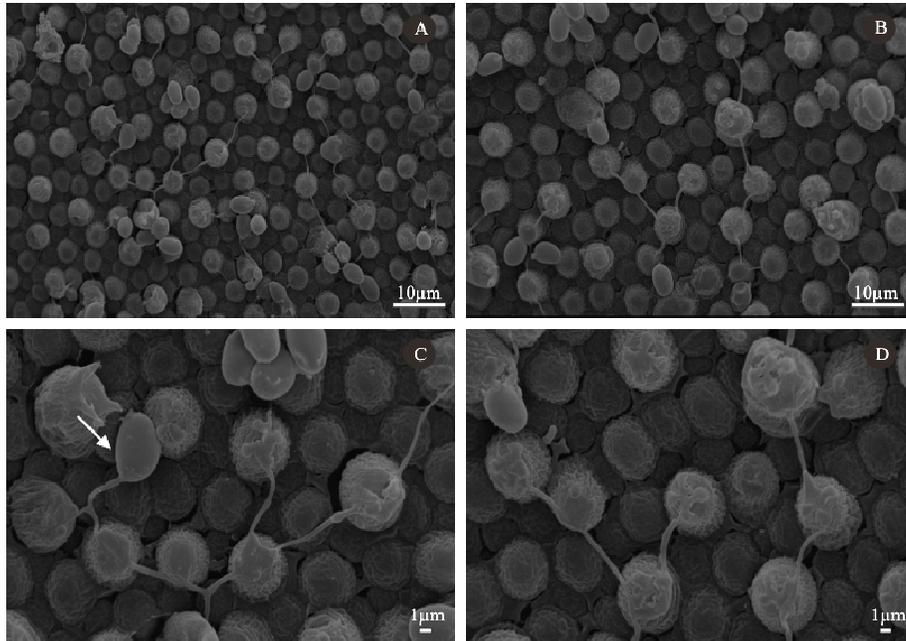


FIGURA 10 Eletromicrografia de varredura de lamelas de *A. brasiliensis* com basídios ligados entre si por hifas de conexão. Seta indica um basidiósporo ligado as hifas de conexão

Sugere-se que essas hifas de conexão permitem a transferência de núcleos entre os basídios e contribuem para garantir a produção de basidiósporos binucleados heterocarióticos. Entretanto, não se tem conhecimento de outros relatos na literatura sobre essas estruturas e, portanto, novos estudos deverão ser conduzidos para se determinar o momento exato de sua formação e a sua função no processo de produção dos basidiósporos.

4.4 Variação do número de basidiósporos

Basídios portando dois (Figura 11), três (Figura 12) e quatro (Figura 13) basidiósporos foram observados em todas as linhagens.

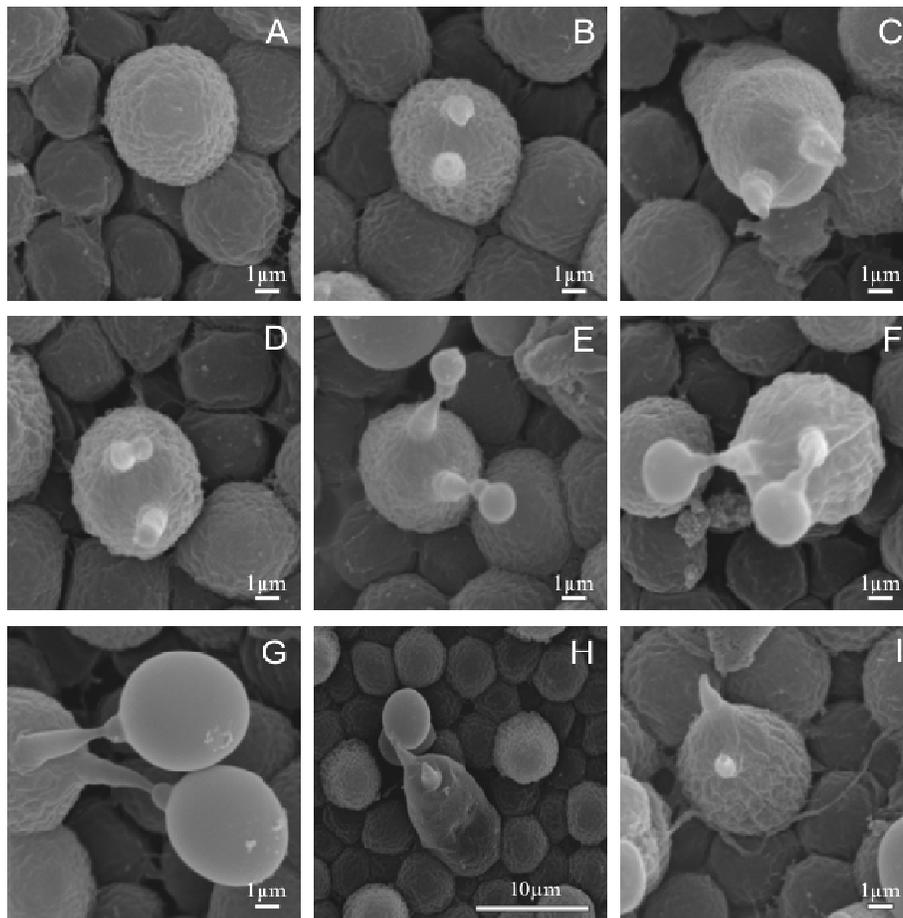


FIGURA 11 Eletromicrografia de varredura mostrando o desenvolvimento de basídios bispóricos na superfície de lamelas de *A. brasiliensis*.

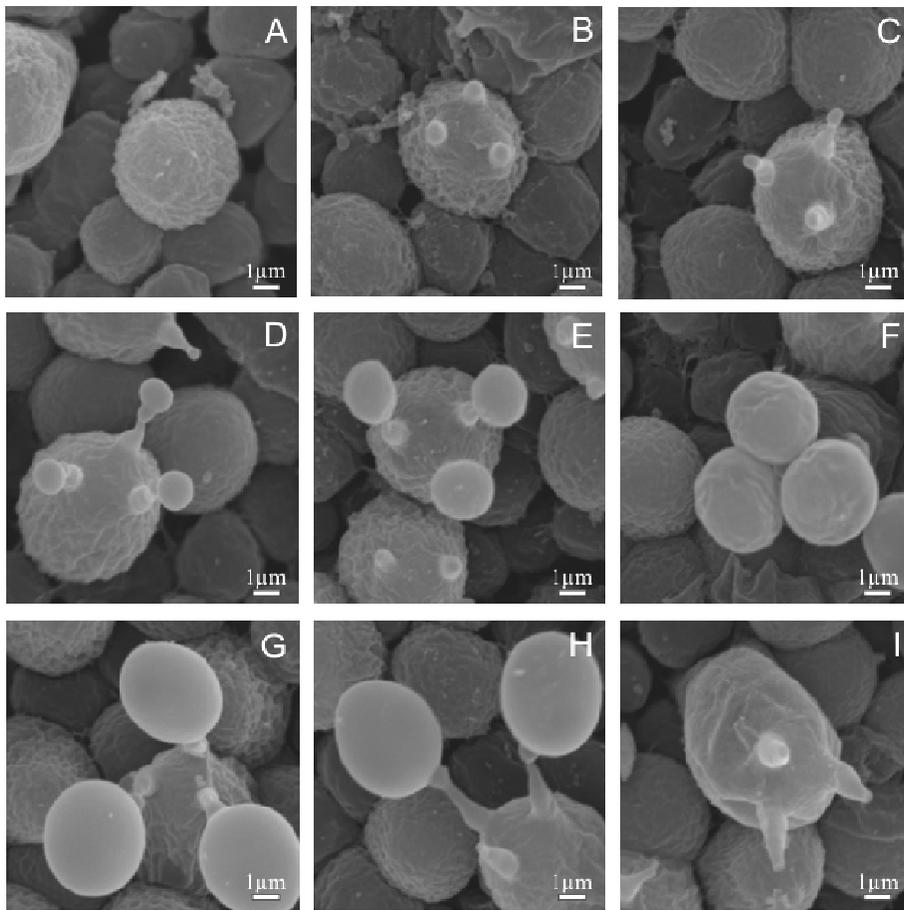


FIGURA 12 Eletromicrografia de varredura mostrando o desenvolvimento de basídios trispóricos na superfície de lamelas de *A. brasiliensis*.

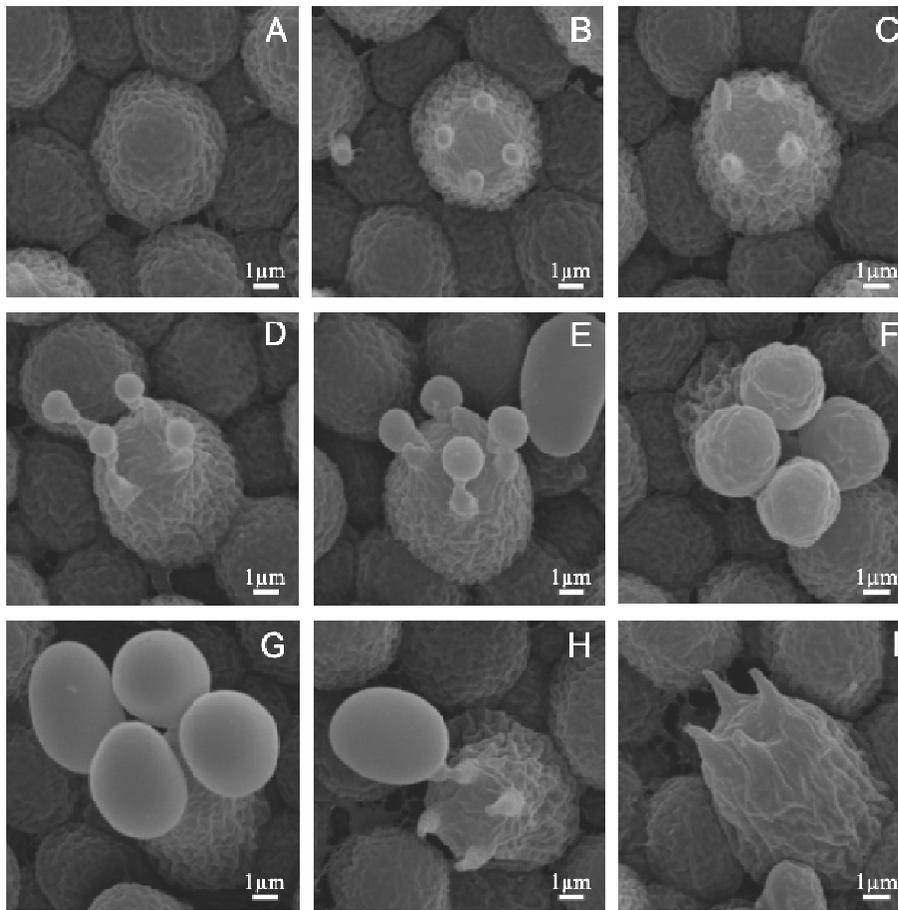


FIGURA 13 Eletromicrografia de varredura mostrando o desenvolvimento de basídios tetraspóricos na superfície de lamelas de *A. brasiliensis*.

A maioria das linhagens de *Agaricus brasiliensis* apresentou frequência predominante de basídios tetraspóricos. Já a linhagem CS2, apesar da maioria dos basídios ser tetraspórica, exibiu, assim como a CS7, grande quantidade de basídios bispóricos e trispóricos, sendo, no caso da CS7, os basídios trispóricos aqueles de maior frequência (Tabela 1).

TABELA 1 Número (Nº.) e frequência (Freq.) de basídios portando 2, 3 e 4 basidiósporos nas linhagens de *Agaricus brasiliensis*

LINHAGEM	CS1		CS2		CS7		CS9		CS10	
	Nº.	Freq.	Nº.	Freq.	Nº.	Freq.	Nº.	Freq.	Nº.	Freq.
Basidiósporos por basídio										
2	10	0,8%	172	8,3%	215	23,2%	6	0,3%	3	0,2%
3	110	8,2%	780	37,5%	434	46,9%	165	8,5%	78	5,9%
4	1217	91,0%	1129	54,2%	277	29,9%	1778	91,2%	1254	93,9%
TOTAL	1337	100%	2081	100%	926	100%	1949	100%	1335	100%

Em nenhuma das linhagens foram visualizados basídios monospóricos ou portando número de esporos superior a quatro.

A significância dos resultados, determinada pelo teste de qui-quadrado, possibilitou separar as linhagens avaliadas em dois grandes grupos (Figura 14), baseando-se nas diferenças encontradas com relação ao número de basidiósporos por basídio.

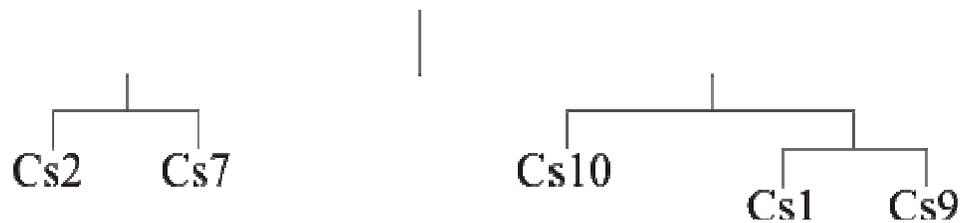


FIGURA 14 Dendrograma construído de acordo com os resultados obtidos pelo teste de qui-quadrado entre as linhagens de *A. brasiliensis*

Estes resultados são compatíveis com aqueles encontrados por Tomizawa et al. (2007) que analisaram a variabilidade genética de nove isolados de *A. brasiliensis*, dentre eles CS1, CS2, CS7 e CS9, por meio de marcadores RAPD. Os isolados CS1 e CS9 com 100% de similaridade foram considerados geneticamente idênticos, enquanto CS2 e CS7 formaram grupos distintos com 60,6% e 91,3% de similaridade, respectivamente, em relação aos demais. Diante desses resultados, os autores consideraram que esses isolados representam diferentes linhagens.

Em estudos citológicos sobre *A. brasiliensis*, Dias et al. (2008) verificaram que a linhagem CS2 apresentou o menor número de núcleos por

compartimento, menor comprimento e diâmetro celular, quando comparado às linhagens CS1 e CS7.

Considerando a predominância de basídios tetraspóricos em *A. brasiliensis* e o desenvolvimento de basidiósporos homocarióticos binucleados devido à ocorrência de uma mitose pós-meiótica nos mesmos, a espécie foi considerada primariamente heterotática (Dias et al., 2008).

Todavia, a formação de basídios bispóricos e trispóricos resulta, provavelmente, na produção de basidiósporos binucleados heterocarióticos e, conseqüentemente, autoférteis.

Devido à característica dos basidiósporos de poderem gerar culturas autoférteis, *A. brasiliensis* poderia ser considerada uma espécie anfítática, conforme proposto anteriormente por Kerrigan (2005).

O termo anfitalismo, originalmente definido por Lange (1952), seria mais apropriado para as espécies que combinam de maneira funcional os ciclos reprodutivos heterotático e homotático.

Espécies tetraspóricas geralmente apresentam um ciclo de vida heterotático (Elliott, 1978), entretanto, a redução do número de basidiósporos poderia ser um mecanismo adotado por certos basidiomicetos, incluindo *Agaricus bisporus*, para expressar o homotalismo secundário (Kerrigan & Ross, 1987).

Segundo Kerrigan & Ross (1987), o número de basidiósporos por basídio nas espécies não é fixo, podendo ser influenciado por condições ambientais. Basidiocarpos expostos a baixas temperaturas exibem uma redução no número de basidiósporos por basídio, além de numerosas aberrações.

Considerando que o presente estudo foi conduzido em ambiente fechado, no qual a temperatura interna oscilou menos que a temperatura externa, pode-se inferir que as diferenças no número de basidiósporos por basídio

aconteçam principalmente em função das diferenças genéticas entre as linhagens.

Avaliando a frequência de basídios tetraspóricos, trispóricos e bispóricos juntamente com a temperatura, observa-se que basidiocarpos das linhagens CS9 e CS10 submetidos à queda de temperatura no período de seu desenvolvimento (Figura 15) não apresentaram uma redução significativa do número de basidiósporos, exibindo alta frequência de basídios tetraspóricos, 96,5% e 95,9%, respectivamente.

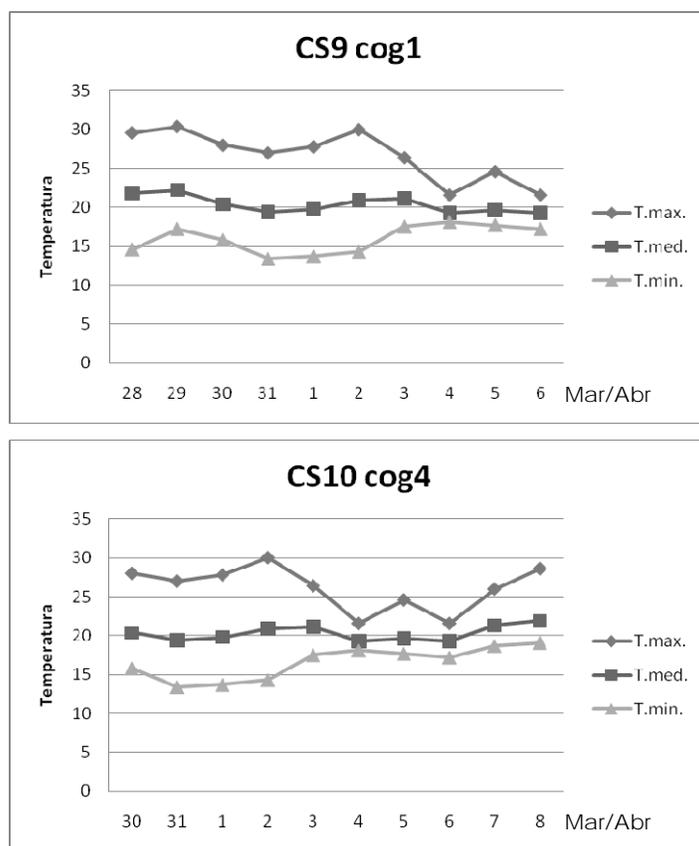


FIGURA 15 Temperatura ambiental em Lavras, MG, durante o período de desenvolvimento dos basidiocarpos

Além disso, as linhagens CS7 e CS10 cultivadas nas mesmas condições de temperatura apresentaram frequência de basídios tetraspóricos bem diferentes, 3% e 90,64%, respectivamente (Figura 16), indicando que o fator genético foi o principal responsável pela variação do número de basidiósporos nas linhagens examinadas.

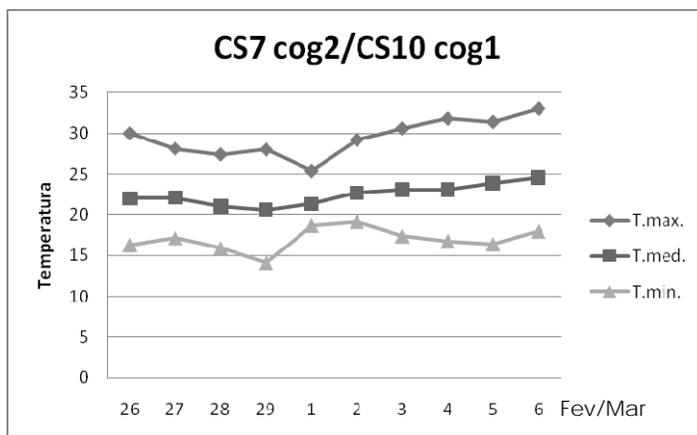


FIGURA 16 Temperatura ambiental em Lavras, MG, durante o período de desenvolvimento dos basidiocarpos

5 CONCLUSÕES

O processo de basidiosporogênese pode ser observado por meio da visualização de estruturas internas e externas em basídios e basidiósporos presentes na superfície das lamelas de *A. brasiliensis*.

Todas as linhagens exibiram hifas de conexão promovendo a ligação de basídios contíguos. Na CS2, os basidiósporos mostraram-se envolvidos por uma matriz, diferindo das demais linhagens que apresentaram os basidiósporos livres.

A espécie estudada possui frequência predominante de basídios tetraspóricos, com exceção da linhagem CS7, que apresenta uma maioria de basídios trispóricos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: J. Wiley, 1996. 866 p.
- ALVES, E. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de transmissão**. Lavras: UFLA, 2004, 52 p. Apostila.
- BONONI, V. L. R.; TRUFEM, S. F. B. **Cogumelos comestíveis**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1986. 83p. (Coleção Brasil Agrícola).
- BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. 2. ed. Boston: Jones and Bartlett, 1998. 670 p.
- CALLAC, P.; KAMZOLKINA, O. V.; VOLKOVA, V. N.; KOZLOVA, M. V.; PANCHEVA, E. V.; DYAKOV, Y. T. Karyological evidence for meiosis in the three different types of life cycles existing in *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, New York, v. 98, n. 5, p. 763-770, Sept./Oct. 2006.
- CHANG, R. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition Reviews**, New York, v. 54, n. 11, p. S91-S94, Nov. 1996.
- CHANG, S. T.; HAYES, W. A. **The biology and cultivation of edible mushrooms**. 3. ed. New York: Academic, 1978. 819p.
- CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. 2. ed. Boca Raton: CRC, 2004. 451p.
- DELMANTO, R. D.; LIMA, P. L. A. de; SUGUI, M. M.; EIRA, A. F. da; SALVADORI, D. M. F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 496, n. 1/2, p. 15-21, Sept. 2001.
- DIAS, E. S.; LABORY, C. R. G.; HERRERA, K. M. S.; ALVES, A. A.; TORRES, G. A.; RINKER, D. L. Cytological studies of *Agaricus brasiliensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 11, p. 2473-2479, Nov. 2008.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento in vitro de *Agaricus brasiliensis* em meios suplementados com diferentes farelos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 995-999, jun. 2006.

DUNCAN, E. G.; GALBRAITH, M. H. Post-meiotic events in the Homobasidiomycetidae. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 58, n. 3, p.387-392, June 1972.

EIRA, A. F. da; MINHONI, M. T. A. **Manual teórico prático do cultivo de cogumelos comestíveis**. Botucatu: FEAP/F.C.A./UNESP, 1996. 96p.

ELLIOTT, T. J. Basidiospore numbers in *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 129, n. 1, p. 525-526, jan. 1977.

ELLIOTT, T. J. Comparative sexuality in *Agaricus* species. **Journal of General Microbiology**, London, v. 107, n. 1, p. 113-122, July 1978.

ESCOUTO, L. F. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A.; AIZONO, P. M.; CARVALHO, L. R. M. de; EIRA, A. F. da. Nota prévia: Aceitabilidade do cogumelo brasileiro *Agaricus brasiliensis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, n. 4, p. 321-325, out./dez. 2005.

FORTES, R. C.; NOVAES, M. R. C. G. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos Agaricales e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 4, p. 363-371, 2006.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Vitamins B1 and B2 contents in cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, London, v. 106, n. 2, p. 816-819, 2008.

GREUTER, B.; RAST, D. Ultrastructure of the dormant *Agaricus bisporus* spore. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 53, p. 2096-2101, Nov. 1975.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2. ed. Nova York: J. Wiley, 1994. 458 p.

HEIN, I. Studies on the mycelium of *Psalliota campestris*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 17, n.3, p. 197-211, Mar. 1930.

HEINEMANN, P. Agaricaceae des regions intertropicales d'Amérique du Sud: Agarici Autroamericani VII. **Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique**, Meise, v. 62, p. 355-384, Sept. 1993.

KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 1, p. 12-24, Mar./Apr. 2005.

KERRIGAN, R. W. Inclusive and exclusive concepts of *Agaricus subrufescens* peck: a reply to Wasser et al. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Redding, v. 9, n. 1, p. 79-84, 2007.

KERRIGAN, R. W. **The genus *Agaricus* in coastal California**. 1982. 208p. Master's Thesis – San Francisco State University, San Francisco.

KERRIGAN, R. W.; ROSS, I. K. Dynamic aspects of basidiospore number in *Agaricus*. **Mycologia**, New York, v. 79, n. 2, p. 204-215, Apr./Mar. 1987.

LABORY, C. R. G.; DIAS, E. S.; DAVIDE, L. C.; SCHWAN, R. F.; WENZEL, I. M. Coloração de núcleos de esporos e hifas do cogumelo *Agaricus blazei*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 471-474, mar./abr. 2003.

LANGE, M. Species concepts in the genus *Coprinus*. **Dansk Botanisk Arkiv**, Kobenhavn, v. 14, n. 6, p. 1-140, 1952.

LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E. R.; FIGUEIREDO, N. de F.; GODINHO, P. da S.; ABRÃO, R. L. A particularidade de ser um fungo: I. Constituintes celulares. **Biotemas**, Florianópolis, v. 19, n. 2, p. 17-27, jun. 2006.

MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A.; ROBERSON, R. W. Ultrastructure of basidium and basidiospore development in three species of the fungus *Exobasidium*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n. 6, p. 1236-1244, 1987.

MIZUNO, T.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murril. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, 1990.

MUELLER, G. J.; MUELLER, G. M.; SHIH, L.; AMMIRATI, J. F. Cytological studies in *Laccaria* (Agaricales): (I) Meiosis and postmeiotic mitosis. **American Journal of Botany**, Ohio, v. 80, n. 3, p. 316-321, Mar. 1993.

NOVAES, M. R. C. G.; FORTES, R. C. Efeitos antitumorais de cogumelos comestíveis da família Agaricaceae. **Revista Nutrição Brasil**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 4, p. 207-217, jul./ago. 2005.

NOVAES, M. R. C. G.; NOVAES, L. C. G. Fármaco-nutrientes em cogumelos comestíveis Agaricales e outros basidiomicetos. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 181-7, jul./set. 2005.

OHNO, N.; FURUKAWA, M.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; MOTOI, M.; YADOMAE, T. Antitumor beta-glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 24, n. 7, p. 820-828, July 2001.

OLIVEIRA, E. C. M.; OLIVEIRA, E. R. de; LIMA, L. C. de O.; VILLAS BOAS, E. V. de B. Composição centesimal do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*). **Revista Universitária de Alfenas**, Alfenas, v. 5, p. 169-172, 1999.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Viena: R Foundation for Statistical Computing. 2004. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 20 nov. 2009

SAKSENA, K. N.; MARINO, R.; HALLER, M. N.; LEMKE, P. A. A. Study on development of *Agaricus bisporus* by fluorescent microscopy and scanning electron microscopy. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 126, n. 1, p. 417-428, Apr. 1976.

SOUZA, H. Q. de; AGUIAR, I. de J. A. Diversidade de Agaricales (Basidiomycota) na Reserva Biológica Walter Egler, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 1, p. 43-51, 2004.

TAKATS, S. Chromatin extrusion and DNA transfer during microsporogenesis. **Chromossoma**, Berlin, v. 10, p. 430-453, jan. 1959.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUTA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murrill and its mechanism of action. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n. 5, p. 1409-1413, May 2001.

TOMIZAWA, M. M.; DIAS, E. S.; ASSIS, L. J. de; GOMIDE, P. H. O.; SANTOS, J. B. dos. Genetic variability of mushroom isolates *Agaricus blazei* using markers RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1242-1249, jul./ago. 2007.

URBEN, A. F.; OLIVIERA, H. C. B.; VIEIRA, W.; CORREIA, M. J.; URIARTT, A. H. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília: Embrapa, 2001. 151 p.

URBEN, A. F.; URIARTT, A. H. **Curso de cultivo de *Lentinus edodes* (shiitake) com “Juo-Cao”**. Rio de Janeiro: Embrapa, 2002.

WALTHER, A.; WENDLAND, J. Septation and cytokinesis in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 40, n. 3, p. 187-196, Dec. 2003.

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. Is a widely cultivated culinary-medicinal mushroom indeed *Agaricus blazei* Murril? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Redding, v. 4, n. 4, p. 267-290, 2002.

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun Agaricus (Champignon do Brazil, or the Himematsutake mushroom) *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. indeed a synonym of *A. subrufescens* peck? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Redding, v. 7, n. 3, p. 507-511, 2005.

WASSER, S. P. Molecular identification of species of the genus *Agaricus*. Why should we look at morphology? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Redding, v. 9, n. 1, p. 85-88, 2007.

WESTERMANN, B.; PROKISCH, H. Mitochondrial dynamics in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 36, n. 2, p. 91-97, July 2002.

ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Data de coleta dos basidiocarpos e temperatura ambiental em Lavras, MG	43
TABELA 2A	Frequência de basídios bispóricos, trispóricos e tetraspóricos nos basidiocarpos coletados.....	44

TABELA 1A Data de coleta dos basidiocarpos e temperatura ambiental em Lavras, MG

Linagem	Data	T. °C Máxima	T. °C Média	T. °C Mínima
CS1 cog1	26/03/08	27,2	17,7	21,3
CS1 cog2	29/03/08	30,4	17,2	22,2
CS1 cog3	29/03/08	30,4	17,2	22,2
CS1 cog4	14/04/08	28,8	18,1	21,1
CS2 cog1	23/10/08	30,1	15,7	23
CS2 cog2	-	-	-	-
CS2 cog3	30/12/08	32	18,5	22,9
CS2 cog4	28/05/09	29,3	16,1	21,4
CS7 cog1	05/03/08	31,4	16,4	23,9
CS7 cog2	06/03/08	33	18	24,6
CS7 cog3	13/03/08	28,2	18,4	21,8
CS7 cog4	14/05/08	25,4	12	16,8
CS9 cog1	06/04/08	21,6	17,2	19,3
CS9 cog2	09/05/08	26,4	9,7	17,4
CS9 cog3	09/05/08	26,4	9,7	17,4
CS9 cog4	09/05/08	26,4	9,7	17,4
CS10 cog1	06/03/08	33	18	24,6
CS10 cog2	26/03/08	27,2	17,7	21,3
CS10 cog3	29/03/08	30,4	17,2	22,2
CS10 cog4	08/04/08	28,6	19,1	21,9

TABELA 2A Frequência de basídios bispóricos, trispóricos e tetraspóricos nos basidiocarpos coletados

Nº. de esporos por basídio	CS1 cog1	CS1 cog2	CS1 cog3	CS1 cog4
2 esporos/basídio	0,30%	0%	4,76%	0,51%
3 esporos/basídio	1,52%	9,75%	34,01%	2,31%
4 esporos/ basídio	98,18%	90,25%	61,23%	97,18%
Nº. de esporos por basídio	CS2 cog1	CS2 cog2	CS2 cog3	CS2 cog4
2 esporos/basídio	1,23%	28,46%	2,85%	18,30%
3 esporos/basídio	19,02%	61,79%	39,28%	54,25%
4 esporos/ basídio	79,75%	9,75%	57,87%	27,45%
Nº. de esporos por basídio	CS7 cog1	CS7 cog2	CS7 cog3	CS7 cog4
2 esporos/basídio	18,79%	56%	58,44%	7,27%
3 esporos/basídio	48,32%	41%	35,71%	50,86%
4 esporos/ basídio	32,89%	3%	5,85%	41,87%
Nº. de esporos por basídio	CS9 cog1	CS9 cog2	CS9 cog3	CS9 cog4
2 esporos/basídio	0,22%	0,39%	0,18%	0,47%
3 esporos/basídio	3,32%	9,75%	9,17%	11,45%
4 esporos/ basídio	96,46%	89,86%	90,65%	88,08%
Nº. de esporos por basídio	CS10 cog1	CS10 cog2	CS10 cog3	CS10 cog4
2 esporos/basídio	0,47%	0,23%	0,49%	0%
3 esporos/basídio	8,89%	5,37%	7,84%	4,09%
4 esporos/ basídio	90,64%	94,40%	91,67%	95,91%

ANEXO B		Página
FIGURA 1B	Temperatura ambiental em Lavras, MG, durante o período de desenvolvimento dos basidiocarpos.....	46

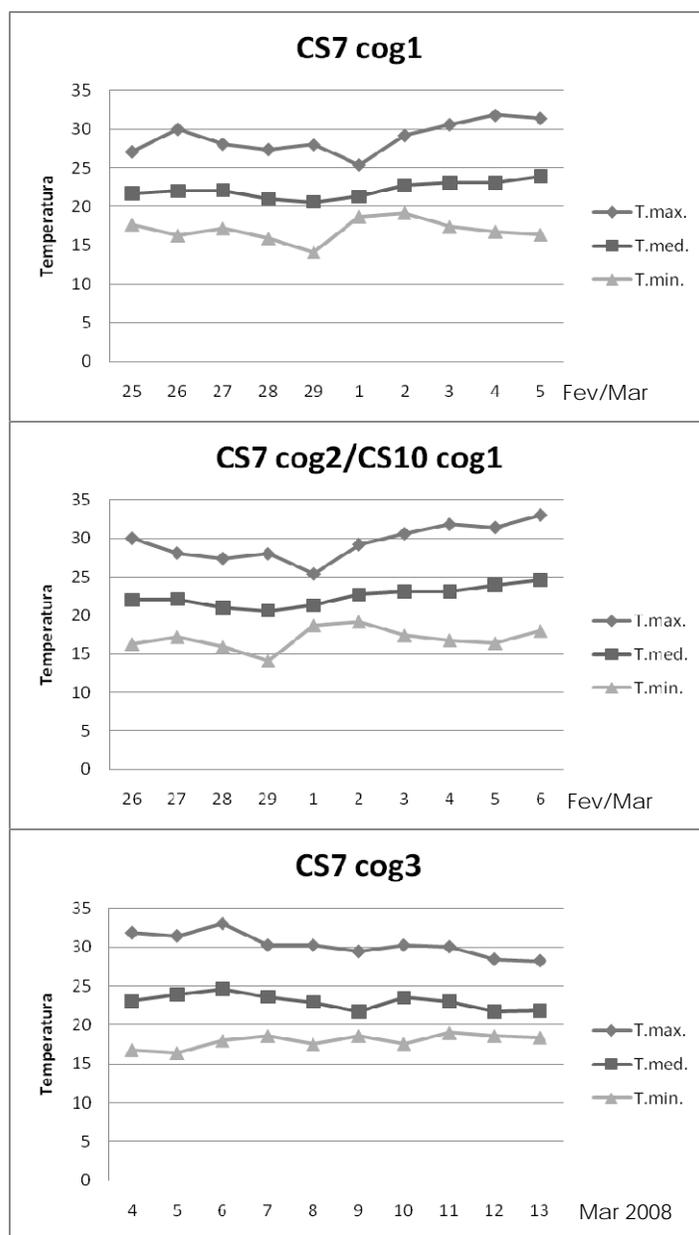


FIGURA 1B Temperatura ambiental em Lavras, MG, durante o período de desenvolvimento dos basidiocarpos (...Continua...)

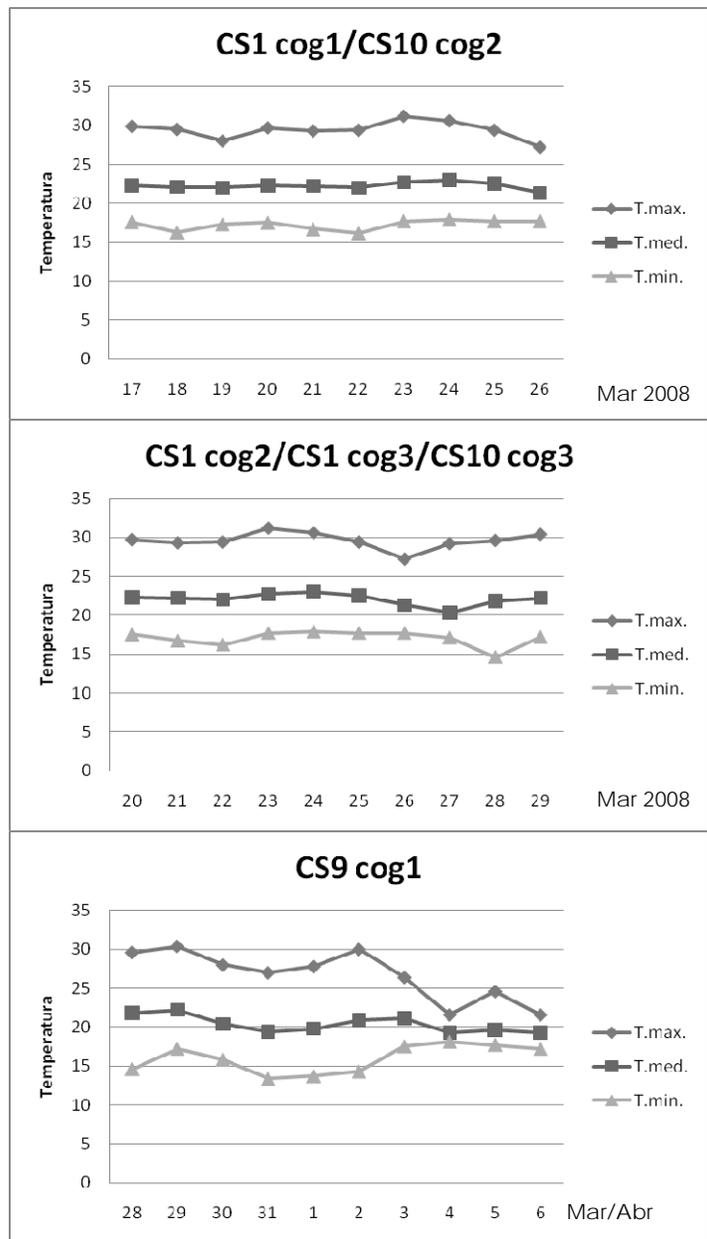


FIGURA 1B ...Cont...

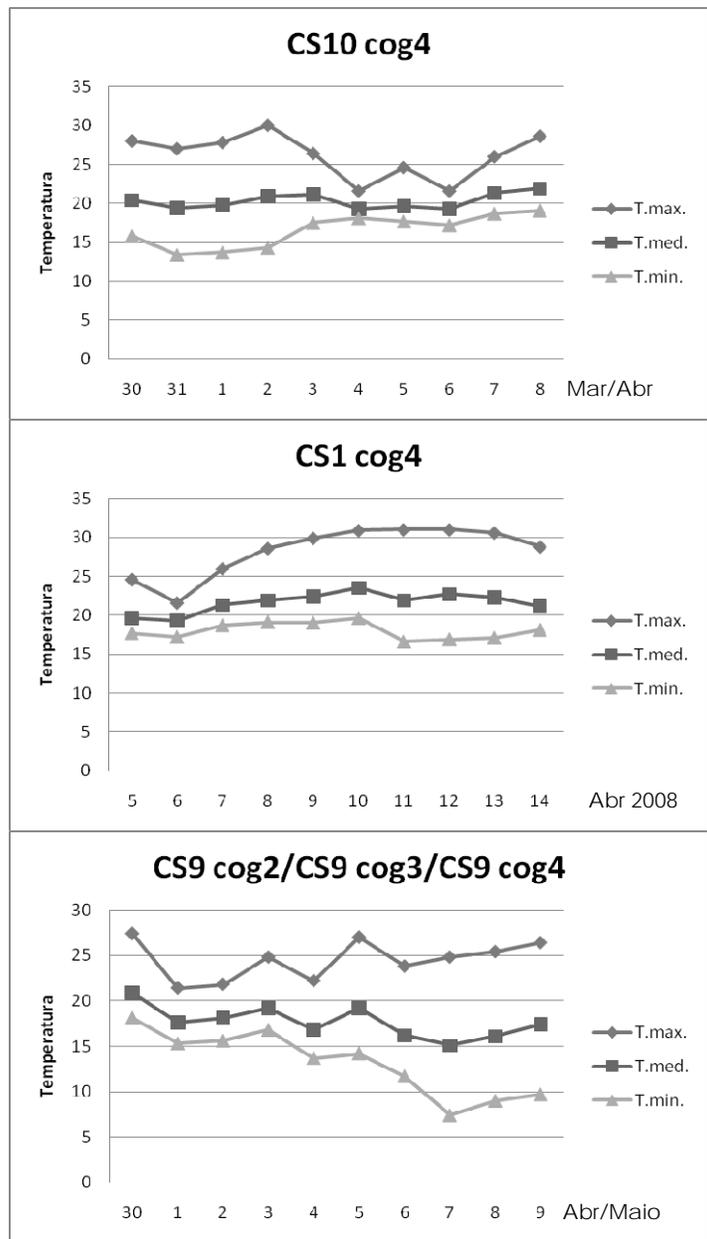


FIGURA 1B ...Cont...

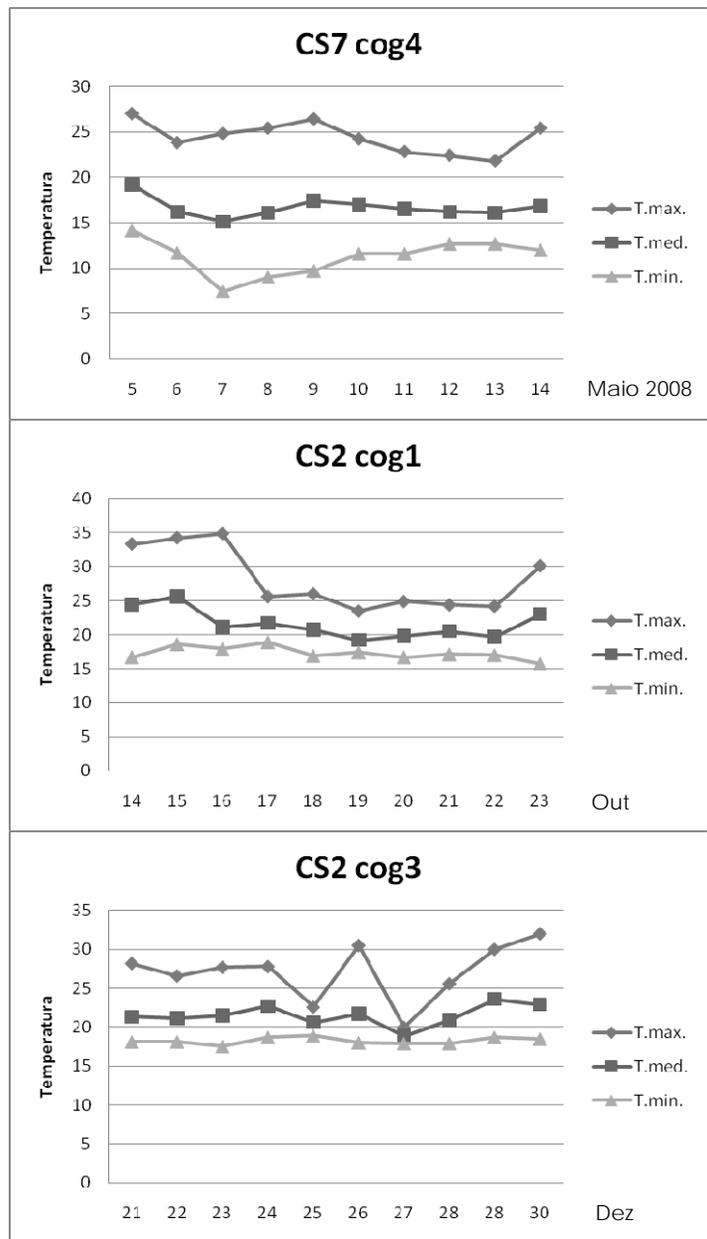


FIGURA 1B ...Cont...

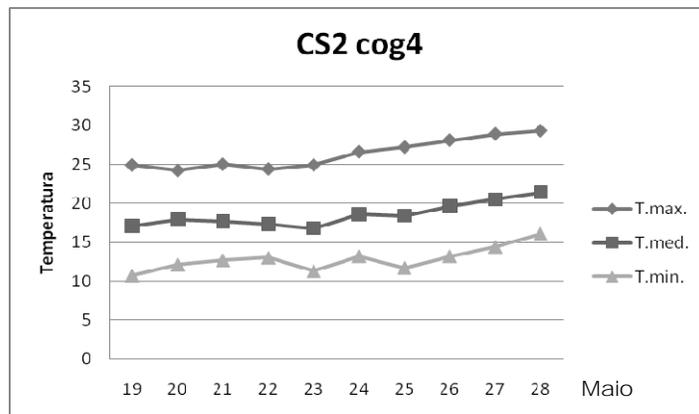


FIGURA 1B ...Cont...