



**CARLOS GODINHO DE ABREU**

***Agaricus subrufescens*: DO CULTIVO AO GENOMA**

**LAVRAS – MG  
2023**

**CARLOS GODINHO DE ABREU**

***Agaricus subrufescens*: DO CULTIVO AO GENOMA**

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola, para obtenção de título de Doutor

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias  
Orientador

Prof. Dr. Victor Satler Pylro  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Abreu, Carlos Godinho de.

*Agaricus subrufescens*: do cultivo ao genoma / Carlos Godinho  
de Abreu. - 2023.

114 p. : il.

Orientador(a): Eustáquio Souza Dias.

Coorientador(a): Victor Satler Pylro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. *Agaricus subrufescens*. 2. *Bacillus*. 3. Sequenciamento  
híbrido de DNA. 4. Genoma completo. I. Dias, Eustáquio Souza. II.  
Pylro, Victor Satler. III. Título.

**CARLOS GODINHO DE ABREU**

***Agaricus subrufescens*: DO CULTIVO AO GENOMA**  
***Agaricus subrufescens*: FROM CULTIVATION TO GENOME**

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola, para obtenção de título de Doutor

Aprovada em 25 de outubro de 2023

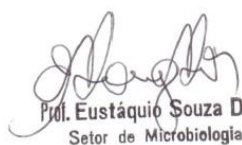
Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani - UNESP (FCAV) - Campus Jaboticabal

Dr. Daniel Kumazaua Morais - UiT – The Arctic University of Norway

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias - UFLA – Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. Gilvan Ferreira da Silva - EMBRAPA Amazônia Ocidental

Dra. Saura Rodrigues Silva - UNESP (FCAV) - Campus Jaboticabal



Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias  
Setor de Microbiologia  
DBI / UFLA

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias  
Orientador

Prof. Dr. Victor Satler Pylro  
Coorientador

**LAVRAS – MG**  
**2023**

*À Deus,  
À minha mãe Manoelina e meu Pai Francisco (in memorian),  
A todos os envolvidos na conclusão desse trabalho,*

***Dedico***

## AGRADECIMENTOS

Hoje sem dúvidas, estou vivenciando a realização de um dos meus maiores sonhos: a conclusão do meu título de Doutor. Sou extremamente privilegiado por ter minha família, meus amigos e parentes, os quais estiveram comigo nessa caminhada e que, sem eles, nada disso seria possível.

À Deus, meu Pai e Senhor, a quem eu honrarei até o fim dos meus dias, por estar comigo em cada momento, em cada luta e em cada vitória. Sei que Ele acreditava em mim quando eu mesmo não acreditava. Nos meus dias mais difíceis em que eu pensava em desistir, Ele foi o meu abrigo e torre forte, e me sustentou com sua forte destra.

Aos meus pais Manoelina Faustino e Francisco Tomaz de Abreu (*in memoriam*), pela educação que me deram, onde mesmo com tantas dificuldades, nunca deixaram de acreditar que esse momento chegaria: MÃE você foi quem me fez chegar até aqui, e é a pessoa a quem eu devo honrar por todos os meus dias. À minha irmã Patrícia e meus sobrinhos lindos, por serem meu exemplo de vida e pelo amor infindo. Obrigado por tudo!

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo acolhimento e oportunidade oferecida, e ao PPGMA - UFLA (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola) estendendo-se a todos os professores e funcionários.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG). Nosso muito obrigado pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

Ao Professor Eustáquio Souza Dias pelo profissionalismo, ética, boa vontade, disponibilidade, serenidade e pelos inestimáveis conhecimentos transmitidos e orientação por esses longos 10 anos. Obrigado pelo acolhimento e por ter me incentivado na pesquisa desde o começo da minha graduação. Devo tudo o que sei, a você.

Ao Professor e coorientador Dr. Victor Satler Pylro por também acreditar em mim. Obrigado por me guiar e me auxiliar nas pesquisas sem medir esforço algum. Obrigado por me mostrar esse mundo maravilhoso chamado genômica. Tenho um prazer imenso de estar na sua equipe!

Ao Professor Dr. Alessandro de Mello Varani por acreditar na minha capacidade, por sua boa vontade, disponibilidade, mesmo sem me conhecer e por me ajudar em todas as análises. Obrigado pela oportunidade em desenvolver esse projeto. Este trabalho não seria possível sem você professor!

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Cogumelos Comestíveis: Anna, Marília, Akiiany, Elisângela, Lívia, Tatiana, Joice, Cibelli, Danilo, Luz e Milene, por toda ajuda e todo companheirismo. Obrigada pelos momentos de risadas, descontração e por me ajudarem quando precisei. Sou muito feliz por ter convivido com vocês!

Em especial agradeço às minhas duas melhores amigas: Anna e Marília que me acompanharam de perto durante todo esse processo e foram meu porto seguro, choraram

comigo, se alegraram comigo e me apoiaram em todos os momentos. Vocês são a amizade que desejo carregar pelo resto da minha vida. Sem vocês eu não suportaria as pressões que resisti. Vocês foram meu alívio. Amo vocês.

À querida amiga Dra. Luciana Ribeiro que me sustentou por todo esse período, por toda paciência, amizade, boa vontade e competência. Os melhores cafés eu tomei com você amiga. Serei eternamente grato a você sempre! Você é incrível!

Aos queridos convidados da banca, Dr, Gilvan Ferreira da Silva, Dra. Saura Rodrigues Silva e Dr. Daniel Kumazawa Moraes, por todo auxílio, disposição e por todo conhecimento e amizade.

À querida Elisângela, por toda boa vontade em me ajudar. Nunca me esquecerei da disponibilidade, da grande amizade gerada, além das altas risadas nos intervalos. Sempre me lembrarei de você!

Pelas inúmeras vezes que todos vocês enxergaram em mim algo melhor do que realmente eu sou.

Gratidão!

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”*

***Albert Einstein***

*“Success consists of going from failure to failure without loss of enthusiasm.”*

***Winston Churchill***



## RESUMO

*Agaricus subrufescens* é um cogumelo nativo do Brasil, que apresenta considerável valor nutritivo e medicinal. O cultivo em escala comercial no Brasil necessita de desenvolvimento de tecnologias apropriadas, as quais são de grande valia e utilidade em países em desenvolvimento para pequenos produtores de cogumelos. Um dos objetivos deste trabalho foi promover maior seletividade do substrato de cultivo adicionado de bactérias do gênero *Bacillus*, e analisar a produtividade e eficiência biológica do cogumelo *Agaricus subrufescens* ABL 04/49. Os resultados mostraram que os aditivos microbiológicos adicionados ao 8º dia de compostagem, podem ser usados como uma alternativa, sem a fase de condicionamento, no cultivo de *A. subrufescens* para acelerar a maturação do composto, diminuir o tempo de compostagem, aumentar a produtividade e produzir composto de cogumelos em pequena escala por pequenos produtores de cogumelos. Sabe-se que cogumelo do sol apresenta tempo de vida útil curto, e os cogumelos escurecem rapidamente (processo conhecido como *browning*), gerando perdas pós-colheita caso não forem desidratados rapidamente, tornando-o bastante restrito a mercados de consumo em forma de cápsulas, que apresentam preços elevados. Desta forma, a mudança deste quadro está no aumento da potencialidade de consumo desse cogumelo *in-natura* como alimento, e por esta razão destaca-se a importância de ter seu genoma sequenciado e estudado, com a finalidade de revelar possíveis novas alternativas a serem empregadas em seu cultivo, a fim de se evitar ou retardar o processo de *browning*. O sequenciamento do genoma de *A. subrufescens* ABL04/49 foi executado utilizando estratégia híbrida, combinando-se leituras curtas obtidas por *Illumina* (*short-reads*) e leituras maiores obtidas pela tecnologia *GridION* (*long-reads*). O genoma de *A. subrufescens* linhagem ABL 04/49, obtido nesse trabalho, contém 13 cromossomos e mais 31 scaffolds livres, totalizando 44,5Mb, apresentando completude BUSCO de (96,5%), conteúdo GC de 47,24 % e 1.48% de heterozigosidade. Um total de 14.332 genes codificadores de proteínas foram identificados, sendo que 64.6% (27.875.936 bp) do genoma está coberto por genes e 23,41% corresponde a elementos transponíveis, representando um total de 9.793.453 pb. O mitogenoma foi completamente montado e circularizado, resultando em 131.367 kbp e codificando 14 genes. A anotação foi melhorada utilizando dados públicos de RNAseq provenientes da linhagem JSR3 de *Agaricus subrufescens* provenientes de diferentes estágios de desenvolvimento (micélio, corpo de frutificação e primórdio) disponíveis no GenBank. Um total de 4 PPO (polifenolxidasas) foram identificadas em *A. subrufescens* ABL04/49 e se encontram distribuídas principalmente no cromossomo VII (3 cópias) e no cromossomo IX (1 cópia). O locus Mating-type (*MAT*) foi elucidado e se encontra localizado no cromossomo 1 mostrando os genes *mip* e  $\beta$ -*fg* os quais flanqueiam os fatores de transcrição do homeodomínio (HD) envolvidos no acasalamento. As análises filogenômicas colocaram corretamente *A. subrufescens* situado no clado de *Agaricomycetes*. Todos os resultados obtidos, foram resumidos e disponibilizados através de Genome Browser disponibilizados em um link, sendo ferramenta útil para apoiar outros estudos genômicos em fungos. Este estudo apresenta o primeiro rascunho do genoma da espécie de Cogumelo do Sol *Agaricus subrufescens* linhagem ABL 04/49, fornecendo um valioso recurso genômico que poderá ser empregado para o melhoramento desta importante espécie.

**Palavras-chave:** *Agaricus subrufescens*, *Bacillus*, basidiomicetos, sequenciamento híbrido de DNA, genoma completo.

## ABSTRACT

*Agaricus subrufescens* is a mushroom native to Brazil, which has specific nutritional and medicinal value. The cultivation on a commercial scale in Brazil requires the development of related technologies, which are of great value and usefulness in developing countries for small mushroom producers. One of the objectives of this work was to promote greater selectivity of the cultivation substrate added with bacteria of the genus *Bacillus*, and to analyze the productivity and biological efficiency of the mushroom *Agaricus subrufescens* ABL 04/49. The results showed that microbiological additives increased on the 8th day of composting, can be used as an alternative, without the conditioning phase, in the cultivation of *A. subrufescens* to accelerate the maturation of the compost, reduce composting time, increase productivity and produced mushroom compost on a small scale by small mushroom producers. It is known that the sun mushroom has a short shelf life, and the mushrooms darken quickly (a process known as browning), generating post-harvest losses if they are not dehydrated quickly, making it quite restricted to consumer markets in the form of capsules, which present high prices. In this way, the change in this picture is the increase in the consumption potential of this mushroom in natura as food, and for this reason, the importance of having its genome sequenced and studied is highlighted, with the purpose of revealing possible new alternatives to be used in its cultivation, in order to avoid or delay the browning process. The genome sequencing of *A. subrufescens* ABL 04/49 was developed using a hybrid strategy, combining short readings obtained by Illumina (short-reads) and longer readings obtained by GridION technology (long-reads). The genome of *A. subrufescens* lineage ABL 04/49, results in this work, contains 13 chromosomes and 31 unplaced scaffolds, totaling 44.5Mb, showing BUSCO completeness (96.5%), GC content of 47.24% and 1.48% heterozygosity. A total of 14,332 protein coding genes were identified, with 64.6% (27,875,936 bp) of the genome covered by genes and 23.41% corresponding to transposable elements, representing a total of 9,793,453 bp. The mitogenome was completely assembled and circularized, resulting in 131,367 kbp and encoding 14 genes. The annotation was improved using public RNAseq data from the JSR3 strain of *Agaricus subrufescens* from different developmental stages (mycelium, fruiting body, and primordium) available on GenBank. A total of 4 PPO (polyphenoloxidases) were identified in *A. subrufescens* ABL49 and are distributed mainly on chromosome VII (3 copies) and chromosome IX (1 copy). The Mating-type (MAT) locus has been elucidated and is located on chromosome 1 showing the *mip* and  $\beta$ -*fg* genes which flank the homeodomain (HD) transcription factors involved in mating. The phylogenomic analyzes correctly placed *A. subrufescens* in the *Agaricomycetes* clade. All results obtained were summarized and made available through the Genome Browser available in a link, being a useful tool to support other genomic studies in fungi. This study presents the first draft of the genome of the Mushroom of the Sun species *Agaricus subrufescens* lineage ABL04/49, providing an important genomic resource that can be used for the improvement of this important species.

**Keywords:** *Agaricus subrufescens*, *Bacillus*, basidiomycetes, hybrid DNA sequencing, chromosome-scale genome assembly

**PRIMEIRA PARTE**  
**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> - Fotografias da espécie <i>Agaricus subrufescens</i> linhagem ABL 04/49.....	20
<b>Figura 2</b> - Zonas de uma pilha de compostagem de <i>Agaricus</i> sp.....	25
<b>Figura 3</b> - Resumo em imagens do processo de produção de cogumelos <i>A.subrufescens</i> ABL 04/49 desde a compostagem dos materiais para o substrato e adição da camada de cobertura até a produção dos basidiocarpos.....	27
<b>Figura 4</b> - Produção de cogumelos comestíveis em todo o mundo.....	31
<b>Figura 5</b> - Imagens de alterações na aparência (escurecimento) do cogumelo <i>A. bisporus</i> durante o armazenamento a 20°C por 96 horas. B – Base do estipe; C: Base do píleo.....	33
<b>Figura 6</b> - Imagens de alterações na aparência (escurecimento) do cogumelo <i>A. bisporus</i> durante o armazenamento a 6°C por 16 dias. B – Base do estipe; C: Base do píleo.....	33
<b>Figura 7</b> - Reações catalisadas pela PPO e formação de compostos escuros (melaninas).....	35
<b>Figura 8</b> - Princípio do sequenciamento OXFORD Nanopore (MinION).....	39
<b>Figura 9</b> - Ilustração esquemática da tecnologia SBS da <i>Illumina</i> .....	40
<b>Figura 10</b> - Fluxo de trabalho da plataforma <i>Illumina</i> : Preparação da amostra, geração de agrupamentos e sequenciamento por síntese.....	40
<b>Figura 11</b> - Ortologia e evolução do gene agaricomíceto.....	46

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Produção e porcentagem estimada de cogumelos comestíveis no Brasil.....	31
<b>Tabela 2</b> - Comparação de tamanho médio de genomas e conteúdo GC (%) de 15 espécies pertencentes a Basidiomicetos que tiveram os genomas sequenciados e publicados nos últimos 12 anos.....	43

## SEGUNDA PARTE

### LISTA DE FIGURAS – ARTIGO 01

- Figura 1** - Etapas do processo de produção de cogumelos *A.subrufescens* ABL 04/49 desde a compostagem , até a produção dos cogumelos.....65
- Figura 2** - Aspectos morfológicos da cultura de *Agaricus subrufescens* linhagem ABL 04/49 em placa e dos basidiomas produzidos.....68
- Figura 3** - Evolução da temperatura em todo o processo de compostagem durante os 28 dias.....69

### LISTA DE TABELAS – ARTIGO 01

- Tabela 1** - Valores médios de produtividade e eficiência biológica, tempo para o primeiro fluxo, número de cogumelos colhidos, MMC (massa média de cogumelos), da linhagem de *A. subrufescens* ABL 04/49 em diferentes tempos de compostagem adicionada de *Bacillus megaterium* (CCMA1246) e *Bacillus cereus* (CCMA 1235).....71

## LISTA DE FIGURAS – ARTIGO 02

- Figure 1** - Analysis of the *A. subrufescens* strain ABL 04/49 genome using the GenomeScope and KAT (k-mer spectra) tools. **(A)** The GenomeScope analysis reveals a heterozygosity rate of 1.48% in the genome, with an estimated size of 42 Mb. **(B)** The k-mer spectra analysis confirms the presence of heterozygosity and duplications within the genome.....86
- Figure 2** - Gene Ontology (GO) annotation showing the genes with the 20 highest GO counts (GO level 3) for biological processes, cellular components, and molecular functions in *A. subrufescens* ABL 04/49. **BP**: Biological Process, **MF**: Molecular Function, **CC**: Cellular Component.....89
- Figure 3** - **(A)** Distribution of each class of enzymes among genes that have an Enzyme Commission Number (EC number) in the genome of *A. subrufescens* ABL 04/49. **(B)** Distribution of CAZymes in the genome of *A. subrufescens* ABL 04/49.....90
- Figure 04** - **(A and B)** Macrosyntenic scale analysis between chromosomes of *A. bisporus* KMC00540 and *A. bisporus* var. *bisporus* H97 in comparison to the chromosomes of *A. subrufescens* ABL 04/49. The 13 chromosomes of *A. bisporus* strains are represented by coloured blocks on the right, and the 13 chromosomes of *A. subrufescens* strain ABL 04/49 are represented by blocks of the same colours on the left. **(C and D)** Microsyntenic scale analysis of the Polyphenol oxidase encoding genes locus in *A. subrufescens* ABL 04/49. **(E)** Mating-type (MAT) locus located on chromosome 1 showing the *mip* and  $\beta$ -*fg* genes flanking the homeodomain (HD) transcription factors involved in mating.....95
- Figure 05** - Gene families shared among *A. bisporus* H97, *Saccharomyces cerevisiae*, and *A. subrufescens* ABL04/49.....97
- Figure 06** - Phylogenomic tree based on the complete genomes of various edible basidiomycete mushrooms, highlighting the phylogenetic position of *A. subrufescens* ABL04/49 relative to others and % BUSCO values.....98
- Figure 07** - **(A)** Schematic representation illustrating the comparisons between *A. subrufescens* and *A. bisporus* mitogenomes. Plasmid-derived and hypothetical sequences are depicted as gray, black, and white arrows, while mitochondrial genes are represented as colored arrows. tRNAs are displayed as small bars. Variations in the tRNA loci are highlighted. The two large inverted repeats in *A. bisporus* are shown as smaller black arrows. **(B)** Linear representation of discontinuous mega BLAST comparisons between both mtDNA sequences. **(C)** Bar plot showing the introns types identified in *A. subrufescens* and *A. bisporus* mitogenomes. **(D)** Positional tRNA comparisons between the two *Agaricus* mitogenomes.....103
- Figure S1** - Distribution of each class of enzymes among genes that have an Enzyme Commission Number (EC number) in the genome of *A. subrufescens* ABL 04/49.....105

## LISTA DE TABELAS – ARTIGO 02

<b>Table 1</b> - <i>A. subrufescens</i> strain ABL 04/49 genome primary assembly (hybrid assembly) stats.....	85
<b>Table 2</b> - General characteristics of the <i>A. subrufescens</i> ABL 04/49 genome.....	87
<b>Table 3</b> - Number and size of chromosomes, genes and transposable elements identified in the <i>A. subrufescens</i> ABL 04/49 genome.....	87
<b>Table 4</b> - Distribution of different classes and lineages of transposable elements in the genome of <i>A. subrufescens</i> ABL 04/49.....	87
<b>Table 5</b> - Secondary metabolites identified with the FungiSMASH tool in <i>A. subrufescens</i> ABL 04/49.....	91
<b>Table 6</b> - Mitochondrial genes identified in <i>Agaricus subrufescens</i> ABL 04/49 mitogenome and comparasions against <i>A. bisporus</i> H97.....	100
<b>Table S1</b> - Comparison of <i>A. subrufescens</i> Genetic Linkage Map and ABL 04/49 Chromosome Level Assembly.....	109
<b>Table S2</b> - Summary of Carbohydrate-Active Enzymes (CAZymes) and Lignin-Degrading Genes Identified in <i>A. subrufescens</i> ABL 04/49 genome.....	106

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>19</b>
2.1 <i>Agaricus subrufescens</i> Peck (origem e identificação) .....	19
2.2 Características nutricionais e medicinais .....	20
2.3 Técnicas de cultivo de <i>Agaricus subrufescens</i> .....	22
2.3.1 Compostagem (Fase I) .....	23
2.3.2 Pasteurização e condicionamento (Fase II) .....	25
2.3.3 Inoculação e incubação (Fase III) .....	26
2.3.4 Camada de cobertura (Fase IV) .....	26
2.3.5 Produção e colheita dos cogumelos (Fase V) .....	27
2.3.6 Microbiota da compostagem .....	28
2.4 Diversidade e seleção de linhagens com características desejáveis .....	29
2.5 Mercado e potencialidades .....	29
2.6 Tempo de vida útil pós-colheita do cogumelo <i>Agaricus subrufescens</i> .....	32
2.7 Escurecimento enzimático dos cogumelos .....	34
2.8 Sequenciamento genômico de fungos .....	36
2.8.1 Mitogenomas e transposons em fungos .....	43
2.9 Sequenciamento genômico no gênero <i>Agaricus</i> .....	45
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS .....</b>	<b>59</b>
<b>ARTIGO 01 - UTILIZAÇÃO DE ADITIVOS BACTERIANOS DURANTE O PROCESSO DE COMPOSTAGEM PARA OBTENÇÃO DO SUBSTRATO DE CULTIVO DO COGUMELO <i>Agaricus subrufescens</i> ABL 04/49 .....</b>	<b>60</b>

**ARTIGO 02 - DECODING THE CHROMOSOME-SCALE  
GENOME OF THE NUTRIENT-RICH *Agaricus subrufescens*: A  
RESOURCE FOR FUNGAL BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**

..... 76



## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

O cogumelo *Agaricus subrufescens* tem ocorrência descrita em vários continentes, mas foi descrito no Brasil, na década de 1960. A princípio este cogumelo foi classificado como *Agaricus blazei*, sendo considerado um cogumelo nativo exclusivamente do Brasil. Posteriormente, alguns autores propuseram que a espécie cultivada no Brasil não era, de fato, *A. blazei*, mas uma nova espécie, sendo assim, renomeada como *A. brasiliensis*. À medida que os estudos foram avançando, em especial, sobre a diversidade genética das diferentes linhagens utilizadas no mundo, descobriu-se que, na verdade, este cogumelo já foi cultivado nos Estados Unidos no século XIX, porém, com outro nome científico, *A. subrufescens*. Houve algumas controvérsias acerca do nome correto deste cogumelo, de modo que a literatura não é unânime acerca do seu nome científico. Considerando as normas taxonômicas, *A. subrufescens* precedeu *A. brasiliensis*, de modo que o primeiro nome deve ser adotado. Além disso, *A. brasiliensis* seria um nome ilegítimo, uma vez que outra espécie de cogumelo já foi classificada com este nome. Em função disso, qualquer um dos três nomes pode ser encontrado, sendo, às vezes, apresentados como sinônimos (*Agaricus subrufescens* Peck (= *A. blazei* Murril *sensu* Heinemann, ou *A. brasiliensis* Wasser). Além do nome científico, o cogumelo é conhecido por diversos nomes populares como Royal Sun *Agaricus*, ABM (por *A. blazei* Murril [*sensu* Heinemann]) Cogumelo do Sol, no Brasil; Himematsutake, no Japão, Jisongrong ou Baximogu, na China (WISITRASSAMEEWONG *et al.*, 2012).

É uma espécie encontrada principalmente em clima subtropical úmido, com temperaturas entre 25 e 30 °C (ZHAO *et al.*, 2011). O fato deste cogumelo crescer naturalmente nesse tipo de ambiente, torna o seu cultivo mais fácil em várias regiões do Brasil em condições naturais, sem a necessidade de ambientes refrigerados. Este aspecto é uma das grandes vantagens do cultivo do cogumelo do sol pelo pequeno produtor brasileiro: ao contrário do cultivo do cogumelo champignon “*Agaricus bisporus*”, o qual requer ambiente com temperatura abaixo de 20°C para a sua frutificação.

De modo geral, fungos do gênero *Agaricus* são decompositores secundários, o que significa que se desenvolvem bem em substratos que foram previamente submetidos à ação de outros microrganismos e são adotadas metodologias semelhantes tanto no cultivo de *A. bisporus* quanto para *A. subrufescens*. As principais metodologias relacionadas ao cultivo convencional são: compostagem (Fase I); pasteurização e condicionamento do substrato (Fase

II); inoculação e incubação (Fase III); cobertura do substrato colonizado com a camada de cobertura (Fase IV), produção dos cogumelos e colheita (Fase V) (EIRA, 2003). É de extrema importância à utilização e estudo de uma infinidade de resíduos agrícolas neste processo de produção do composto de cultivo, uma vez que os fungos apresentam aparatos enzimáticos capazes de quebrar compostos complexos como celulose, hemicelulose e lignina, em compostos mais simples e melhor assimiláveis.

Cogumelos da espécie *Agaricus subrufescens* apresentam elevada umidade e são altamente perecíveis, escurecendo rapidamente durante o processamento e o posterior armazenamento, portanto são amplamente utilizados na maioria das vezes na forma desidratada.

Quando estão “in natura” são dificilmente comercializados pelo curto “tempo de vida útil”, de modo que há uma necessidade de processá-los (desidratados ou conserva). O escurecimento pós-colheita é um fenômeno comum, principalmente em cogumelos do gênero *Agaricus*, que pode reduzir drasticamente seu valor comercial. As reações de escurecimento são desencadeadas pelo manuseio brusco, pela senescência do corpo da frutificação e por infecção bacteriana. Desta forma, os basidiocarpos dessa espécie passam por processo de escurecimento semelhante ao observado no “champignon” após a lavagem, o qual é intensificado durante a desidratação dos mesmos. Este processo de escurecimento é extremamente prejudicial na comercialização, pois determina a obtenção de um produto final fora dos padrões exigidos pelo mercado.

Considerando que um dos parâmetros para a definição do preço é a cor do cogumelo e sua aparência, um genoma de referência de alta qualidade de *A. subrufescens* em busca de genes responsáveis pela produção de enzimas como a polifenoloxidase e compostos fenólicos, além do uso de ferramentas e técnicas de edição de genomas e da biologia molecular, se tornam fundamentais para eliminar ou amenizar o processo de escurecimento em cogumelos possibilitarão estudos futuros como análise de vias biossintéticas (genes da  $\beta$ -glucanase sintase e genes produtores de metabólitos secundários) ou até mesmo comparar vias entre *A. bisporus* e *A. subrufescens*.

O sequenciamento e análise de genomas em fungos bem como o desenvolvimento de ferramentas da bioinformática, têm proporcionado esclarecimentos relevantes quanto à produção de diversas substâncias bioativas e vias metabólicas (BRANDENBURGER *et al.*, 2018).

Recentemente diversos estudos relataram montagens completas de alta qualidade e bem sucedidas de genomas de fungos basidiomicetos produtores de cogumelos como

*Schizophyllum commune* (OHM, *et al.*, 2010), *Ganoderma lucidum* (CHEN *et al.*, 2012), *Agaricus bisporus* (MORIN *et al.*, 2012), *Volvariella volvacea* (BAO *et al.*, 2013), *Flammulina velutipes* (PARK *et al.*, 2014), *Lentinula edodes* (CHEN, *et al.*, 2016), *Sparassis crispa* (Hanabiratake) (KIYAMA *et al.*, 2018), *Auricularia heimuer* (YUAN *et al.*, 2019), *Hericium erinaceus* (GONG *et al.*, 2020), *Russula griseocarnosa* (YU *et al.*, 2020), *Pleurotus ostreatus* (LEE *et al.*, 2021) e *Phlebopus portentosus* (WAN, *et al.*, 2021).

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado inicialmente com o objetivo de elucidar o genoma completo de alta qualidade deste fungo para, num futuro próximo, conseguirmos obter linhagens que apresentem maior tempo de vida útil para o mercado brasileiro.

## JUSTIFICATIVA

*Agaricus subrufescens* é um cogumelo nativo do Brasil e apresenta considerável valor nutritivo e medicinal. Seu tempo de vida útil é curto (pois os cogumelos escurecem rapidamente e produtores têm perdas enormes pós-colheita se não os secar rapidamente) e o apelo por seus benefícios medicinais já foram muito explorados. Isso o torna bastante restrito a mercados de cápsulas com preços elevados. Desta forma, a mudança deste quadro está no aumento da potencialidade de consumo desse cogumelo in-natura como alimento. Para isso o conhecimento do genoma completo de alta qualidade de *A.subrufescens* e genes responsáveis pela produção da enzima polifenoloxidase (responsável pelo escurecimento do cogumelo) poderá favorecer a obtenção de linhagens com maior tempo de vida útil, além de facilitar a compreensão de vias biossintéticas. A mineração genômica voltada para caracterização de metabólitos secundários permitirá identificar BGCs (*biosynthetic gene clusters*) relacionados a biossíntese de compostos bioativos. Ao nosso conhecimento este é o primeiro genoma de *A. subrufescens* obtido e os dados genômicos deste trabalho permitirão desenvolver novas linhagens por meio edição e compreender os mecanismos relacionados ao potencial nutricional e bioativo da espécie.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Agaricus subrufescens* Peck (origem e identificação)

Em São Paulo, município de Piedade no ano de 1960, constatou-se pelo japonês Takatoshi Furamoto, uma espécie de cogumelo com características únicas e distintas. Amostras deste fungo foram enviadas ao Japão, em 1965 para análises no Institute Iwaide. Posteriormente em 1967, o Dr. Heinemann, cientista belga, identificou este fungo e o descreveu como *Agaricus blazei* Murill, espécie encontrada na América do Norte, já descrita anteriormente por W.A Murill, em 1945. Os pesquisadores Wasser *et al.*, (2002), em estudo morfológico comparativo, propuseram então para essa espécie nativa do Brasil uma classificação nova denominando-o de *Agaricus brasiliensis* (WASSER *et al.*, 2002; COLAUTO *et al.*, 2012). Entretanto, a classificação taxonômica foi contestada por Kerrigan (2004), sugerindo o nome *A. subrufescens* Peck. Assim *A. brasiliensis* e *A. subrufescens* são considerados como mesma espécie (COLAUTO *et al.*, 2010). Porém convencionou-se que *A. subrufescens* Peck seria utilizado para identificar a espécie brasileira, pois pesquisas analisando a taxonomia e composição molecular comprovou a similaridade com a espécie que foi descrita inicialmente por Charles Horton Peck, em Nova Iorque em 1893. Desta forma, segundo Kerrigan, (2005), *A. subrufescens* é um cogumelo brasileiro com propriedades medicinais e terapêuticas.

*A. subrufescens* Peck pertence ao reino *Fungi*, filo *Basidiomycota*, subfilo *Agaricomycotina*, classe *Agaricomycetes*, subclasse *Agaricomycetidae*, ordem *Agaricales* e família *Agaricaceae* (MYCOBANK, 2016).

A espécie exige ambientes de clima subtropical úmido e temperaturas que estejam entre 25 e 30°C (ZHAO *et al.*, 2011), é fungo decompositor secundário, e seu cultivo se dá em compostos com diversos resíduos agrícolas, semelhantemente ao *A.bisporus* (LLARENA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Quanto à morfologia dos basidiomas, o cogumelo *A. subrufescens* é variável, devido a influências ambientais e ao genótipo, possui um píleo semiglobuloso, que varia de 20 a 70 mm, em fase de botão e de 60 a 150 mm, em fase madura, de cor marrom-clara a creme, e possui na parte superior pequenas escamas brancas, sua cor fica entre roxo, marrom, marrom alaranjada a completamente branco. O estipe estreita-se na junção com o píleo (4-13 cm de

comprimento por 1-3 cm de diâmetro), com espessura constante ou base bulbosa de coloração esbranquiçada (ZIED, 2011; WISITRASSAMEEWONG *et al.*, 2012).

**Figura 1** – Fotografias da espécie *Agaricus subrufescens* linhagem ABL 04/49



Legenda: (A) ABL 04/49 em crescimento micelial em placa de petri, meio Ágar Composto. (B) Basidiocarpos de ABL 04/49 em frutificação. (C) Basidiocarp de ABL 04/49 pós-colheita. (D) Corte longitudinal de um basidiocarp de ABL 04/49.

Fonte: Do autor (2023).

## 2.2 Características nutricionais e medicinais

*Agaricus subrufescens*, como relatado anteriormente, é um cogumelo nativo, originário do Brasil, tradicionalmente conhecido como “cogumelo do sol”. Ele também é conhecido como cogumelo medicinal, ou no exterior como *Royal Sun Agaricus*, ou *Almond Portobelo* (WISITRASSAMEEWONG *et al.*, 2012). Em diversos países, segundo os autores, o cogumelo pode ser consumido, tanto como um cogumelo comestível quanto utilizado em tratamentos terapêuticos, extremamente utilizado em prevenção e tratamento de cânceres diversos. Aterosclerose, hepatite, hiperlipidemia, diabetes, algumas dermatites e câncer, doenças cardíacas, são doenças comuns tratadas tradicionalmente com a utilização do cogumelo *A. subrufescens*, além de ser rico em diversos antioxidantes e os pesquisadores ainda sugerem que tais ações podem ser atribuídas a componentes específicos destes fungos, destacando-se as glucanas, o ergosterol, as lectinas e alguns aminoácidos imunomoduladores

como a arginina e a glutamina. (AYEKA 2018; SOUZA *et al.*, 2017; VENKATESH, *et al.*, 2018).

O corpo de frutificação de *A. subrufescens* apresenta altos níveis de minerais valiosos, tais como potássio, fósforo, cálcio, magnésio e zinco. O estipe contém grande quantidade de matéria seca (10,33%), carboidrato total (69,56%), carboidrato disponível (63,89%) e valor energético (363,97 kcal 100 g<sup>-1</sup> MS). O píleo contém uma grande quantidade de umidade (90,66%), nitrogênio (7,75%), proteína (33,96%), cinzas (8,24), gordura bruta (2,44%), fibra em detergente ácido (16,75 g kg<sup>-1</sup>), detergente neutro fibra (41,82 g kg<sup>-1</sup>), hemicelulose (25,07 g kg<sup>-1</sup>) e lignina (9,77 g kg<sup>-1</sup>). Estipes com estágio fisiológico maduro apresentaram maiores valores de matéria seca (10,50%), fibra bruta (5,94%), carboidrato total (72,82%), CA (66,88%) e valor energético (364,91 kcal 100 g<sup>-1</sup> DM). Píleo dos cogumelos no estágio fisiológico imaturo apresentaram maiores valores de P (36,83%), N (8,41%) e A - cinzas (8,44%) (ZIED *et al.*, 2017). A composição de *A. subrufescens* apresenta baixo teor de água, gordura bruta, fibra bruta e cinzas, enquanto alto teor de proteína, carboidratos totais e valores médios de carboidratos disponíveis e valor energético. (PARDO-GIMÉNEZ, *et al.*, 2020) A glicose está presente em quantidades muito pequenas e, como qualquer outro cogumelo, os basidiocarpos contêm quantidades muito pequenas de gordura. Seu valor calórico é bastante baixo em comparação com outros alimentos, assim, eles podem ser recomendados em dietas para perda de peso (KAPOOR, 2004; CHAKRAVARTY, 2011, RÓZSA *et al.*, 2019).

Diversos autores relatam o poder dos compostos bioativos presentes nos corpos de frutificação ou no micélio puro de *A. subrufescens*, que como dito anteriormente, tem o potencial de tratar diversas doenças, como os polissacarídeos (LEVITZ, 2010) como riboglucanos (GONZAGA *et al.*, 2005) e glucomananos (HIKICHI *et al.*, 1999). Diversas moléculas estão envolvidas nesses efeitos benéficos, e a maioria delas é bastante comum e onipresente em todo o reino fúngico. Alguns compostos e suas ações já vêm sendo estudados, como ergosterol, que é um análogo do colesterol, um componente da membrana celular fúngica e tem sido descrito como o componente benéfico em alguns cogumelos medicinais, lectinas e alguns aminoácidos imunomoduladores como a arginina e a glutamina, além de  $\beta$ -glucanas, que são constituintes da parede celular de fungos. Entretanto, apesar do avanço nas pesquisas científicas a respeito das propriedades medicinais do *A. subrufescens*, os mecanismos de ação das substâncias bioativas presentes nos cogumelos ainda não estão completamente esclarecidos (NOVAES & NOVAES, 2005).

### 2.3 Técnicas de cultivo de *Agaricus subrufescens*

Como já relatado anteriormente, as técnicas de cultivo deste cogumelo e de formulação do substrato se assemelham com a de *A.bisporus*, com algumas peculiaridades, por ser um cogumelo de origem tropical, necessitando de algumas adaptações em relação à temperatura de cultivo (COLAUTO, 2010). A principal diferença, é que *A. subrufescens* não necessita de redução de temperatura para a frutificação, enquanto que *A. bisporus* requer uma temperatura abaixo de 20 ° C durante o período de frutificação (DIAS *et al.*, 2004).

Um dos benefícios da produção de *A.subrufescens* é a opção de cultivo agrícola em países emergentes que são tropicais devido a sua maior temperatura de cultivo (aproximadamente 25°C), boa alternativa sazonal para ser utilizada durante o verão no país. A maioria dos produtores de *Agaricus* dá preferência à espécie nativa, justamente por produzir com eficiência no verão, por possuir exigências climáticas com temperaturas maiores quando comparada ao champignon (cogumelo Paris). A umidade ideal do composto deve estar entre aproximadamente 60 a 70%, considerando que uma umidade de 80-85% deve ser mantida na estufa (DE MENDONÇA *et al.*, 2005).

Capazes de converter resíduos lignocelulósicos em alimentos de alto poder nutritivos, segundo Miller e Macaulley, (1989), o gênero *Agaricus*, se utiliza de componentes *que* podem ser organizados em três categorias: estrutura complexa e materiais de decomposição dura, abundantes em celulose, hemicelulose e lignina, materiais ativadores do composto com proteínas, gorduras e carboidratos, e condicionadores inorgânicos como gesso e cal. As matérias primas para a compostagem, para facilitar a produção, devem estar disponíveis localmente e uma infinidade delas podem ser usadas como, por exemplo, palhas, esponjas de algodão, esterco de aves, farelo de trigo e arroz, cálcio e resíduos ricos em complexos lignocelulósicos como gramíneas diversas e bagaço de cana. A utilização desses resíduos no cultivo de *Agaricus*, de certa forma contribui para uma agricultura mais sustentável, ofertando um nicho de mercado e uma fonte potencial de diversificação para os produtores de *Agaricus*. Os compostos para a produção dos cogumelos devem apresentar produtos de degradação de forma assimilável o mais rápido possível pelo fungo, com uma especificidade bioquímica correspondente aos requisitos metabólicos do cogumelo (ZICARI, *et al.*, 2012). Além dos componentes necessários para a produção do composto e sua qualidade, a escolha da cepa do fungo é de extrema importância, pois influencia diretamente a produtividade (NOGUEIRA, 2013).

Intervir nas receitas de formulação do composto pode ser bom negócio quando se deseja aumentar a quantidade de certos nutrientes ou vitaminas nos suplementos alimentares

que utilizam *A. subrufescens* como base, influenciando assim a composição química e o conteúdo das substâncias bioativas do produto acabado (cogumelo). Além disso, se os produtos obtidos de uma receita específica de composto tiverem um alto nível de substâncias bioativas, e o nível de produção tiver uma alta produtividade e eficiência biológica, essa receita de composto também poderá ser feita no nível industrial (RÓZSA *et al.*, 2019).

As principais atividades relacionadas ao cultivo convencional são: compostagem (Fase I); pasteurização e condicionamento do substrato (Fase II); inoculação e incubação (Fase III); cobertura do substrato colonizado com a camada de cobertura (Fase IV), produção dos cogumelos e colheita (Fase V) (EIRA, 2003).

### 2.3.1 Compostagem (Fase I)

A compostagem pode ser definida como um processo de biotecnológico realizado por diferentes comunidades microbianas, que atuam decompondo a matéria orgânica, transformando-a em nutrientes mais simples (BARRENA, *et al.*, 2006).

Segundo Eira, (2003), na Fase I da compostagem, acontece uma compostagem curta, controlando a umidade entre 60 a 70%, se utilizando de reviragens no composto a cada dois dias, com a função de homogeneizar o substrato, garantindo que os componentes sejam misturados uniformemente, auxiliando também a atividade microbiana, por um período de duas semanas. O método de compostagem curta (*short composting*) foi desenvolvido por Sinden e Hauser na década de 50, e se resume no pré-umidecimento das palhas seguida da compostagem propriamente dita (Fase I) (LABORDE *et al.*, 1993). Como relatado anteriormente, as matérias primas utilizadas devem ser de estrutura complexa como materiais de decomposição dura, abundantes em celulose, hemicelulose e lignina, ricos em carbono e pobres em nitrogênio e fósforo, e com relação C/N de 37/1, segundo Kopytowski Filho, *et al.*, (2006). Em geral no cultivo de *Agaricus*, o composto exige uma suplementação, podendo-se serem utilizados materiais ricos em nitrogênio como farelos, sulfato de amônia e ureia. Ainda utiliza-se no Brasil, uma fonte de fósforo como complementação, geralmente na forma de superfosfato simples. Para o controle de pH o calcário também é normalmente utilizado, além do gesso agrícola, para melhorar a textura do composto.

Elevação da temperatura na pilha (que pode variar entre 35 a 80°C), produção de compostos voláteis como a amônia a transformação de compostos complexos em compostos mais simples, são mudanças que ocorrem em função da produção de enzimas da ação conjunta de diversos microrganismos (TANG *et al.*, 2004; GOLUEKE, 1992). A intensa atividade microbiana gera um aumento na temperatura do composto, como relatado



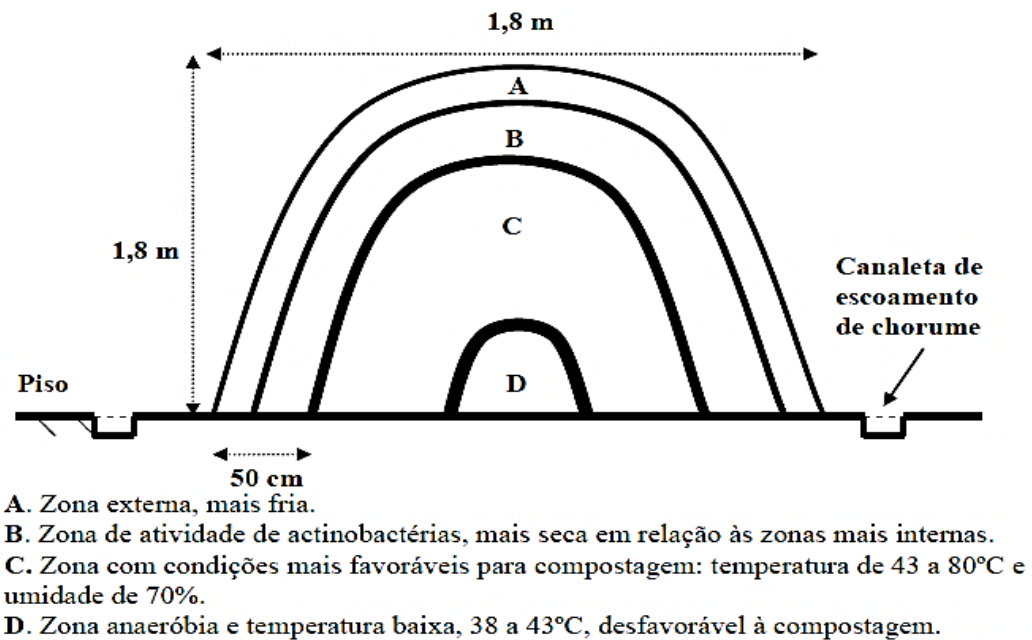
anteriormente, e a microbiota mesófila é substituída pelos microrganismos termófilos, em poucos dias de compostagem. Durante essa fase, observam-se alguns processos decorrentes de elevada taxa respiratória, tais como, alta produção de CO<sub>2</sub> e elevado consumo de oxigênio. A umidade neste processo é fator extremamente importante, pois, se cair a níveis críticos, a atividade microbiana decresce e os microrganismos podem entrar em dormência (GOLUEKE, 1992).

A pilha possui regiões distintas como observado na figura 1, com atividade microbiana e umidades distintas. A superfície (ZONA A) apresenta baixa umidade e temperatura e condições máximas de aerobiose, enquanto a região central (ZONA C) tem umidade maior e é parcialmente anaeróbica com temperaturas em torno de 43 a 80°C, a ZONA B é uma região de colonização das actinobactérias e menos úmida e a ZONA D apresenta anaerobiose total e temperatura baixa, desfavorável a compostagem, com temperatura de 38 a 43°C, por isso a necessidade de reviragens constantes, na função de homogeneizar as condições de umidade, temperatura por toda a massa do composto (VEDDER, 1996).

Um fator limitante no preparo de compostagem é a liberação de um forte odor de amônia, impossibilitando a produção em locais próximos a centros urbanos. A amônia que não sofreu o processo de volatilização é transformada por microrganismos em proteínas e aminoácidos, ressaltando que, caso isso não ocorra e o composto permaneça com elevado teor de amônia no momento da inoculação do *A. subrufescens*, sua colonização será prejudicada, podendo até impossibilitar o desenvolvimento micelial (DIAS, 2010).

Ao final da Fase I de compostagem, o composto deve apresentar as seguintes características: umidade em torno de 65-70%, pH entre 7,5 e 8, coloração da palha presente de amarela a marrom, com camada micelial branca, (presença de actinobactérias) e teor reduzido de amônia (MINHONI *et al.*, 2005).

**Figura 2.** Zonas de uma pilha de compostagem de *Agaricus sp*



Fonte: Adaptado de VEDDER, (1996)

### 2.3.2 Pasteurização e condicionamento (Fase II)

A Fase II compreende a pasteurização e condicionamento do composto onde o mesmo é transferido para câmara de pasteurização após semanas de compostagem, e passa por um tratamento térmico curto “indoor” chamado também de maturação, fazendo com que o composto obtenha propriedades bioquímicas, ecológicas e físico-químicas diferentes das iniciais, ficando pronto para o cultivo do cogumelo. A função da pasteurização é eliminação das pragas e de patógenos que tenham sobrevivido após a Fase I. No momento em que o composto atinge uma temperatura entre 55 e 58°C, a pasteurização inicia-se, e é estendida por um período de 6 horas, segundo Chang & Miles, (2004). No Brasil, a pasteurização acontece com períodos mais prolongados, com cerca de 12 horas, em função de condições de temperaturas mais elevadas no país, costuma-se considerar temperaturas de até 65°C para a pasteurização. Neste momento dentro da câmara o sistema de ventilação forçada faz com que o ar atravesse o composto, uniformizando não só a aeração, mas a temperatura (MARTOS, 2009).

### 2.3.3 Inoculação e incubação (Fase III)

A fase de inoculação e incubação do composto deve ocorrer logo após o final da Fase II, para evitar a ação de microrganismos oportunistas. Para a inoculação de *A. subrufescens* se utiliza um processo um tanto rústico. O composto é retirado da câmara e distribuído em sacolas com capacidade para 10 kg e prontamente inoculado com 100 a 200g de semente (Spawn). Após a inoculação do composto, com o micélio de *A. subrufescens*, o mesmo se desenvolve no composto e participa de interações com a comunidade microbiana presente no composto (FERMOR, *et al.*, 1985). Os sacos são transferidos para estufas protegidas da direta incidência de luz solar, evitando temperaturas acima de 30°C, não sendo necessária grande circulação de ar. Nesta fase o fungo tolera concentrações de até 3000 ppm de CO<sub>2</sub>, não prejudicando a colonização do substrato. Esse processo pode levar de 15 a 20 dias, se o fungo apresentar boas características genéticas (MARTOS, 2009).

### 2.3.4 Camada de cobertura (Fase IV)

A camada de cobertura é definitivamente uma operação imprescindível em todo o processo de cultivo, tanto em *A. subrufescens*, quanto em *A. bisporus*, definida também como fase crítica, onde diversos materiais podem ser utilizados como solo, turfa, fibra de coco, substrato pós-cultivo de cogumelo (ZIED *et al.*, 2012). Ela cobre toda a camada de composto e promove um estresse sobre o micélio do fungo, induzindo a passagem da fase de crescimento vegetativo, para a fase de crescimento reprodutivo do cogumelo, além de proteger o composto da dessecação e perda de água e de doenças e pragas (COLAUTO *et al.*, 2011). Segundo Calvalcante, *et al.*, (2011), ela varia de 3 a 5 cm e a recomendação de pH é de 7,0 a 7,5, se não neutro, bem próximo da neutralidade.

Segundo Colauto, *et al.*, (2010), parâmetros como a espessura, a porosidade, água, e trocas gasosas da camada de cobertura, afetam diretamente o surgimento, o desenvolvimento, a qualidade e a quantidade dos basidiocarpos de *A. bisporus*. Faz-se então necessária redobrada atenção quanto a condições de cultivo, as quais podem dificultar o crescimento micelial, como baixa disponibilidade de ar e adição exagerada de água, tornando o sistema anaeróbico, favorecendo o crescimento rápido de microrganismos contaminantes e indesejáveis.

Depois da adição da camada de cobertura ocorre o início do desenvolvimento micelial sobre a mesma, e a ventilação no interior da câmara durante o ciclo de produção é necessária, e a temperatura pode ser ajustada de 25 a 28°C. Após a colonização da camada de cobertura,

normalmente, mantem-se a mesma temperatura utilizada para a colonização do substrato, recomendando-se, de modo geral, a manutenção da mesma entre 25 e 28°C (DIAS 2010).

### 2.3.5 Produção e colheita dos cogumelos (Fase V)

O tipo de substrato utilizado e a camada de cobertura apropriada fazem com que um microambiente apropriado ao micélio seja gerado e posteriormente a formação primórdios e a frutificação dos cogumelos (GASPAR JÚNIOR, *et al.*, 2011).

Segundo Royse, (2010), logo após o desenvolvimento micelial, sobre a terra de cobertura, que ocorre aproximadamente em 17 a 20 dias, inicia-se a formação dos primórdios. No gênero *Agaricus*, como o cogumelo do sol, a colheita deve ser realizada em estágio de botão, antes da abertura do píleo.

Diversos avanços na produção de *A. subrufescens* e *A. bisporus* já foram relatados, mas apesar disso, depois de colhidos, os cogumelos possuem tempo de vida útil limitada, devida a uma senescência pós-colheita, o que é um grande problema para os produtores de *Agaricus*, pois os cogumelos muitas vezes, para chegar ao mercado, precisam ser transportados por longas distâncias até seu destino final. A vida útil de prateleira é bem curta, e isso é sem dúvidas, um dos principais obstáculos ao desenvolvimento da indústria de cogumelos (DUAN, *et al.*, 2010).

**Figura 3.** Resumo em imagens do processo de produção de cogumelos *A.subrufescens* ABL 04/49 desde a compostagem dos materiais brutos para o substrato e adição da camada de cobertura até a produção dos basidiocarpos



Fonte: Do autor (2023).

### 2.3.6 Microbiota da compostagem

O microbioma existente no composto, tais como bactérias, actinobactérias e fungos termófilos são fundamentais para o para a eficácia do processo de compostagem. Segundo Tuomela *et al.*, (2000), os microrganismos presentes na matéria orgânica são responsáveis por um processo de autoaquecimento aeróbico: bactérias termófilas: 55 a 63°C; actinobactérias: 50 a 55°C; fungos termófilos: 48 a 53°C (VEDDER, 1996). Desta forma, a compostagem pode ser interpretada como uma sucessão de microrganismos que continuamente se adaptam à oferta de nutrientes que, por sua vez, alteraram temperatura, dióxido de carbono, oxigênio, umidade, concentração de amônia e etc.

Logo no início da compostagem acontece um domínio de decompositores mesófilos, que utilizarão a fontes de carbono facilmente degradáveis. O resultado dessa intensa atividade metabólica é a produção de calor, com aumento rápido de temperatura, que por consequência, reduz a comunidade mesofílica, promovendo a ascensão da comunidade termofílica. Os microrganismos termófilos, são fundamentais na quebra de substâncias complexas como lignina e polissacarídeos. No momento final da compostagem, na chamada fase de maturação os mesófilos ressurgem, e podem se desenvolver novamente (SZÉKELY, *et al.*, 2008).

A sucessão microbiana na compostagem e sua diversidade têm sido estudadas em diversos estágios. Bactérias como *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Bacillus* são os gêneros mais comuns isolados da compostagem desempenhando importante papel na qualidade final do composto. Na fase os termofílica, bactérias do gênero *Bacillus* como *B. circulans* e *B. subtilis* são comuns. Actinobactérias são abundantes e perceptíveis nesta fase, tanto na superfície do composto, quanto no seu interior, e são importantes agentes degradadores de lignina e celulose juntamente com os fungos, embora os fungos possuam maior habilidade neste quesito. Os gêneros mais comuns de actinobactérias isoladas são *Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Micromonóspora*. Tais microrganismos são apontados como agentes condicionadores do composto, pois ao utilizarem o excesso de amônia gerada no final da Fase I, transformam-na em proteína microbiana, podendo ser utilizada posteriormente pelo fungo do cogumelo em sua nutrição (NAKASAKI, *et al.*, 1985; BEFFA, *et al.*, 1996; TÍQUIA 2002, STORM 1985; CHANG & MILES. 2004).

Os fungos também participam do processo de sucessão microbiana na compostagem, mas apenas alguns grupos de fungos permanecem na fase termofílica, em todo o processo de sucessão microbiana. A maioria dos fungos são mesófilos, crescendo entre 5 e 37°C, com temperatura ótima entre 25 e 30°C, e com o aumento da temperatura quando os microrganismos iniciam a degradação do composto, diversas espécies não resistem. Os fungos

são responsáveis pela degradação da lignocelulose, gerando produtos de cadeias menores. Diferentes espécies já foram isoladas a partir da compostagem na fase termofílica, como *Aspergillus fumigatus* e *Scytalidium thermophilum* (FERMOR, *et al.*, 2000; SILVA, *et al.*, 2009).

#### 2.4 Diversidade e seleção de linhagens com características desejáveis

Segundo Dias, *et al.*, (2004), diversas instituições brasileiras de capital aberto estão envolvidas em pesquisas sobre *A. subrufescens* sobre aspectos bioquímicos, fisiológicos, genéticos de linhagens, além da otimização e seleção de **composto**, camada de cobertura, técnicas de revestimento e condições de crescimento para este fungo, visando aumento da produção de cogumelos.

De forma geral, fungos do gênero *Agaricus* apresentam a capacidade de hidrolisar materiais ricos em energia, como diversos resíduos agrícolas e florestais, no entanto necessitam que estes materiais, com componentes lignocelulósicos complexos, sejam degradados em formas mais simples, e prontamente assimiláveis, justificando a necessidade da compostagem, porém a taxa de conversão destes resíduos varia conforme o potencial genético da linhagem utilizada.

Para a seleção de linhagens de uma espécie, diversos parâmetros devem ser considerados. Dentre eles estão: **elevada produtividade/eficiência biológica** (um dos mais importantes parâmetros na seleção de uma linhagem comercial, ou na escolha das melhores linhagens para um programa de melhoramento genético), **rapidez de colonização do fungo** no spawn, no substrato de cultivo e camada de cobertura (velocidade de crescimento), resistência a fungos contaminantes, **ciclo de cultivo mais curto**, **rusticidade da linhagem** (linhagem pode ser cultivada no ambiente mais simples possível), **morfologia** (tamanho e forma) dos basidiomas, características nutricionais dos basidiomas, **características genéticas**, além de **precocidade** e **tempo de vida útil estendidos** (DIAMANTOPOULOU; PHILIPPOUSSIS, 2001; MANOLOPOULOU *et al.*, 2007).

#### 2.5 Mercado e potencialidades

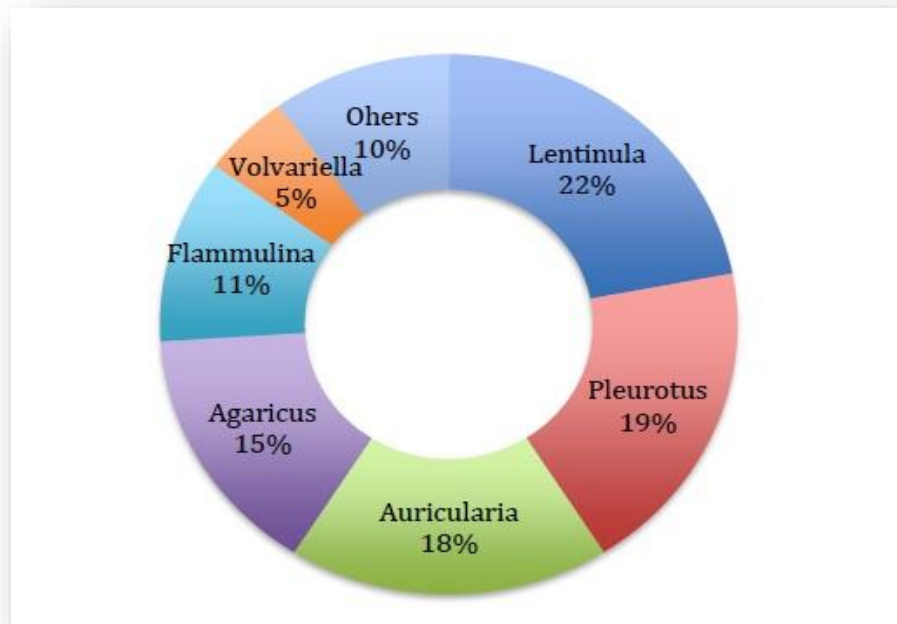
A importância dos cogumelos comestíveis vem aumentando em função de seu processo produtivo e propriedades medicinais e nutracêuticas. Neste sentido os cogumelos se situam nomeadamente presentes nos setores da indústria mundial farmacêutica e de alimentos. Na América, inicialmente o cultivo foi realizado em casas com instalações parecidas com

fábricas, este sistema passou a ser utilizado na Europa. No início dos anos de 1953, com a chegada de imigrantes chineses no Brasil, mais especificamente em Mogi das Cruzes, e do italiano Oscar Molena em Atibaia, no estado de São Paulo, deu-se início a produção de *Agaricus* no Brasil, onde foram introduzidas tecnologias e linhagens importadas de seus países de origem. (BONONI *et al.*, 1999).

No mundo, o principal gênero de cogumelo cultivado atualmente é o *Lentinula* contribuindo com cerca de 22% do total de cogumelos cultivados. O gênero *Pleurotus*, se situa em segundo lugar, com 5 a 6 espécies cultivadas, isso constitui cerca de 19% da produção mundial, enquanto a *Auricularia* contribui com 17%. Os outros dois gêneros, *Agaricus* e *Flammulina* são responsáveis por 15% e 11% do volume, respectivamente (ROYSE *et al.*, 2017).

A produção mundial de cogumelos comestíveis em 2013 aumentou mais de 30 vezes desde 1978 (de cerca de 1 bilhão de kg em 1978 para 34 bilhões de kg em 2013) (ROYSE, *et al.*, 2017). Segundo uma pesquisa realizada em 2013, desse total de 34 bilhões de kg produzidos em todo mundo, a China se situa como maior produtor desse total, com cerca de mais de 30 bilhões de kg de cogumelos (CEFA, 2014), e este representaram cerca de 87% da produção total. O resto da Ásia produziu cerca de 1,3 bilhões de kg, enquanto a UE, as Américas e outros países produziram cerca de 3,1 bilhões de kg. (ROYSE, *et al.*, 2017).

Em média, os consumidores no mundo agora desfrutam de cerca de 5 kg de cogumelos por pessoa por ano. O consumo per capita deverá continuar a aumentar à medida que os consumidores se tornarem mais conscientes dos benefícios saudáveis da incorporação de cogumelos em sua dieta. (ROYSE, *et al.*, 2017).

**Figura 4:** Produção de cogumelos comestíveis em todo o mundo

Fonte: Adaptado de (ROYSE, *et al.*, 2017)

Atualmente, *A. subrufescens* ocupa o 4º lugar entre as espécies de cogumelos cultivadas no Brasil juntamente com *Flammulina velutipes*, *Pleurotus djiamor*, *Pleurotus eryngii* dentre outras, com 6% da produção nacional e produção estimada de 900 toneladas/ano (SÁNCHEZ, *et al.*, 2018).

A produção anual de cogumelos no Brasil atualmente está em torno de 15.696 toneladas (Tabela 1). O consumo de cogumelo no país se situa em cerca de 130g de cogumelo fresco/pessoa/ano. (SÁNCHEZ, *et al.*, 2018).

**Tabela 1** – Produção e porcentagem estimada de cogumelos comestíveis no Brasil

Espécies de cogumelos cultivadas no Brasil	Produção
<i>Pleurotus</i> var. Florida	~7475 ton/ano, 48%
<i>Agaricus bisporus</i> (Champignon de Paris)	~5150 ton/ano, 33%
<i>Lentinula edodes</i> (Shitake)	~2172 ton/ano, 13%
<i>Agaricus subrufescens</i> , <i>F. velutipes</i> , <i>P. eryngii</i> , <i>P. cornucopiae</i> , <i>Pholiola nameko</i> , <i>P. djiamor</i>	~900 ton/ano, 6%

Fonte: Adaptado de Edible Mushroom Production in the Americas (SÁNCHEZ *et al.*, 2018).



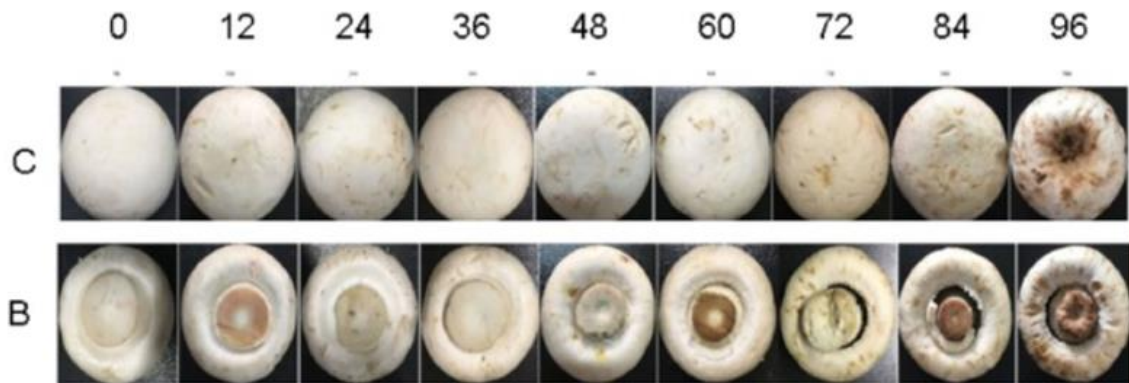
A demanda do cogumelo do sol no mercado nacional ainda é considerada baixa, como relatado por Sánchez, *et al.*, (2018), quando comparada ao “Champignon” (*A. bisporus*), apesar da ampla divulgação das suas propriedades medicinais, ficando restrita a pessoas em tratamento contra o câncer, principalmente. Certamente, a elevação da produtividade e aumento considerável do tempo de prateleira desses cogumelos (o que é um dos problemas eminentes nesta espécie) poderia contribuir para a prática de preços mais baixos no mercado nacional, permitindo inclusive que este cogumelo fosse explorado, em maior escala, como alimento (DIAS, 2010).

## **2.6 Tempo de vida útil pós-colheita do cogumelo *Agaricus subrufescens***

O cogumelo *A. subrufescens* tradicionalmente é vendido na forma desidratada, onde após a colheita é necessário que os eles passem por processos de lavagem e desidratação, sendo que no final do processo apresentem coloração amarelo-palha, além de tamanho superior a 5 cm, segundo exigências do mercado, mas também podem ser vendidos à fresco (EIRA, 2003). Em razão de qualidades nutricionais, terapêuticas e medicinais apresentadas pelos cogumelos, a demanda pelo cogumelo *A. subrufescens* fresco tem aumentado, o que gera a necessidade de conservar melhor o produto e aumentar sua vida útil na prateleira dos consumidores, a qual é bem curta.

Um grande desafio para os produtores de *Agaricus* é a comercialização a fresco dos cogumelos, pois diversos atributos de qualidade devem ser observados como: frescura, cor, limpeza, uniformidade e sabor. Métodos eficientes de armazenamento têm sido propostos pela literatura, pois os cogumelos do gênero *Agaricus* são altamente perecíveis. Para o cogumelo *A. bisporus* o período de aceitabilidade é de 1 a 3 dias quando armazenado à temperatura ambiente (20–25°C), 5 a 7 dias quando armazenado a 0–2°C ou cerca de 8 dias quando armazenado sob condições de refrigeração (DIAMANTOPOULOU & PHILIPPOUSSIS, 2015 ; JIANG, 2013 ; XU, TIAN, MA, LIU & ZHANG, 2016) (Figura 5 e Figura 6), já para *A. subrufescens* o período de aceitabilidade em estado fresco é de “zero dias”, com isso, os cogumelos devem ser colhidos, lavados e rapidamente desidratados.

**Figura 5.** Imagens de alterações na aparência (escurecimento) do cogumelo *A. bisporus* durante o armazenamento a 20°C por 96 horas. **B** – Base do estipe; **C** – Base do píleo



Fonte: Adaptado de (LI, *et al.*, 2019)

**Figura 6.** Imagens de alterações na aparência (escurecimento) do cogumelo *A. bisporus* durante o armazenamento a 6°C por 16 dias. **B** – Base do estipe; **C**: Base do píleo



Fonte: Adaptado de (LI, *et al.*, 2019)

Segundo Kader, (2001), a qualidade do produto fresco inclui a aparência (tamanho, forma, cor, brilho, ausência de defeitos e deterioração); a textura (firmeza, crocância e dureza, dependendo do alimento); sabor (doçura, acidez, adstringência, aroma e odores); e o valor nutricional (vitaminas, minerais, fibra dietética e micronutrientes).

A perda de qualidade após a colheita se dá por meio de processos fisiológicos os quais ocorrem no próprio cogumelo, tais como senescência do corpo de frutificação e deterioração microbiana (geralmente por *Pseudomonas tolosi*) e escurecimento enzimático e não enzimático (manuseio brusco). Dentre todos os processos, o mais nocivo e agressivo para a comercialização é o escurecimento enzimático (MOQUET, MAMOUM & OLIVER, 1996).

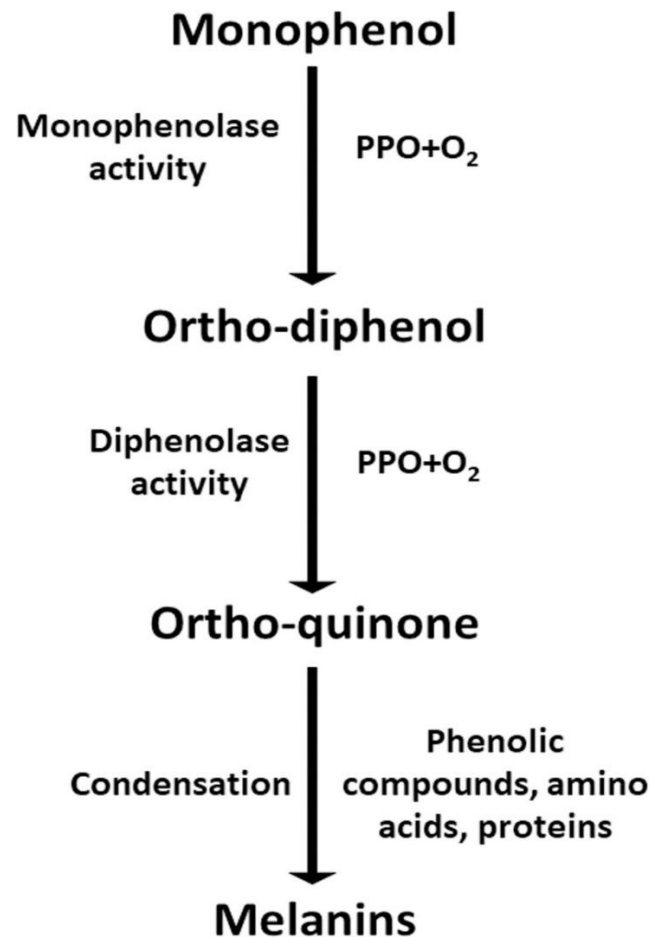
## 2.7 Escurecimento enzimático em cogumelos

O escurecimento enzimático pós-colheita é um fenômeno comum, principalmente nos cogumelos do gênero *Agaricus*, trazendo certos prejuízos para seu valor comercial. Segundo Laurila *et al.*, (1998), o escurecimento enzimático requer os seguintes componentes: oxigênio, enzimas, cobre e substrato. A autora relata que a enzima fundamental e responsável pelo escurecimento em frutos e hortaliças minimamente processados é a polifenoloxidase, e os fatores que influenciam este processo são: concentração de polifenoloxidase, componentes fenólicos presentes, pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio nos tecidos. O escurecimento está intimamente ligado à ação das enzimas PPO que utilizam compostos fenólicos como substratos e provocam assim alterações indesejáveis na cor, sabor e aroma de frutas, vegetais e cogumelos.

O escurecimento ocorre então devido à oxidação de compostos fenólicos. O colapso celular causa a descompartimentalização, que promove o contato dos compostos fenólicos presentes com enzimas associadas ao escurecimento como a polifenoloxidase (VILAS BOAS, 1999). A integridade da membrana celular é perdida após danos causados nos tecidos durante a senescência ou injúria resultando na destruição da barreira biológica entre a PPO e seus substratos, levando a rápida oxidação de fenóis e consequente produção de pigmentos escuros (JIMENEZ; GARCÍA-CARMONA, 1996).

As polifenoloxidases (grupo das oxidoredutases), também chamadas de catecol oxidase, catecolase, difenol oxidase, o-difenolase, fenoloxidase, tirosinase ou creolase, são enzimas que contêm cobre no sítio ativo e catalisam a oxidação dos compostos fenólicos das quinonas na presença de oxigênio molecular, gerando dois tipos de reações diferentes: hidroxilação de monofenóis para o-difenóis e a oxidação de o-difenóis em compostos de cor ligeiramente amarela, as o-quinonas (Figura 7). Estas duas reações são denominadas de monofenolase ou cresolase e difenolase ou catecolase respectivamente (Figura 7). As quinonas formadas geram pigmentos complexos da cor marrom, as quais se denominam melaninas. As enzimas lacases atuam sobre substratos específicos e são responsáveis pelo processo de escurecimento enzimático nos cogumelos. Percebe-se que logo após a colheita, os cogumelos apresentam uma crescente coloração marrom, perdendo a sua coloração original. Desta forma, a alteração na cor causa deterioração na qualidade, e isso nada mais é do que resultado da oxidação dos polifenóis (ROBB, 1984).

**Figura 7.** Reações catalisadas pela PPO e formação de compostos escuros (melaninas)



Fonte: Reproduzido de CAI *et al.*, (2022)

O pH ótimo das enzimas polifenoloxidasas varia com o tipo de enzima e com o substrato numa ampla faixa entre pH 4,0 e 7,0. No caso dos cogumelos, o pH ótimo encontra-se entre 6,0 – 7,0. Com relação à temperatura ótima de atividade, esta varia entre 30 a 50°C, sendo que a partir desta temperatura, a enzima sofre desnaturação (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981). O conteúdo de umidade possui também um efeito catalítico na reação de desnaturação, através da quebra de pontes de hidrogênio entre os grupos proteicos. Quanto menor o conteúdo de umidade, maior a termoestabilidade da enzima (YAPAR *et al.*, 1990).

Para evitar o processo de escurecimento é necessário prevenir que ocorra a ruptura dos tecidos ou garantir que as enzimas sejam inativadas por calor, sulfitação ou por meio de ácidos, reduzindo o pH.

A competitividade do mercado tem levado diversos estudiosos a analisar métodos e, ou tecnologias que de certa forma retardam a degradação dos cogumelos e diversas pesquisas procuram identificar prováveis substâncias que, ao serem utilizadas, aumentariam a vida de prateleira dos cogumelos frescos (BRENNAN *et al.*, 1999; KUYPER *et al.*, 1993). Os processos mais comuns são lavagem, imersão, liofilização, resfriamento, irradiação, embalagem, exclusão do oxigênio, branqueamento ou impregnação a vácuo em soluções que contenham substâncias inibitórias, tais como sal, ácido cítrico e ascórbico, peróxido de hidrogênio, EDTA, isoascorbato de sódio, cloridrato de cisteína e metabissulfitos (JAWORSKA *et al.*, 2010).

O sulfito e metabissulfito de sódio, onde os agentes redutores (sulfito e ácido cítrico) promovem a redução química dos precursores do pigmento (MAU *et al.*, 2002), o ácido cítrico, que bloqueia a atividade da enzima tirosinase através de sua ação quelante sobre os íons cúpricos constituintes da enzima, o ácido ascórbico que um potente agente redutor, interagindo com oxigênio e metais pesados, podendo reduzir os produtos de oxidação (BARUFALDI *et al.*, 1998) e a cisteína que apresenta um efeito inibidor sobre a tirosinase (MOLNAR-PERL & FRIEDMAN (1990)).

O processo de escurecimento é extremamente prejudicial na comercialização dos cogumelos, pois determina a obtenção de um produto final fora dos padrões exigidos pelo mercado. Considerando que um dos parâmetros para a definição do preço e venda são a cor e aparência dos basidiocarpos, além de métodos químicos para evitar o escurecimento, o uso de ferramentas de sequenciamento e edição de genomas utilizando a biologia molecular, se tornam fundamentais para eliminar ou amenizar esse processo em cogumelos do gênero *Agaricus*.

## **2.8. Sequenciamento genômico de fungos**

O DNA (ácido desoxirribonucleico) define o código genético da célula e fornece as informações necessárias para o funcionamento de todos os processos biológicos que ocorrem no organismo vivo. Para uma compreensão um pouco mais transparente dos mecanismos que atuam nestes processos, é preciso estudar a composição da molécula de DNA, e para que isso ocorra, elucidar o genoma completo através do sequenciamento torna-se essencial (XU; BLUHM, 2011).

O sequenciamento e análise de genomas em fungos, bem como o desenvolvimento de ferramentas da bioinformática, têm proporcionado esclarecimentos relevantes quanto à

produção de diversas substâncias bioativas e vias metabólicas (BRANDENBURGER *et al.*, 2018). O NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e MycoCosm ([genome.jgi.doe.gov](http://genome.jgi.doe.gov)) são ferramentas de depósito das sequências que facilitaram o acesso ao acervo gerando um aumento nas atuais tecnologias de sequenciamento de DNA e RNA. O MycoCosm traz diversos benefícios aos usuários, dentre eles, um recurso genômico integrado, que tem a função de fornecer dados de diferentes fungos incluindo os cogumelos, além de algumas ferramentas para análises (GRIGORIEV *et al.*, 2014; GRIGORIEV *et al.*, 2012). Com o genoma em mãos, torna-se possível a obtenção de diversas respostas a respeito identificação de determinados conjuntos de genes, esclarecendo diferentes funções celulares nos organismos, isso justifica, em parte, a grande diversidade fenotípica existente entre os seres vivos (MOROZOVA; HIRST; MARRA, 2009).

As tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS-*Next Generation Sequencing*) permitiram uma nova abordagem de sequenciamento em larga escala (HGS – High throughput sequencing) e representam um grande avanço no sequenciamento do genoma. (METZKER, 2010). Adicionalmente, algumas delas oferecem um serviço de custo relativamente baixo e com alto rendimento, permitindo assim, análises mais abrangentes da estrutura e conteúdo dos genomas.

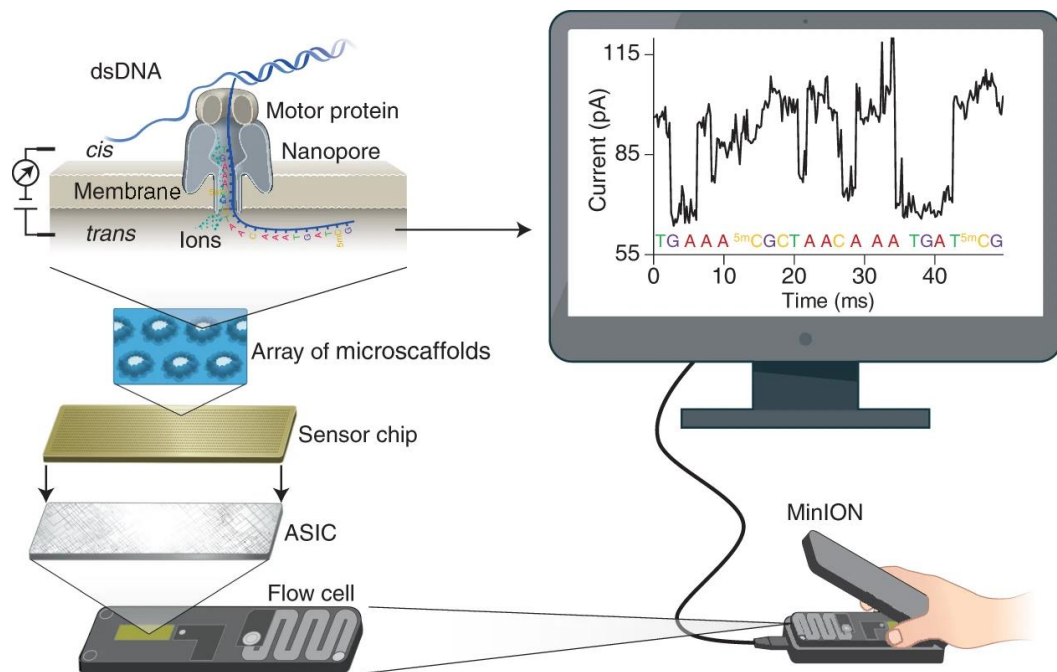
Com isso, as plataformas de NGS comumente empregadas na atualidade são baseadas principalmente nas metodologias de: Pirosequenciamento com detecção de pirofosfato (454 – Roche); Sequenciamento por ligação (SOLiD); Metodologia de semicondutores (Ion); Sequenciamento por síntese (Illumina); Sequenciamento de moléculas únicas (Pacific Biosciences) onde as mais utilizadas são *Pacific Biosciences* (PacBio RS II) e *Illumina* (*HiSeq 2500*), que se baseiam na detecção óptica de incorporações de nucleotídeos e são frequentemente comercializadas por meio de instrumentos grandes e caros. Uma das mais atuais tecnologias é o chamado Oxford NANOPORE MinION, que é um sequenciador de nanoporos de molécula única que pode ser conectado a um laptop por meio de uma interface USB, mas ambas as tecnologias proporcionam novas abordagens para o sequenciamento de DNA, cada qual, apresentando vantagens e desvantagens com relação a aplicações específicas.

Já bastante utilizada, a plataforma NANOPORE MinION, apresentada pela empresa britânica Oxford Nanopore em 2012, mas na verdade, sua tecnologia vem sendo desenvolvida desde a segunda metade da década de 1990 (KASIANOWICZ *et al.* 1996). Nesta plataforma o sequenciamento se faz por meio de sinais elétricos detectados no momento em que os nucleotídeos passam através de nanoporos (NINOMIYA *et al.* 2013). O equipamento todo

possui o tamanho similar a um HD externo onde as amostras são inseridas e o sequenciador é acoplado diretamente aos computadores dos pesquisadores. Este sistema é portátil (próximo ao tamanho de uma gaita) e de baixo custo (atualmente US \$ 1000 para o instrumento), causou grande entusiasmo na comunidade científica, ao permitir, por exemplo, imaginar o sequenciamento de DNA tão acessível que este poderia ser realizado em campo.

Como tal, esta tecnologia possui o potencial de gerar leituras ultra-longas e imparciais em tamanho de megabases, permitindo boa resolução de repetições longas e facilitando a precisão na montagem de regiões genômicas complexas. Apesar da capacidade inerente do sequenciamento de nanoporos para gerar assembleias de novo de genomas grandes e complexos, o uso de nanopore na literatura recente tem sido limitado à montagem de novo de genomas procarióticos de tamanho pequeno (KARAMITROS *et al.* 2016) e genomas eucarióticos de tamanho médio seguindo uma abordagem de montagem híbrida (GOODWIN *et al.*, 2015). Recentemente, um relatório preliminar de montagens genômicas de novo de vários isolados de leveduras gerados a partir de leituras de nanoporos foi publicado. A construção da biblioteca envolve um método simplificado e nenhuma etapa de amplificação é necessária. A preparação da biblioteca pode ser realizada de duas maneiras: (i) uma preparação da biblioteca com base em um método enzimático para o sequenciamento '1D' (sequenciando uma fita do DNA) ou (ii) uma preparação da biblioteca baseada na ligação para sequenciamento '2D' (sequenciando as cadeias modelo e complemento do DNA). No modo de sequenciamento 2D, as duas cadeias de uma molécula de DNA são ligadas por um 'hairpin' e sequenciadas consecutivamente. Quando as duas cadeias da molécula são lidas com sucesso, uma sequência de consenso é construída para obter uma leitura mais precisa (chamada leitura 2D). Caso contrário, apenas a sequência de modelo ou cadeia de complemento é fornecida (chamada leitura 1D) (ISTACE *et al.*, 2017).

**Figura 8.** Princípio do sequenciamento OXFORD Nanopore (MinION) (WANG *et al.*, 2021).



Legenda: Uma célula de fluxo MinION contém 512 canais com 4 nanoporos em cada canal, totalizando 2.048 nanoporos usados para sequenciar DNA ou RNA. Os poços são inseridos em uma membrana de polímero eletricamente resistente, suportada por um conjunto de microandaimes conectados a um chip sensor. Cada canal está associado a um eletrodo separado no chip do sensor e é controlado e medido individualmente pelo circuito de integração específico da aplicação (ASIC). A corrente iônica passa através do nanoporo porque uma voltagem constante é aplicada através da membrana, onde o lado trans está carregado positivamente. Sob o controle de uma proteína motora, uma molécula de DNA de fita dupla (dsDNA) (ou um duplex híbrido de RNA-DNA) é primeiro desenrolada e, em seguida, o DNA de fita simples ou RNA com carga negativa é transportado através do nanoporo, impulsionado pela voltagem. À medida que os nucleotídeos passam pelo nanoporo, uma mudança de corrente característica é medida e usada para determinar o tipo de nucleotídeo correspondente a ~ 450 bases por s (nanoporo R9.4).

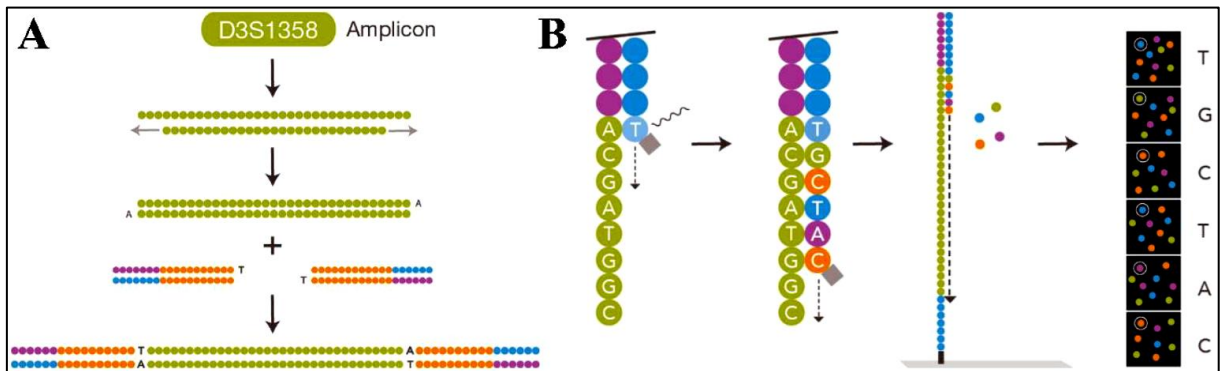
Fonte: (WANG *et al.*, 2021).

A plataforma *Illumina* é também uma tecnologia de nova geração tradicionalmente usada em elucidações de genomas, no entanto sua abordagem é distinta da plataforma GridION (Nanopore). Sua tecnologia é baseada na química de sequenciamento-por-síntese (SBS), utilizando nucleotídeos terminadores reversíveis marcados com fluoróforo, o sequenciamento é feito base a base e as leituras são feitas pela intensidade do sinal quantificado a cada ciclo, gerando assim dados mais precisos e minimizando taxas de erros (VAN DIJK *et al.*, 2014). Para construção das bibliotecas, adaptadores são ligados nas extremidades do fragmento de DNA. As bibliotecas (*pool* com as amostras) são injetadas em uma lâmina (*flow cell*) que apresenta uma superfície composta por óligos complementares aos



adaptadores das bibliotecas. Essa lâmina é colocada no *aparelho* onde ocorre a incorporação dos nucleotídeos marcados com fluorescência e sequenciamento por síntese base a base (SBS *sequencing*). Ao ocorrer a incorporação de um nucleotídeo, a fluorescência é excitada por lasers e captada por câmeras em cada ciclo. (HODKINSON; GRICE, 2015).

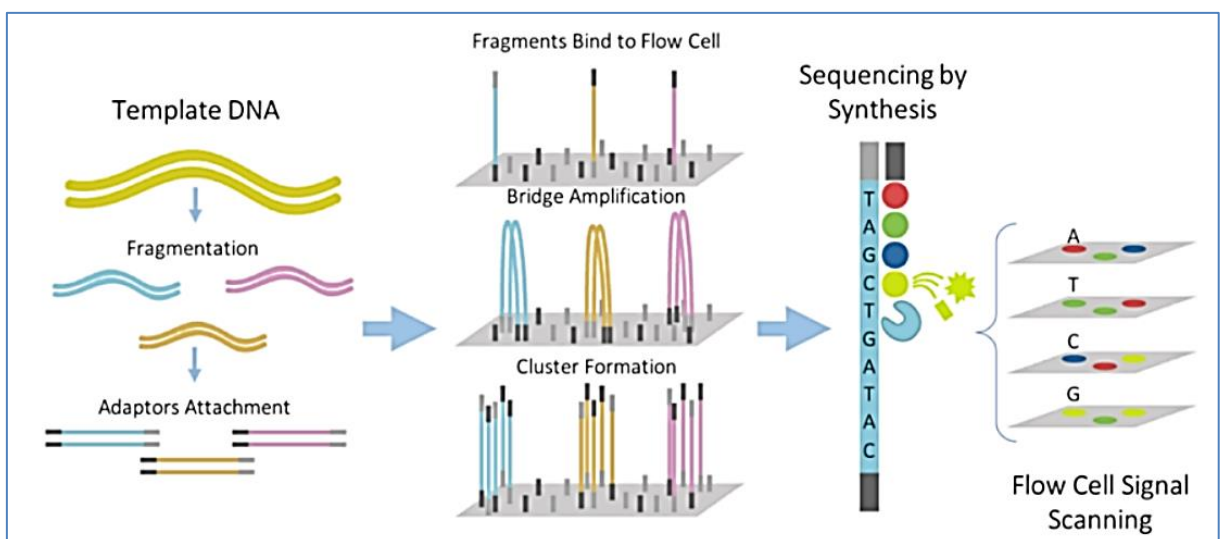
**Figura 9.** Ilustração esquemática da tecnologia SBS da *Illumina*



Legenda: Para construção das bibliotecas, adaptadores são ligados nas extremidades do fragmento de DNA (A). As bibliotecas (*pool* com as amostras) são injetadas em uma lâmina (*flow cell*) que apresenta uma superfície composta por oligos complementares aos adaptadores das bibliotecas. Essa lâmina é colocada no *HiSeq 2500*, onde ocorre a incorporação dos nucleotídeos marcados com fluorescência e sequenciamento por síntese base a base (SBS *sequencing*). Ao ocorrer a incorporação de um nucleotídeo, a fluorescência é excitada por lasers e captada por câmeras em cada ciclo (B).

Fonte: (<https://www.Illumina.com>)

**Figura 10.** Fluxo de trabalho da plataforma *Illumina*: Preparo da amostra, geração de agrupamentos e sequenciamento por síntese.



Fonte: (<https://www.Illumina.com>)

O FLUXO DE TRABALHO *Illumina* é composto por 3 etapas básicas:

No preparo da amostra adiciona-se adaptadores às extremidades dos fragmentos de DNA através da amplificação dos ciclos são introduzidos motivos adicionais como locais de ligação de sequenciamento, index, regiões complementares aos oligos na flow cell. (HODKINSON; GRICE, 2015, BENTLEY, 2006).

Para a geração de clusters (agrupamentos), cada fragmento é amplificado isotermicamente. A flowcell é uma lâmina de vidro com vários canais, cada canal é uma raia revestida por uma cobertura composta por dois tipos de oligos. A hibridização é ativada pelo primeiro dos dois tipos de oligos na superfície. Esse oligo é complementar ao adaptador de uma das fitas dos fragmentos. Uma polimerase cria um complemento do fragmento hibridizado. A molécula de fita dupla é desnaturada e o modelo original é retirado por lavagem. As fitas são amplificadas clonalmente através de uma amplificação em Ponte. Nesse processo a fita se dobra e a região do adaptador hibridiza com o segundo tipo de oligo na flow cell. A polimerase gera uma fita complementar formando uma ponte de dupla fita, essa ponte é desnaturada resultando em duas cópias de fitas simples na molécula que estava ancorada na flow cell. O processo é repetido várias vezes e ocorre simultaneamente para milhões de clusters resultando na amplificação clonal de todos os fragmentos. Após a amplificação em ponte as fitas “reverse” são clivadas e lavadas deixando apenas as fitas “forward”. As três extremidades principais estão bloqueadas para impedir anelamentos indesejáveis (HODKINSON; GRICE, 2015, BENTLEY, 2006).

O sequenciamento começa com a extração do primeiro primer de sequenciamento para produzir a primeira leitura ou read. A cada ciclo, nucleotídeos marcados com fluorescência competem pela adição a cadeia crescente. Apenas um é incorporado com base na sequência de DNA molde. Após a adição de cada nucleotídeo, os clusters são excitados por uma fonte de luz e um sinal fluorescente característico é emitido. Esse processo patenteado é chamado de sequenciamento por síntese. O número de ciclos determina o tamanho da leitura. O comprimento da emissão de onda juntamente com a intensidade do sinal determina a chamada de base. Para um determinado cluster todas as fitas idênticas são lidas simultaneamente. Centenas de milhões de clusters são sequenciados em um processo paralelo massivo. Após a conclusão da primeira leitura, o produto é lavado. Nesta etapa o primer do Index 1 é introduzido e hibridizado com o DNA molde. A leitura é gerada de forma semelhante a primeira leitura. Após a conclusão da leitura do Index, o produto de leitura é lavado e as três extremidades principais do DNA molde ficam disponíveis. O DNA molde agora se dobra e se liga ao segundo oligo na flow cell. O index 2 é lido da mesma maneira que o index 1. A polimerase estende o segundo oligo da flow cell formando uma ponte de fita dupla. Esse

DNA de fita dupla é então linearizado e as três extremidades dos primers são bloqueadas. A fita forward original é cortada e lavada deixando apenas uma fita reverse. A leitura dois começa com a introdução do primer do sequenciamento 2. Como na leitura 1 as etapas de sequenciamento são repetidas até que o comprimento de leitura seja alcançado. O produto 2 é então lavado. Todo esse produto gera milhões de leituras representando todos os fragmentos. As sequências do pool de bibliotecas são separadas com base nos Index introduzidos durante a preparação da amostra (HODKINSON; GRICE, 2015, BENTLEY, 2006).

O avanço das tecnologias de sequenciamento fez surgir diversas novas ferramentas e algoritmos para realizar a montagem de genomas. Devido à grande disponibilidade dessas tecnologias, uma nova abordagem de montagem de genomas foi desenvolvida, chamada híbrida. A montagem híbrida se utiliza de *reads* provenientes de diferentes sequenciadores para reconstruir o genoma. Devido ao fato de que dados gerados por sequenciadores distintos possuem suas próprias características, tal abordagem também pode fazer uso de múltiplos montadores (POP, 2009).

Recentemente diversos estudos relataram montagens completas de alta qualidade e bem sucedidas de genomas de fungos basidiomicetos produtores de cogumelos utilizando as plataformas de nova geração para espécies como: *Schizophyllum commune* (OHM, *et al.*, 2010), *Ganoderma lucidum* (CHEN *et al.*, 2012), *Agaricus bisporus* (MORIN *et al.*, 2012), *Volvariella volvacea* (BAO *et al.*, 2013), *Flammulina velutipes* (PARK *et al.*, 2014), *Lentinula edodes* (CHEN, *et al.*, 2016), *Sparassis crispa* (Hanabiratake) (KIYAMA *et al.*, 2018), *Auricularia heimuer* (YUAN *et al.*, 2019), *Hericiium erinaceus* (GONG *et al.*, 2020), *Russula griseocarnosa* (YU *et al.*, 2020), *Pleurotus ostreatus* (LEE *et al.*, 2021) e *Phlebopus portentosus* (WAN, *et al.*, 2021).

O tamanho do genoma de fungos *Agaricomycetos-basidiomicetos*, varia de 20 Mb até cerca de 200 Mb e o número de regiões codificadoras varia de 9.501 a 39.074 (LI *et al.*, 2018). Os tamanhos médios dos genomas dos fungos *Ascomycota* e *Basidiomycota* se situam em 36,91 e 46,48 Mb, respectivamente (MOHANTA & BAE, 2015).

**Tabela 2:** Comparação de tamanho médio de genomas e conteúdo GC (%) de 15 espécies pertencentes a Basidiomicetos que tiveram os genomas sequenciados e publicados nos últimos 12 anos.

Espécie	Genoma (Mb)	Conteúdo GC (%)	Referência
<i>Schizophyllum commune</i>	38,5	-	(Ohm, <i>et al.</i> , 2010)
<i>Ganoderma lucidum</i>	43,3	55,9	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
<i>Agaricus bisporus H97</i>	30,3	46,48	(Morin <i>et al.</i> , 2012)
<i>Volvariella volvacea</i>	35,7	48,86	(Bao <i>et al.</i> , 2013)
<i>Flammulina velutipes</i>	35,6	48,99	(Park <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lentinula edodes</i>	41,8	46,1	(Chen, <i>et al.</i> , 2016)
<i>Sparassis crispa</i>	39,0	51,4	(Kiyama <i>et al.</i> , 2018)
<i>Auricularia heimuer</i>	49,7	56,98	(Yuan <i>et al.</i> , 2019)
<i>Agaricus bisporus ARP 23</i>	33,4	46,33	(O'Connor, <i>et al.</i> , 2019)
<i>Hericium erinaceus</i>	41,2	52,3	(Gong <i>et al.</i> , 2020)
<i>Russula griseocarnosa</i>	64,8	49,92	(Yu <i>et al.</i> , 2020)
<i>Agaricus bisporus burnettii</i>	30,7	-	(Sonnenberg, <i>et al.</i> , 2020)
<i>Pleurotus ostreatus PC9</i>	35,0	50,79	(Lee <i>et al.</i> , 2021)
<i>Phlebopus portentosus</i>	32,7	48,92	(Wan, <i>et al.</i> , 2021)

Fonte: Do Autor (2023).

### 2.8.1 Mitogenomas e transposons em fungos

Os mitogenomas de fungos apresentam grande diversidade no tamanho do genoma, número de genes e arquitetura do genoma. Em geral, as variações no tamanho de mitogenomas de basidiomicetos foram afetadas por uma série de fatores, mas as variações de íntrons podem ser o fator mais importante em geral (LI *et al.*, 2020).

As mitocôndrias são organelas que apresentam papel fundamental na vida dos fungos, com genomas próprios (também chamados de mitogenomas) advindos de alfa-proteobactérias, através de endossimbiose, elas são fonte de energia para o metabolismo de eucariotos (ALLEN 2015; MUNOZ-GOMEZ *et al.* 2017). Variações em conteúdo e estrutura afetam diretamente, resistência ao estresse, metabolismo e o fator reprodutivo dos eucariotos (GU *et al.*, 2019). Estrutura, arranjo gênico genes de tRNA, tamanho, número de íntrons, elementos repetidos podem apresentar subsídios de informações abundantes e robustos para compreensão de filogenia em eucariotos, (FOURIE *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020). Diversos mitogenomas de eucariotos têm sido obtidos atualmente, contudo, o mitogenoma dos fungos é menos elucidado, quando comparado aos animais (CHENG *et al.*, 2021).

O genoma mitocondrial é classificado em geral como o segundo genoma, e é encontrado na maioria dos eucariotos, onde segundo teorias, a mitocôndria se originou de alfa-proteobactérias ancestrais através de endossimbiose (HENZE & MARTIN, 2003; GRAY

*et al.*, 1999). Por apresentar diversas vantagens como baixas taxas de recombinação, herança materna, diversos marcadores moleculares disponíveis e herança materna, ele se torna instrumento essencial em análises evolutivas, estudos de filogenia e genética comparativa e populacional (BULLERWELL & LANG, 2005).

A maioria dos genomas de fungos contém um gene de proteína ribossômica S3 conservado (*rps3*) para regulação transcricional e 14 genes codificadores de proteínas conservados (*nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, *nad6*, *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *atp6*, *atp8* e *atp9*) que codificam subunidades dos complexos da cadeia respiratória para metabolismo energético (KANG, *et al.*, 2017; YUAN *et al.*, 2017).

Em *A. bisporus* H97, foram observados 14 genes que representam genes mitocondriais típicos que codificam subunidades da cadeia de transporte de elétrons e do complexo ATP-sintase. Estes incluem sete subunidades do complexo de transporte de elétrons I (*nad1*, 2, 3, 4, 4L, 5 e 6), uma subunidade do complexo III (*cob*), três subunidades do complexo IV (*cox1*, 2 e 3), e três subunidades do complexo ATP-sintase (*atp6*, 8 e 9) (FÉRANDON *et al.*, 2013).

Os mitogenomas geralmente variam em tamanho de 12 kbp a mais de 235kbp, tal variação é causada principalmente por regiões intrônicas e derivadas de plasmídeos (JELEN, *et al.*, 2016; HIMMELSTRAND *et al.*, 2014). Introns de (de 0,15 a 4 kbp) e plasmídeos (que são os plasmídeos lineares do tipo invertido) (LANG *et al.*, 2007; KLASSEN E MEINHARDT, 2007) também são encontrados tipicamente em genes do mitogenoma fúngicos.

Os transposons dos fungos apresentam sequências repetidas são consideradas importantes para gerar diversidade genética e é uma consequência da evolução (PARK *et al.*, 2014). Os retrotransposons LTR chamados de *Long Terminal Repeat*, requerem um maquinário complexo para transcrição e incorporação do elemento em outro local. (EICKBUSH e JAMBURUTHUGODA., 2008), eles são capazes de se transcrever via transcrição reversa, eles são elementos genéticos móveis que amplificam em genomas eucarióticos por um mecanismo de copiar e colar e são frequentemente os principais contribuintes para a conteúdos repetitivos no genoma (SANTANA *et al.*, 2012). Os retrotransposons que não possuem repetições terminais longas são classificados como não-LTR. As TIR são famílias de transposons que incluem uma repetição invertida terminal tradicionalmente conservada de 50-200 pb (TAN *et al.*, 2011).

## 2.9. Sequenciamento genômico no gênero *Agaricus*

Morin *et al.*, (2012), sequenciou e publicou o genoma completo de *A. bisporus*, e as cepas H97 e JB137-S8. A cepa H97 resultou em um conjunto de genoma de 30.387.844 pares de bases. Noventa e duas sequências de marcadores genéticos selecionados ao longo dos 13 grupos de ligação (cromossomos) de *A. bisporus* foram mapeadas na montagem do genoma H97 para validar a ordem e a orientação dos 19 maiores scaffolds (> 50 kbp). A proporção de comprimentos físicos para distâncias genéticas em média é de 33 kbp/cM. Regiões sintênicas entre os scaffolds de *A. bisporus* e cromossomos do agárico taxonomicamente relacionado *C. cinerea* eram aparentes após o alinhamento de scaffolds de *A. bisporus* com o conjunto de cromossomos de 36 Mb de *C. cinerea*. Os 19 scaffolds mais longos cobriram todos os 13 cromossomos de *C. cinerea*, com os maiores scaffolds de *A. bisporus* (1 a 6) alinhados com todo o comprimento dos cromossomos de *C. cinerea*. Os maiores blocos sintênicos ocorrem em regiões com baixas taxas de recombinação meiótica, sem elementos transponíveis (TEs) e espaçamento estreito de genes, onde genes ortólogos de cópia única estão super-representados (MORIN *et al.*, 2012) (Figura 11).

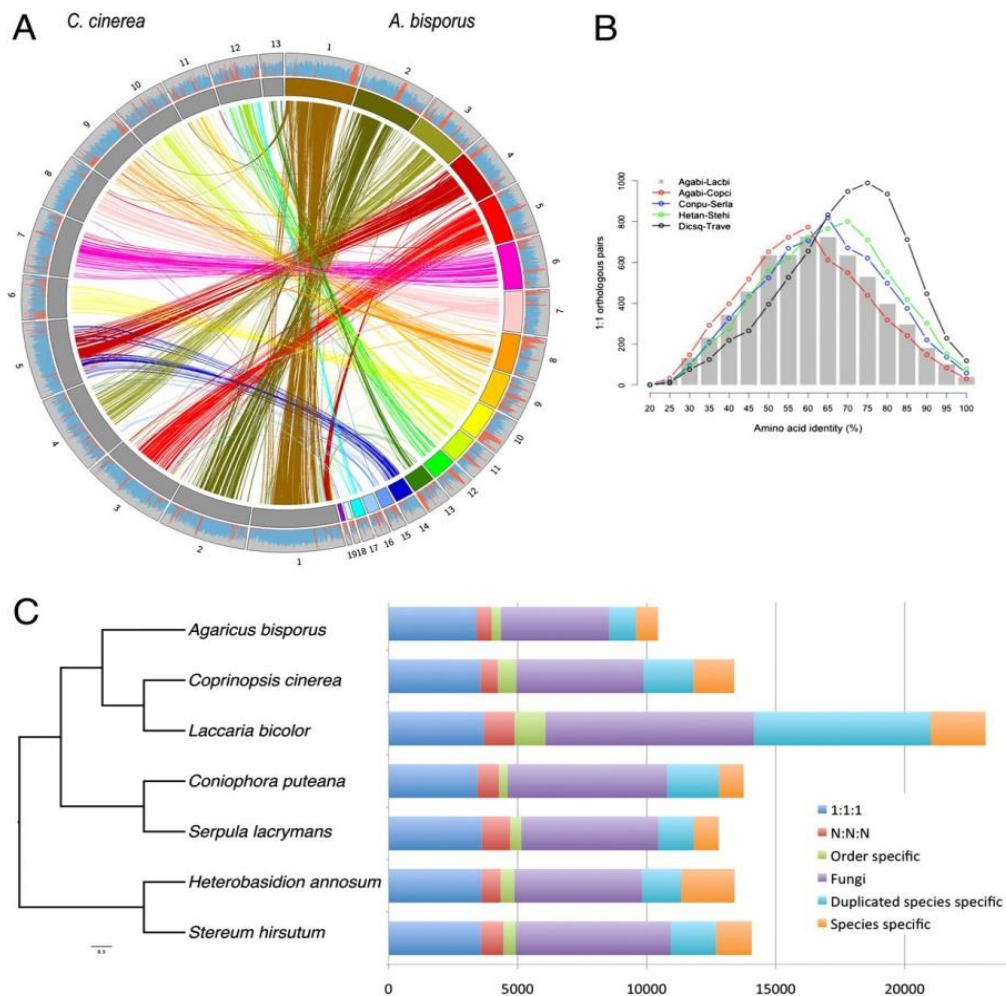
O segundo genoma, de *A. bisporus* var. *burnettii* cepa JB137-S8, foi sequenciado usando 454 piro-sequenciamento e Illumina HiSeq. A montagem final continha 52 scaffolds > 50 kbp. Milhares de elementos transponíveis repetidos individuais (transposons de classe I e II) pertencentes a 216 famílias diversas cobrem 11,2% do genoma. Os tempos de inserção estimados sugerem uma série de rajadas de retrotransposição de repetições de terminal longo semelhantes a Copia em <1 milhão de anos atrás. Os elementos transponíveis não estão uniformemente espalhados pelo genoma, mas são principalmente agrupados em regiões teloméricas e centroméricas. Vários TEs foram observados movendo-se ativamente de um local para outro dentro do genoma e isso fornece uma possível explicação para o desenvolvimento de anomalias, como estroma de dentro de culturas saudáveis e estáveis. Foram estimados 10.438 e 11.289 genes codificadores de proteínas nos genomas H97 e JB137-S8, respectivamente, combinando métodos baseados em homologia e *ab initio*, juntamente com 1.140.000 marcadores de sequência expressa. (MORIN *et al.*, 2012) (Figura 8). O genoma de *Agaricus bisporus* contém uma coleção de genes de degradação da lignina e, mais interessante, um número expandido de genes (em relação a outros fungos lignocelulósicos) que aumentam a degradação dos derivados da lignina, isto é, heme-tiolato peroxidases e  $\beta$ -eterases.

A respeito do escurecimento enzimático em *A. bisporus*, recentemente um pesquisador coreano, Yinong Yang, da Universidade da Pensilvânia (PENN STATE), ao nocautear apenas

um gene da polifenoloxidase (PPO) no genoma do cogumelo, o pesquisador conseguiu diminuir a atividade dessa enzima em 30%, o que mitigou efetivamente o escurecimento do cogumelo Paris. A única informação que se é conhecida é que essa característica é controlada por uma família de seis genes dentro do genoma desse fungo, porque o processo experimental ainda não foi divulgado e tais informações encontram-se obscuras e são de fato, muito necessárias para entender como a edição foi projetada e realizada (WALTZ, 2016).

Desta forma, a montagem e elucidação do genoma completo do cogumelo *A.subrufescens*, nos levará a uma melhor investigação sobre o número de genes da família da PPO. Entender como os genes da polifenoloxidase são regulados se faz essencial, pois o tempo de prateleira de *A. subrufescens* é extremamente curto. Através dos avanços em métodos de edição gênica, já se pode reduzir o escurecimento indesejável, melhorando assim a qualidade para consumo como alimento e otimizando o tempo de armazenamento desses cogumelos por um tempo ainda maior.

**Figura 11.** Ortologia e evolução do genoma de agaricomícetos



(A) Macrosintenia entre os scaffolds de *A. bisporus* var *bisporus* H97 e os cromossomos de *C. cinerea* Okayama 7. Os scaffolds de *A. bisporus* são representados por blocos coloridos e os cromossomos de *C. cinerea* são representados por blocos cinza. Apenas regiões maiores do que 5.000 bp são conectadas com links de cores correspondentes às usadas para colorir scaffolds de *A. bisporus*. As distribuições de regiões codificantes de proteínas e elementos repetitivos são mostradas no círculo externo, com densidade de genes codificadores de proteínas em azul e sequências repetitivas em vermelho, com um tamanho de janela de 0,1 Mb. A comparação entre as duas sequências de genomas foi realizada com VISTA (<http://genome.lbl.gov/vista>).

(B) A distribuição da identidade de aminoácidos em pares. O histograma mostra a distribuição da identidade de sequência de ortólogos 1: 1 entre *A. bisporus* e *L. bicolor* (divergiu ~85 milhões de anos atrás). Para destacar o nível semelhante de divergência molecular, ortólogos 1: 1 entre *A. bisporus* e *C. cinerea*, ortólogos 1: 1 de dois Boletales (*S. lacrymans* / *Coniophora puteana*), dois Russulales (*Heterobasidion annosum* / *Stereum hirsutum*) e dois Polyporales (*Trametes versicolor* / *Dichomitium squalens*) foram plotados em vermelho, azul, verde e preto, respectivamente.

(C) Atribuição de ortologia de sete genomas de Agaricomycetos. As barras são subdivididas para representar diferentes tipos de relações de ortologia. 1: 1: 1 indica genes universais de cópia única; N: N: N indica outros genes universais, mas a ausência em um único genoma dentro das diferentes ordens é tolerada. “Ordem específica” indica genes específicos de Polyporales-, Russulales-, Boletales- ou Agaricales; “Fungi” indica ortólogos específicos para fungos; “Específico de espécie duplicado” indica genes duplicados específicos de espécie; “Específico da espécie” indica genes específicos da espécie (órfãos).

Fonte: Reproduzido de MORIN *et al.*, (2012).



## REFERÊNCIAS

- ALLEN JF. Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: colocation for redox regulation of gene expression. **PNAS** 112(33):10231– 10238. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500012112> . 2015.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of the Association of Official Analytical Chemists. 17 ed. **Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, MD, USA; pp 190. 2000.
- AYEKA P.A. Potential of Mushroom Compounds as Immunomodulators in Cancer Immunotherapy: A Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. *Medicine* 2018: 7271509. doi: 10.1155/2018/7271509. 2018.
- BAO, D., GONG, M., ZHENG, H., CHEN, M., ZHANG, L., WANG, H., ... & TAN, Q. Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) genome. **PloS one**, 8(3), e58294. 2013.
- BARRENA, R., PAGANS, E., FALTYS, G., & SÁNCHEZ, A. Effect of inoculation dosing on the composting of source-selected organic fraction of municipal solid wastes. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, 81(3), 420-425. 2006.
- BARUFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N. Principais operações e processos unitários. In: **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: **Atheneu**. Cap.3, v.3, p.27-61. (Ciência, Tecnologia, Engenharia de Alimentos e Nutrição). 1998.
- BEFFA, T., BLANC, M., & ARAGNO, M. Obligately and facultatively autotrophic, sulfur- and hydrogen-oxidizing thermophilic bacteria isolated from hot composts. **Archives of microbiology**, 165(1), 34-40. 1996.
- BENTLEY, DAVID R. Whole-genome re-sequencing. **Current opinion in genetics & development**, 16.6: 545-552. 2006.
- BONONI, V. L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R. Cultivo de cogumelos comestíveis. São Paulo: **Ícone**, 206 p. 1995.
- BRANDENBURGER, E., BRAGA, D., KOMBRINK, A., LACKNER, G., GRESSLER, J., KÜNZLER, M., & HOFFMEISTER, D. Multi-genome analysis identifies functional and phylogenetic diversity of basidiomycete adenylate-forming reductases. **Fungal GenetiCST and Biology**, v. 112, p. 55-63, 2018.
- BRENNAN, M.; PORT, G. L.; PULVERENTI, A.; GORMLEY, R. The effect of sodium metabisulfite on the whiteness and keeping quality of sliced mushrooms. **Lebensmittel Wissenscchaft und Techonologie**, London, v. 32, n. 7, p. 460-463, 1999.
- BULLERWELL, C. E., & LANG, B. F. Fungal evolution: the case of the vanishing mitochondrion. **Current opinion in microbiology**, 8(4), 362-369. 2005.
- CAI Z-X, CHEN M-Y, LU Y-P, GUO Z-J, ZENG Z-H, LIAO J-H, et al. Metabolomics and transcriptomics unravel the mechanism of browning resistance in *Agaricus bisporus*. **PLoS ONE** 17(3): e0255765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255765>. 2022.

- CALVALCANTE J. L. R., V.F.F. GOMES, J.K. FILHO, M.T.D.A. MINHONI, M.C.N. DE ANDRADE. Cultivation of *Agaricus blazei* in the environmental protection area of the Baturité region under three types of casing soils. **Maringá**, 30 (4) pp. 513-517, 2008.
- CEFA. China Edible Fungus Association. The survey results for the edible fungus 2013 annual analysis of China Edible Fungus Association. <http://www.cef.com.cn/> (Accessed Janeiro, 2020). 2014.
- CHAKRAVARTY, B. Trends in mushroom cultivation and breeding. **Australian Journal of Agricultural Engineering**. Lethbridge, v.1, p.1, jan. 2011.
- CHEN, L., GONG, Y., CAI, Y., LIU, W., ZHOU, Y., XIAO, Y., ... & BIAN, Y. Genome sequence of the edible cultivated mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) reveals insights into lignocellulose degradation. **PloS one**, 11(8), e0160336. 2016.
- CHEN, S., XU, J., LIU, C., ZHU, Y., NELSON, D. R., ZHOU, S., ... & SUN, C. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Nature Communication** 3, 913 <https://doi.org/10.1038/ncomms1923> . 2012.
- CHENG, J., LUO, Q., REN, Y., LUO, Z., LIAO, W., WANG, X., & LI, Q. Panorama of intron dynamics and gene rearrangements in the phylum Basidiomycota as revealed by the complete mitochondrial genome of *Turbinellus floccosus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 105(5), 2017-2032. 2021.
- COLAUTO, N. B., DA SILVEIRA, A. R., DA EIRA, A. F., & LINDE, G. A. Alternative to peat for *Agaricus brasiliensis* yield. **Bioresource Technology**, 101(2), 712-716. (2010).
- COLAUTO, N.B.; EIRA, A.F.; LINDE, G.A. Cryopreservation of *A.blazei* in liquid nitrogen using DMSO as cryoprotectant. **Bioscience Journal**. v.28, n.6, p. 1034-1037, 2012.
- COLAUTO. N. S, A.R. DA SILVEIRA, A.F. DA EIRA, G.A. LINDE. Production flush of *Agaricus blazei* on Brazilian casing layers. **Brazilian Journal of Microbiology**, 42 pp. 616-623, 2011.
- CUMMINGS, W. J., CELERIN, M., CRODIAN, J., BRUNICK, L. K., & ZOLAN, M. E. Insertional mutagenesis in *Coprinus cinereus*: use of a dominant selectable marker to generate tagged, sporulation-defective mutants. **Current genetics**, 36(6), 371-382. 1999.
- DIAMANTOPOULOU, P., & PHILIPPOUSSIS, A. Cultivated mushrooms: preservation and processing. **Handbook of vegetable preservation and processing**, 495-525. 2015.
- DIAMANTOPOULOU, P.; PHILIPPOUSSIS, A. Production attributes of *Agaricus bisporus* white and off-white strains and the effect of calcium chloride irrigation on productivity and quality. **Scientia Horticulturae**, Athens, v. 91, p. 379-391, 2001.
- DIAS, E.S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.4, p.795-803, 2010. Disponível em: Acesso em: 29 nov. 2012. doi: 10.1590/S1413- 70542010000400001. 2010.
- DUAN, Z., XING, Z., SHAO, Y., & ZHAO, X. Effect of electron beam irradiation on postharvest quality and selected enzyme activities of the white button mushroom, *Agaricus bisporus*. **Journal of agricultural and food chemistry**, 58(17), 9617-9621. 2010.

- DUTREUX, F., DA SILVA, C., D'AGATA, L. *et al.* *De novo* assembly and annotation of three *Leptosphaeria* genomes using Oxford Nanopore MinION sequencing. **Scientific Data**, 5, 180235. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.2018>. 2018.
- EICKBUSH, T. H., & JAMBURUTHUGODA, V. K. The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases. **Virus research**, 134(1-2), 221-234. 2008.
- EIRA, A. D. Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murrill) SS Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.). Viçosa: **Aprenda Fácil**. 2003
- FÉRANDON, C., XU, J., & BARROSO, G. The 135 kbp mitochondrial genome of *Agaricus bisporus* is the largest known eukaryotic reservoir of group I introns and plasmid-related sequences. **Fungal Genetics and Biology**, 55, 85-91. 2013.
- FERMOR, T. R.; RANDLE, P. E.; SMITH, J. F. Compost as a substrate and its preparation. In: FLEGG, P. B.; SPENCER, D. M.; WOOD, D. A. (Ed.) *The biology and technology of the cultivated mushroom*. **Chichester: John Wiley**. cap. 6, p. 81-109. 1985
- FERMOR, T., LINCOLN, S., NOBLE, R., DOBROVIN-PENNINGTON, A., & COLAUTO, N. Microbiological properties of casing. **Mushroom Science**, 15(1), 447-454. 2000.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, 6 (1), 36-41. 2008.
- FOURIE, G, VAN DER MERWE, NA, WINGFIELD, BD, BOGALE, M, WINGFIELD, MJ, STEENKAMP, ET: Mitochondrial introgression and interspecies recombination in the *Fusarium fujikuroi* species complex. vol. 9, issue 1, pp. 37-48. **IMA Fungus**. doi: 10.5598/imafungus.2018.09.01.04. 2018.
- FURLANI, R. P.Z.; GODOY, H.T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, n. 64, v.2, p.149-154, 2005.
- GAO, M., FENG, L., & JIANG, T. Browning inhibition and quality preservation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) by essential oils fumigation treatment. **Food Chemistry**, 149, 107-113. 2014.
- GOLUEKE, C. G. Bacteriology of composting. **Biocycle**, 33(1), 55-57. 1992.
- GOMES, M. R. A., & LEDWARD, D. A. Effect of high-pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases. **Food Chemistry**, 56(1), 1-5. 1996.
- GONG, W., WANG, Y., XIE, C., ZHOU, Y., ZHU, Z., & PENG, Y. Whole genome sequence of an edible and medicinal mushroom, *Hericium erinaceus* (Basidiomycota, Fungi). **Genomics**, 112(3), 2393-2399. 2020.
- GONZAGA, M.L.C., BEZERRA, D.P., ALVES, A.P.N.N. *et al.* In vivo growth inhibition of Sarcoma 180 by an  $\alpha$ -(1-4)-glucan- $\beta$ -(1-6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murrill. **Journal of Natural Medicine**, 63 pp. 32-40, 2009.
- GOODWIN, S., GURTOWSKI, J., ETHE-SAYERS, S., DESHPANDE, P., SCHATZ, M. C., & MCCOMBIE, W. R. Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and de novo assembly of a eukaryotic genome. **Genome research**, v. 25, n. 11, p. 1750-1756, 2015.
- GRAY, M. W., BURGER, G., & LANG, B. F. Mitochondrial evolution. **Science**, 283(5407), 1476-1481. 1999.

GRIGORIEV, I. V., NIKITIN, R., HARIDAS, S., KUO, A., OHM, R., OTILLAR, R., ... & SHABALOV, I. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D699-D704, 2014.

GRIGORIEV, I. V., NORDBERG, H., SHABALOV, I., AERTS, A., CANTOR, M., GOODSTEIN, D., ... & DUBCHAK, I. The genome portal of the department of energy joint genome institute. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D26-D32, 2012.

GU, N. H., ZHAO, W. L., WANG, G. S., & SUN, F. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 17, 1-12. 2019.

GÜRBÜZ, G., & HEINONEN, M. LC-MS. Investigations on interactions between isolated  $\beta$ -lactoglobulin peptides and lipid oxidation product malondialdehyde. **Food chemistry**, 175, 300-305. 2015.

HENZE, K., & MARTIN, W. Evolutionary Biology: Essence of mitochondria. **Nature**, 426(6963), 127-128. 2003.

HIKICHI, M., HIROE, E. AND OKUBO, S. Protein polysaccharide 0041. **European Patent** 0939082, 9 January 1999.

HIMMELSTRAND, K., OLSON, Å., BRANDSTRÖM DURLING, M., KARLSSON, M., & STENLID, J. Intronic and plasmid-derived regions contribute to the large mitochondrial genome sizes of *Agaricomycetes*. **Current Genetics**, 60, 303-313. (2014).

HODKINSON, B. P.; GRICE, E. A. Next-generation sequencing: a review of technologies and tools for wound microbiome research. **Advances in wound care**, v. 4, n. 1, p. 50-58, 2015.

HU, Y. H., CHEN, C. M., XU, L., CUI, Y., YU, X. Y., GAO, H. J., ... & CHEN, Q. X. Postharvest application of 4-methoxy cinnamic acid for extending the shelf life of mushroom (*Agaricus bisporus*). **Postharvest Biology and Technology**, 104, 33-41. 2015.

ISTACE, B., FRIEDRICH, A., D'AGATA, L., FAYE, S., PAYEN, E., BELUCHE, O., ... & AURY, J. M. De novo assembly and population genomic survey of natural yeast isolates with the Oxford Nanopore MinION sequencer. **Giga Science** 6, 1-13, 10.1093/gigascience/giw018. 2017.

JAWORSKA, G., BERNAŚ, E., BIERNACKA, A., & MACIEJASZEK, I. Comparison of the texture of fresh and preserved *Agaricus bisporus* and *Boletus edulis* mushrooms. **International journal of food science & technology**, 45(8), 1659-1665. 2010.

JELLEN, V., JONGE, RD, VAN, DE PEER, Y., JAVORNIK, B. & JAKŠE, J. Completo genoma mitocondrial do *Verticillium-murcha* causando patógeno vegetal *Verticillium nonalfalae*. **PLoS ONE**, 11 (2), e0148525; 10.1371/journal.pone.0148525. 2016.

JIANG, T. Effect of alginate coating on physicochemical and sensory qualities of button mushrooms (*Agaricus bisporus*) under a high oxygen modified atmosphere. **Postharvest biology and technology**, 76, 91-97. 2013.

JIMENEZ, M.; GARCÍA-CARMONA, F. The effect of sodium dodecyl sulphate on polyphenoloxidase. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1503-1509, 1996.

- JUAN, K. A. N., WANG, H. M., JIN, C. H., & XIE, H. Y. Changes of reactive oxygen species and related enzymes in mitochondria respiratory metabolism during the ripening of peach fruit. **Agricultural Sciences in China**, 9(1), 138-146. 2010.
- JÚNIOR, P. J. G., TOMIZAWA, M. M., SCHWAN, R. F., RINKER, D. L., & DIAS, E. S. Nutritional requirements for growth of *Agaricus brasiliensis*. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, 33(1), 93-97. 2011.
- KADER, A. A. Quality assurance of harvested horticultural perishables. In: **IV International Conference on Postharvest Science** 553. p. 51-56. 2000.
- KANG, L.X. HU, P. SHEN, R. LI, D. LIU. SMRT sequencing revealed Mitogenome characteristics and Mitogenome-wide DNA modification pattern in *Ophiocordyceps sinensis*. **Frontiers in Microbiology**., 8 p. 1422. 2017.
- KAPOOR, JN Mushroom Cultivation; Departamento de Micologia e Fitopatologia, **IARI**: Nova Deli, Índia, 14-15. 2004.
- KARAMITROS, T., HARRISON, I., PIORKOWSKA, R., KATZOURAKIS, A., MAGIORKINIS, G., & MBISA, J. L. De novo assembly of human herpes virus type 1 (HHV-1) genome, mining of non-canonical structures and detection of novel drug-resistance mutations using short-and long-read next generation sequencing technologies. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157600, 2016.
- KASIANOWICZ, J. J.; BRANDIN, E.; BRANTON, D.; DEAMER, D. W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 24, p. 13770–13773. 1996.
- KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 12-24, 2005.
- KIYAMA, R., FURUTANI, Y., KAWAGUCHI, K. *ET AL*. Genome sequence of the cauliflower mushroom *Sparassis crispa* (Hanabiratake) and its association with beneficial usage. **Scientific Reports** 8, 16053 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34415-6> . 2018.
- KLASSEN, F. R. MEINHARDT. Linear protein primed replicating plasmids in eukaryotic microbes. F. Meinhardt, R. Klassen (Eds.), **Microbial Linear Plasmids**, Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 188-226. 2007.
- KOPYTOWSKI FILHO, J, M.T.A. MINHONI, A. RODRIGUEZ ESTRADA. *Agaricus blazei* ‘the Almond Portobello’: cultivation and commercialization. Am. **Mushroom Institute**., 54, pp. 22-28. 2006.
- KOPYTOWSKI FILHO, J. Relação C/N e proporção das fontes nitrogenadas na produtividade de *Agaricus blazei* Murril e poder calorífico do composto. 2002. 101 f. **Dissertacao (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) Faculdade de Ciencias Agronomicas**, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
- KUYPER, L.; WELNERT, I. A. C.; MCGILL, A. E. J. The effect of modified atmosphere packaging and addition of calcium hypochloride on the atmosphere composition, colour and microbial quality of mushrooms. **Lebensmittel Wissenschaft uund Tchonology**, London, v. 26, n. 1, p. 14-20, 1993.

- LABORDE, J.; LANZI, G.; FRANCESCUTTI, B.; GIORDANI, E. Indoor composting: general principles and large-scale development in Italy. In: CHANG, S. T.; BUSWELL, J. A.; CHIU, S. W. (Ed.) **Mushroom biology and mushroom products**. Hong Kong: Chinese University Press. p. 93-113. 1993.
- LLARENA-HERNÁNDEZ, C. R., LARGETEAU, M. L., FERRER, N., REGNAULT-ROGER, C., & SAVOIE, J. M. Optimization of the cultivation conditions for mushroom production with European wild strains of *Agaricus subrufescens* and Brazilian cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 94(1), 77-84. (2014).
- LAN, B.F. M.J. LAFOREST, G. BURGER. Mitochondrial introns: a critical view. **Trends Genet.**, 23 (3), pp. 119-125. 2007.
- LAURILA, A.; KUJASALO, J.; RANTA, E. Predator-induced changes in life history in two anuran tadpoles: effects of predator diet. **Oikos**, v.83, p.307-317, 1998.
- LEE, Y. Y., VIDAL-DIEZ DE ULZURRUN, G., SCHWARZ, E. M., STAJICH, J. E., & HSUEH, Y. P. Genome sequence of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* strain PC9. **G3**, 11(2), jkaa008. 2021.
- LEVITZ, S.M. Innate recognition of fungal cell walls. **PLOS Pathogens**, 6 (4) (2010), p. e1000758, 10.1371/journal.ppat.1000758, 2010.
- LI, H., WU, S., MA, X., CHEN, W., ZHANG, J., DUAN, S., ... & DONG, Y. The genome sequences of 90 mushrooms. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 9982, 2018.
- LI, Q, REN, Y, XIANG, D, SHI, X, ZHAO, J, PENG, L, ZHAO, G: Comparative mitogenome analysis of two ectomycorrhizal fungi (*Paxillus*) reveals gene rearrangement, intron dynamics, and phylogeny of basidiomycetes. vol. 11, pp. 12. **IMA Fungus** doi: 10.1186/s43008-020-00038-8 2020.
- LI, T., ZHANG, J., GAO, X., CHEN, J., ZHENG, Y., GAO, Y., & QIU, L. The molecular mechanism for the ethylene regulation of postharvest button mushrooms maturation and senescence. **Postharvest Biology and Technology**, 156, 110930. 2019.
- LI, X, LI, L, BAO, Z, TU, W, HE, X, ZHANG, B, YE, L, WANG, X, LI, Q: The 287,403 bp mitochondrial genome of ectomycorrhizal fungus *Tuber calosporum* reveals intron expansion, tRNA loss, and gene rearrangement. vol. 11, pp. 591453. **Frontiers in Microbiology**. doi: 10.3389/fmicb.2020.591453. 2020.
- LOU, H., YE, Z., YUN, F., LIN, J., GUO, L., CHEN, B., & MU, Z. Targeted gene deletion in *Cordyceps militaris* using the split-marker approach. **Molecular biotechnology**, 60(5), 380-385. 2018.
- MANOLOPOULOU, E. et al. Evaluation of productivity and postharvest quality during storage of five *Agaricus bisporus* strains. **Journal of Food Quality**, Kalamata, v. 30, p. 646-663, 2007.
- MARTOS, E. T. Aditivos microbianos no processo de compostagem e na camada de cobertura para o cultivo do cogumelo *Agaricus brasiliensis*. **Dissertation**, Universidade Federal de Lavras. 2009.
- MAU, J.-L.; CHAO, G.-R.; WU, K.-T. Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v.49, p. 5461-5467, 2002.

- MENDONÇA, M. DE, M. C. KASUYA, A. CADORIN, A. JOÃO VIEIRA Chapter 8: *Agaricus blazei* cultivation for a living in Brazil. **Mushroom growers' handbook**, 2 pp. 208-218, 2005.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies—the next generation. **Nature reviews genetiCST**, v. 11, n. 1, p. 31, 2010.
- MILES, PHILIP G.; CHANG, SHU-TING. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. **CRC press**, 2004.
- MILLER, F. C., & MACAULEY, B. J. Substrate usage and odours in mushroom composting. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 29(1), 119-124. (1989).
- MINHONI, M. T. A.; KOPYTOWSKI FILHO, J.; ANDRADE, M. C. N. Cultivo Moderno de *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann. Botucatu: **UNESP**, Faculdade de Ciências Agrônômicas; Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 2005.
- MOHANTA, TK, BAE, H. The diversity of fungal genome. **Biological procedures online**. 17, 8 <https://doi.org/10.1186/s12575-015-0020-z> . 2015.
- MOLNAR-PERL, I.; FRIEDMAN, M. Inhibition of food browning by sulfur amino acids. 2. Fruit juices and protein-containing foods. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.38, p.1648-1651, 1990.
- MOQUET, F.; MAMOUN, M.; OLIVIER, J.M. *Pseudomonas tolaasii* and *tolaasin*: comparison of symptom induction on a wide range of *Agaricus blazei* strains. **FEMS Microbiology Letters**, v.142, p.99-103, 1996.
- MORIN, E., KOHLER, A., BAKER, A. R., FOULONGNE-ORIOU, M., LOMBARD, V., NAGYE, L. G., ... & MARTIN, F. Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 43, p. 17501-17506, 2012.
- MOROZOVA, O.; HIRST, M.; MARRA, M. A. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. **Annual review of genomiCST and human genetiCST**, v. 10, p. 135-151, 2009.
- MUNOZ-GOMEZ SA, WIDEMAN JG, ROGER AJ, SLAMOVITS CH. The origin of mitochondrial cristae from Alphaproteobacteria. **Molecular Biology Evolution** 34(4):943–956. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw298> . 2017.
- MYCOBANK. Disponível em: <<http://mycobank.com/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=247438&Fields=All>>. Acesso em: Janeiro, 2023.
- NAKASAKI, K., SASAKI, M., SHODA, M., & KUBOTA, H. Characteristics of mesophilic bacteria isolated during thermophilic composting of sewage sludge. **Applied Environmental Microbiology**, 49(1), 42-45. 1985.
- NERYA, O., ARIE, R. B., LUZZATTO, T., MUSA, R., KHATIV, S., AND VAYA, J. Prevention of *Agaricus bisporus* postharvest browning with tyrosinase inhibitors. **Postharvest Biology Technology**. 39, 272–277. doi: 10.1016/j.postharvbio.2005.11.001. 2006.

NINOMIYA, M.; UENO, Y.; SHIMOSEGAWA, T. Application of deep sequence technology in hepatology. **Hepatology Research**, v. 44, n. 2, p. 141–148. Wiley-Blackwell. 2013.

NOGUEIRA M.C., FURLAN J.P., VIEIRA F.R., RODRIGUES S., FILLET M.H., ALMEIDA M.T. Dynamics of the chemical composition and productivity of composts for the cultivation of *Agaricus bisporus* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**. 44:1139–1146. 2013.

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

OHM, R., DE JONG, J., LUGONES, L. *et al.* Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. **Nature Biotechnology**. 28, 957–963 <https://doi.org/10.1038/nbt.1643> . 2010.

PARDO-GIMÉNEZ, A., PARDO, J. E., DIAS, E. S., RINKER, D. L., CAITANO, C. E. C., & ZIED, D. C. Optimization of cultivation techniques improves the agronomic behavior of *Agaricus subrufescens*. **Scientific Reports**, 10(1), 1-9. 2020.

PARK, Y. J., BAEK, J. H., LEE, S., KIM, C., RHEE, H., KIM, H., ... & KONG, W. S. Whole genome and global gene expression analyses of the model mushroom *Flammulina velutipes* reveal a high capacity for lignocellulose degradation. **PloS one**, 9(4), e93560. 2014.

POP, M. Genome assembly reborn: recent computational challenges. **Briefings in bioinformatics**, Oxford Univ Press, v. 10, n. 4, p. 354–366, 2009.

QOMANOWSKY, M.; TALLEY, F.B.; ESKEW, R.K. Air drying of cultivated mushrooms. **Food Technology**, v.24, p.1020-1024, 1970.

ROBB, D.A. Tyrosinase. In: LONTIE, R. (Ed.). **Copper proteins and copper enzymes**. Boca Raton: CRC, v.2, p.207-241. 1984.

ROYSE, D. J. Effects of fragmentation, supplementation and the addition of phase II compost to 2nd break compost on mushroom (*Agaricus bisporus*) yield. **Bioresource technology**, 101(1), 188-192. 2010.

ROYSE, D. J., BAARS, J., & TAN, Q. Current overview of mushroom production in the world. Edible and medicinal mushrooms: **Technology and applications**, p. 5-13, 2017.

RÓZSA, S., MĂNIUȚIU, D. N., POȘTA, G., GOCAN, T. M., ANDREICA, I., BOGDAN, I., ... & LAZĂR, V. Influence of the Culture Substrate on the *Agaricus blazei* Murrill Mushrooms Vitamins Content. **Plants**, 8(9), 316. 2019.

SÁNCHEZ, J. E; ZIED, D. C; ALBERTO, E. Edible Mushroom production in the Americas. **Moving Toward Edible Fungi Industry 4.0**. p. 2-11, China. 2018.

SANTANA MF, SILVA JC, BATISTA AD, RIBEIRO LE, DA SILVA GF, et al. Abundance, distribution and potential impact of transposable elements in the genome of *Mycosphaerella fijiensis*. **BMC Genomics** 13: 720. 2012.



- SILVA, C. F., AZEVEDO, R. S., BRAGA, C., SILVA, R. D., DIAS, E. S., & SCHWAN, R. F. Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40(3), 590-600. 2009.
- SOUZA A.C.S., CORREA V.G., GONCALVES G.A., SOARES A.A., BRACHT A., PERALTA R.M. *Agaricus blazei* Bioactive compounds and their effects on human health: benefits and controversies. **Current Pharmaceutical Design**. 2017; 23:2807–2834. doi: 10.2174/1381612823666170119093719. 2017.
- STROM, P. F. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. **Applied Environmental Microbiology**, 50(4), 899-905. 1985.
- SUN, N.; ZHAO, T. Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs): A Highly Efficient and Versatile Tool for Genome Editing. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 7, 2013.
- SZÉKELY, A. J., SIPOS, R., BERTA, B., VAJNA, B., HAJDÚ, C., & MÁRIALIGETI, K. DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost. **Microbial ecology**, 57(3), 522-533. 2009.
- TAN, B. C., CHEN, Z., SHEN, Y., ZHANG, Y., LAI, J., & SUN, S. S. Identification of an active new mutator transposable element in maize. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, 1(4), 293-302. 2011.
- TANG, J. C., KANAMORI, T., INOUE, Y., YASUTA, T., YOSHIDA, S., & KATAYAMA, A. Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as detected by the quinone profile method. **Process Biochemistry**, 39(12), 1999-2006. (2004).
- TIQUIA, S. M. Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. **Journal of Applied Microbiology**, 92(4), 764-775. 2002.
- TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A., & ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource technology**, 72(2), 169-183. 2000.
- VÁMOS- VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, September, p. 49 -125, 1981.
- VAN DIJK, E. L., AUGER, H., JASZCZYSZYN, Y., & THERMES, C. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in GenetiCST**, v. 30, n. 9, p. 418-426, 2014.
- VAN DIJK, E. L., JASZCZYSZYN, Y., NAQUIN, D., & THERMES, C. The third revolution in sequencing technology. **Trends in GenetiCST**, 2018.
- VAN GRIESVEN, L. J. L. D. The cultivation of mushrooms. Horst: **Mushroom Experimental Station**. 367 p. 1988.
- VEDDER, P. J. C. Cultivo moderno del champignon. Madrid: **Mundi Prensa**, 369p. 1996.
- VENKATESH GOBI, V., RAJASANKAR, S., RAMKUMAR, M., DHANALAKSHMI, C., MANIVASAGAM, T., JUSTIN THENMOZHI, A., MOHAMED ESSA, M; CHIDAMBARAM, R.; *Agaricus blazei* extract attenuates rotenone-induced apoptosis through its mitochondrial protective and antioxidant properties in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Nutritional Neuroscience**. 21, 97–107. doi: 10.1080/1028415X.2016.1222332, 2018.

VILAS BOAS, E.V. de B. Avaliação nutricional dos alimentos. Lavras-MG: **UFLA**, v.1. 47p. 1999.

WALTZ, E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. **Nature News**, 532(7599), 293. 2016.

WAN, J. N., LI, Y., GUO, T., JI, G. Y., LUO, S. Z., JI, K. P., ... & YANG, R. H. Whole-Genome and Transcriptome Sequencing of *Phlebopus portentosus* Reveals Its Associated Ectomycorrhizal Niche and Conserved Pathways Involved in Fruiting Body Development. **Frontiers in microbiology**, 12. 2021.

WANG, Y., ZHAO, Y., BOLLAS, A. *et al.* Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. **Nature Biotechnology** 39, 1348–1365 <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x> 2021.

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L. A; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill. **International Journal of Medicinal Mushroom.**; v.4, p.267-290, 2002.

WISITRASSAMEEWONG, K., KARUNARATHNA, S. C., THONGKLANG, N., ZHAO, R., CALLAC, P., MOUKHA, S., ... & HYDE, K. D. *Agaricus subrufescens*: a review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riade, v. 19, n. 2, p. 131-146, Apr. 2012.

XU, J.-R.; BLUHM, B. H. **Fungal GenomiCST**. Springer, 2011.

XU, Y., TIAN, Y., MA, R., LIU, Q., & ZHANG, J. Effect of plasma activated water on the postharvest quality of button mushrooms, *Agaricus bisporus*. **Food chemistry**, 197, 436-444. 2016.

YANG, M. Q., ATHEY, B. D., ARABNIA, H. R., SUNG, A. H., LIU, Q., YANG, J. Y., ... & DENG, Y. High-throughput next-generation sequencing technologies foster new cutting-edge computing techniques in bioinformatics. **BMC genomics**, 10, 1-3.2009.

YAPAR, S.; HELVACI, S.S.; PEKER, S. Drying behavior of mushroom slices. **Drying Technology**, v.8, n.1, p.77-99, 1990.

YU, F., SONG, J., LIANG, J., WANG, S., & LU, J. Whole genome sequencing and genome annotation of the wild edible mushroom, *Russula griseocarnosa*. **Genomics**, 112(1), 603-614. 2020.

YUAN, Y., WU, F., SI, J., ZHAO, Y. F., & DAI, Y. C. Whole genome sequence of *Auricularia heimuer* (Basidiomycota, Fungi), the third most important cultivated mushroom worldwide. **Genomics**, 111(1), 50-58. 2019.

YUAN, C. X; FENG, Z. ZHANG, C. ZHANG. Complete mitochondrial genome of *Phytophthora nicotianae* and identification of molecular markers for the oomycetes. **Frontiers in Microbiology.**, 8 p. 1484. 2017.

ZHAO, R., KARUNARATHNA, S., RASPÉ, O., PARRA, L. A., GUINBERTEAU, J., MOINARD, M., ... & CALLAC, P. Major clades in tropical *Agaricus*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 51, n. 1, p. 279-296, 2011.

ZICARI, G.; RIVETTI, D.; SOARDO, V.; CERRATO, E. O cultivo do cogumelo *Agaricus bisporus* (Champignon) e alguns aspectos ambientais e de saúde. **Igiene e Sanita Publica**, 68, 435-446. 2012.

ZIED, D. C. Produtividade e teor de B-glucana de *Agaricus subrufescens* Peck (*Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann), em função de diferentes práticas de cultivo e conversões energéticas. 2011. 106 p. **Tese (Doutorado em Agronomia)** - Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, Botucatu, 2011.

ZIED, D. C., PARDO, J. E., TOMAZ, R. S., MIASAKI, C. T., & PARDO-GIMÉNEZ, A. Mycochemical characterization of *Agaricus subrufescens* considering their morphological and physiological stage of maturity on the traceability process. **BioMed research international**, 2017.

ZIED, D. C., PARDO-GIMÉNEZ, A., DE ALMEIDA MINHONI, M. T., BOAS, R. V., ALVAREZ-ORTI, M., & PARDO-GONZÁLEZ, J. E. Characterization, feasibility and optimization of *Agaricus subrufescens* growth based on chemical elements on casing layer. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 19(3), 343-347. 2012.

## **SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**

**ARTIGO 01**

**Artigo redigido conforme a norma para publicação periódica científica NBR6022 (ABNT, 2018)**

**UTILIZAÇÃO DE ADITIVOS BACTERIANOS DURANTE O PROCESSO DE COMPOSTAGEM PARA OBTENÇÃO DO SUBSTRATO DE CULTIVO DO COGUMELO *Agaricus subrufescens* ABL 04/49**

**RESUMO**

*Agaricus subrufescens*, é um cogumelo de origem natural brasileira que vem sendo relatado como produto com propriedades medicinais, utilizado como complemento alimentar. É uma fonte de renda alternativa e os cogumelos se destacam por possuírem elevada atividade metabólica e bioconversão, o que permite o seu cultivo em diversos resíduos agroindustriais, em pequenos espaços físicos, num curto período de tempo, durante praticamente o ano todo. O cultivo de *Agaricus subrufescens* em escala comercial no Brasil, necessita de desenvolvimento de tecnologias apropriadas, as quais são de grande valia e utilidade em países em desenvolvimento para pequenos produtores de cogumelos. O objetivo deste trabalho foi promover maior seletividade do substrato de cultivo e analisar a produtividade e eficiência biológica do cogumelo *Agaricus subrufescens* ABL 04/49, dentre outros parâmetros, cultivado em um composto à base de bagaço de cana e grama batatais (*Paspalum notatum*) adicionado de duas bactérias do gênero *Bacillus*. O composto foi preparado durante quatro semanas (28 dias) com bactérias assimiladoras de amônia como aditivos microbiológicos. Esses aditivos foram introduzidos no oitavo dia de compostagem para promover maior seletividade do substrato de cultivo e proporcionar aumento da produtividade dos cogumelos. Os tratamentos consistiram na inoculação de duas espécies de *Bacillus*, sendo *B. megaterium* (CCMA 1246) e *B. cereus* (CCMA 1235), em diferentes momentos da compostagem, os quais foram: T1 - 14 dias de compostagem; T2 – 21 dias de compostagem; e T3 – 28 dias de compostagem. Os resultados com valores médios de produtividade e eficiência biológica, MMC (massa média de cogumelos, tempo para o primeiro fluxo e número de cogumelos colhidos da linhagem de *A. subrufescens* ABL 04/49 em diferentes tempos de compostagem foram analisados pelo teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade, com o auxílio do programa SISVAR. Os resultados mostraram que os aditivos microbiológicos adicionados ao 8º dia de compostagem, com a combinação de bactérias (*B. megaterium*, *B. cereus*) podem ser usados como uma alternativa, sem a fase de condicionamento, no cultivo de *A. subrufescens* para acelerar a maturação do composto, diminuir o tempo de compostagem, aumentar a produtividade e produzir composto de cogumelos em pequena escala por pequenos produtores de cogumelos. As espécies *B. megaterium*, *B. cereus* podem ser utilizadas como aditivos microbiológicos no cultivo de *A. subrufescens* ABL 04/49.

**Palavras chave:** *Agaricus subrufescens*, compostagem, *Bacillus*, produtividade

## ABSTRACT

*Agaricus subrufescens*, is a mushroom of natural Brazilian origin that has been reported as a product with medicinal properties, used as a food supplement. It is an alternative source of income and mushrooms stand out for having high metabolic activity and bioconversion, which allows them to be cultivated in various agro-industrial waste, in small physical spaces, in a short period of time, practically all year round. The cultivation of *Agaricus subrufescens* on a commercial scale in Brazil requires the development of related technologies, which are of great value and usefulness in developing countries for small mushroom producers. The objective of this work was to promote greater selectivity of the cultivation substrate and analyze the productivity and biological efficiency of the mushroom *Agaricus subrufescens* ABL 04/49, among other interruptions, cultivated in a compound based on sugarcane bagasse and potato grass (*Paspalum Notatum*) added of two bacteria of the genus *Bacillus*. The compost was prepared for four weeks (28 days) with ammonia-assimilating bacteria as microbiological additives. These additives were introduced on the eighth day of composting to promote greater selectivity of the cultivation substrate and increase mushroom productivity. The treatments consisted of the inoculation of two species of *Bacillus*, *B. megaterium* (CCMA 1246) and *B. cereus* (CCMA 1235), at different times of composting, which were: T1 - 14 days of composting; T2 – 21 days of composting; and T3 – 28 days of composting. The results with average values of productivity and biological efficiency, MMC (average mass of mushrooms, time to the first flush and number of mushrooms collected from the *A. subrufescens* ABL 04/49 strain at different composting times were analyzed using the Scott-Knott with a 5% probability, with the help of the SISVAR program. The results showed that additional microbiological additives on the 8th day of composting, with the combination of bacteria (*B. megaterium*, *B. cereus*) can be used as an alternative, without the conditioning phase, in the cultivation of *A. subrufescens* to accelerate compost maturation, decrease composting time, increase productivity and produce mushroom compost on a small scale by small mushroom producers. can be used as microbiological additives in the cultivation of *A. subrufescens* ABL 04/49.

**Keywords:** *Agaricus subrufescens*, composting, *Bacillus*, productivity

## 1. INTRODUÇÃO

O cogumelo *Agaricus subrufescens*, comumente conhecido como Cogumelo do Sol (Royal Sun *Agaricus* ou Cogumelo da vida) de origem natural brasileira, vem sendo relatado como produto com propriedades medicinais, sendo um rico complemento alimentar muito utilizado em tratamentos terapêuticos em cápsulas (FIRENZUOLI *et al.*, 2008). Diversas doenças são tratadas com a utilização do cogumelo *A. subrufescens*, que, além de ser rico em diversos antioxidantes, apresenta outros benefícios, que podem ser atribuídos a componentes específicos intrínsecos destes fungos, destacando-se as glucanas, o ergosterol, as lectinas e alguns aminoácidos imunomoduladores como a arginina e a glutamina (AYEKA 2018; SOUZA *et al.*, 2017; VENKATESH, *et al.*, 2018).

Seu cultivo em condições de clima tropical o torna uma excelente alternativa de renda ao pequeno produtor (WISITRASSAMEEWONG *et al.*, 2012). A espécie exige temperaturas que estejam entre 25 e 30°C (ZHAO *et al.*, 2011) e seu cultivo se dá em substrato produzido a partir de diferentes resíduos agrícolas, utilizando processo semelhantemente ao utilizado para o cultivo de *A. bisporus* (LLARENA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Intervir nas receitas de formulação do composto pode ser bom negócio, influenciando assim a composição química e o conteúdo das substâncias bioativas do produto acabado. Além disso, se os produtos obtidos de uma receita específica de composto tiverem um alto nível de substâncias bioativas, e o nível de produção tiver uma alta produtividade e eficiência biológica, essa receita de composto também poderá ser feita no nível industrial (RÓZSA *et al.*, 2019).

A compostagem utilizada na produção dos compostos *Agaricus* pode ser definida como um processo biológico realizado por uma comunidade microbiana diversa, que atua decompondo a matéria orgânica, transformando-a em nutrientes mais simples (BARRENA *et al.*, 2006). Um aumento espontâneo da temperatura acontece durante a compostagem, tornando o composto seguro, ajudando a eliminar organismos patogênicos. Esse processo ocorre em duas fases distintas: na primeira, ocorre a degradação ativa da matéria orgânica, caracterizada pela elevação acentuada da temperatura em função da atividade intensa de microrganismos termofílicos, e, na segunda fase, ocorre a pasteurização e o condicionamento do composto, levando à sua estabilização e redução do teor de amônia (INSAM; BERTOLDI, 2007; ZHANG *et al.*, 2015).

Os microrganismos presentes no composto, tais como bactérias, actinobactérias e fungos termofílicos são fundamentais para a eficácia do processo de compostagem. Esses

microrganismos se adaptam à oferta de nutrientes que, por sua vez, alteram temperatura e os teores de dióxido de carbono, oxigênio, umidade, amônia, etc (TUOMELA *et al.*, 2000).

Figueiredo *et al.*, (2013) avaliaram a utilização de três aditivos microbianos na compostagem para cultivo de *A. subrufescens*, sendo duas bactérias (*B. megaterium* e *B. cereus*) e um fungo termofílico (*Scytalidium thermophyllum*). O melhor resultado foi obtido com a combinação dos três microrganismos, entretanto, os autores não testaram as combinações duas a duas, mas apenas os aditivos utilizados isoladamente e os três juntos. Considerando que o fungo *S. thermophyllum* é um microrganismo naturalmente presente na compostagem, cuja população é favorecida pela elevação natural da temperatura, é possível que a sua inoculação não seja tão necessária quanto a das bactérias, principalmente para o objetivo de assimilação da amônia.

Ribeiro *et al.*, (2017) mostraram que os inóculos bacterianos influenciaram o processo de compostagem, alterando a quebra da celulose e das hemiceluloses e provocando alterações na temperatura e nos níveis de nitrogênio ao longo do processo de compostagem. García *et al.* (2006) observaram que a utilização de inoculantes bacterianos (actinobactérias e bactérias do gênero *Bacillus*) no processo de compostagem, melhorou a qualidade do composto final e aumentou a produção de húmus final, obtendo um produto mais maduro no final do processo. Outros trabalhos analisaram o uso de inoculantes microbianos com a missão de acelerar a compostagem e relatando a obtenção de produto final melhor (ZENG *et al.*, 2009; FIGUEIREDO *et al.*, 2013).

Diante do exposto, o trabalho teve como objetivo avaliar a utilização apenas dos aditivos bacterianos como assimiladores de amônia durante diferentes períodos de compostagem para a produção do substrato de cultivo do cogumelo *Agaricus subrufescens* ABL 04/49.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local de realização das pesquisas**

O estudo foi realizado no Setor de Microbiologia/Laboratório de Cogumelos Comestíveis do Departamento de Biologia/Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### **2.2 Processo de compostagem**



A metodologia de produção do substrato de cultivo de *A. subrufescens* testado seguiu o processo de compostagem longa (28 dias) seguida de pasteurização a vapor, sem a fase de condicionamento.

Para o preparo do substrato de cultivo foi utilizada uma pilha de compostagem de aproximadamente 1 m de largura e 1,5 m de altura montada em pátio aberto. Foram utilizadas como matérias primas, o bagaço de cana-de-açúcar e a grama Batatais na proporção 1:1 (45 kg de bagaço de cana-de-açúcar e 45 kg de gramínea batatais). Para a pré-fermentação, não se utilizou a estrutura de madeira no primeiro dia. Em vez disso, a gramínea foi espalhada no piso, molhada abundantemente e depois revirada. Depois o bagaço de cana-de-açúcar foi espalhado sobre a gramínea, e também foi irrigado abundantemente, para que a mistura atingisse umidade entre 65 a 70%. No terceiro dia foi adicionada mais água ao substrato, para garantir uma umidade suficiente para conduzir o processo até o final. A pilha foi então revirada e transferida para a estrutura de madeira. Logo após, o composto foi revolvido a cada dois dias, e adicionou-se água sempre que necessário. Na quarta reviragem, o composto foi suplementado com 10 kg de farelo de trigo, 1 kg de superfosfato simples, 3 kg de calcário e 0,600 kg de ureia, tendo como base para o cálculo da suplementação, o peso seco total do substrato base.

As reviragens da pilha foram realizadas normalmente a cada dois dias, por um período de 14, 21 e 28 dias de compostagem. A temperatura do interior da pilha foi aferida a cada reviragem. Aos 15 e aos 28 dias, amostras foram retiradas para aferir pH e matéria seca. Ao final da pasteurização (dos tempos de 14, 21 e 28), o substrato foi acondicionado no túnel de pasteurização a vapor em caixas plásticas vazadas de supermercado nos respectivos tempos de compostagem (14, 21 e 28 dias), segundo os tratamentos.

Os tratamentos foram os seguintes:

**T1** - 14 dias de compostagem com adição de *Bacillus megaterium* (CCMA 1246) e *Bacillus cereus* (CCMA 1235);

**T2** – 21 dias de compostagem com adição de *Bacillus megaterium* (CCMA 1246) e *Bacillus cereus* (CCMA 1235);

**T3** – 28 dias de compostagem com adição de *Bacillus megaterium* (CCMA 1246) e *Bacillus cereus* (CCMA 1235);

### **2.3 Inoculação do substrato com os aditivos bacterianos**

Cada espécie bacteriana foi cultivada em frasco Erlenmeyer com 100 ml de Caldo Nutriente (0,2% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,3% NaCl; 0,3% extrato de carne; 0,5% peptona, pH 7,5),

totalizando 300 ml de caldo para cada microrganismo. As bactérias foram cultivadas em incubadora do tipo Shaker por 48 horas a 45°C, sob agitação constante de 100 rpm. Após o crescimento das bactérias, a concentração foi quantificada em espectrofotômetro a 600 nm, obtendo-se a densidade ótica de 0,8 OD.

**Figura 1.** Etapas do processo de produção de cogumelos *A.subrufescens* ABL 04/49 desde a compostagem , até a produção dos cogumelos.



Fonte: Do autor (2023)

Todos os inoculantes foram utilizados na concentração aproximada de  $10^6$  UFC  $g^{-1}$ . Essa concentração foi escolhida em função dos resultados obtidos por Silva *et al.*, (2009), que relataram uma população microbiana total durante a Fase I de compostagem entre  $10^7$  e  $10^8$  UFC  $g^{-1}$ . As culturas foram inicialmente diluídas em 10 L de água e adicionadas ao composto no 8º dia do processo de compostagem.

Ao final de cada tempo de compostagem (14, 21 e 28 dias), o substrato foi pasteurizado a 60° C/12h de vapor contínuo conforme descrito por Siqueira *et al.* (2009). A cada tempo de compostagem, foi retirada quantidade suficiente de composto para o desenho experimental.

#### 2.4 Preparo do spawn de *A. subrufescens*

Foi utilizada uma linhagem de *A. subrufescens* reconhecidamente produtiva (ABL 04/49), pertencente à Micoteca de coleção de fungos do da (FCAT/UNESP) de Dracena - SP.

A linhagem foi reativada e mantida em BDA (batata, dextrose e ágar), e incubadas em câmara BOD a 25°C. A cultura colonizada é considerada a matriz primária para o preparo do inoculante (matriz secundária) de *A. subrufescens*.

A matriz secundária foi preparada em substrato contendo 90% de arroz em casca e 10% de farelo de trigo, suplementado com 2% de gesso agrícola e 2% de calcário calcítico. O arroz foi cozido previamente por 30 minutos, como pré-tratamento para desinfestação e para absorver umidade, sendo drenado para retirar o excesso de água e deixado à parte. Paralelamente, o farelo de trigo foi previamente autoclavado a 121°C, por 30 minutos e misturado ao arroz, onde a umidade foi ajustada para 65°C. Em seguida foram acrescentados e misturados os demais suplementos, e então acondicionados em frascos com capacidade para 200g, tampados e autoclavados duas vezes por 2 horas com intervalo de 24 horas entre as autoclavagens. Após o resfriamento, depois de atingida a temperatura ambiente, os frascos foram inoculados com fragmentos de BDA colonizado com a linhagem de *Agaricus subrufescens* ABL 04/49. Os frascos inoculados foram incubados em sala com temperatura ambiente até que os mesmos estivessem completamente colonizados.

## **2.5 Inoculação e incubação do composto**

Após o resfriamento do composto, ao final da pasteurização (aproximadamente 24 horas para atingir a temperatura ambiente), o composto foi retirado do pasteurizador, homogeneizado e acondicionado em caixas plásticas com furos na parte inferior, sendo utilizados 5 kg de composto por caixa. Para a inoculação, foi utilizada uma proporção de 3% do inoculante (150g de Spawn por caixa), o qual foi bem misturado ao composto. Posteriormente as caixas foram fechadas para evitar a entrada de moscas e incubadas a temperatura ambiente. Após aproximadamente 20 dias de inoculação, no momento em que o composto já estava completamente colonizado, foram retiradas amostras aleatórias do composto para determinação da massa seca. Para isto, as amostras foram mantidas em estufa de ventilação forçada a 65°C por 48h. Os resultados de massa seca de cada tratamento foram utilizados, posteriormente, para os cálculos de eficiência biológica.

## **2.6 Indução da frutificação e colheita dos cogumelos**

Após a sua completa colonização, o composto foi coberto com aproximadamente 5 cm de camada de cobertura previamente preparada. A mistura utilizada para a camada de

cobertura foi definida de acordo com os resultados obtidos por Siqueira et al. (2009) e Martos et al. (2017): 60% terra de Latossolo Vermelho distroférico de horizonte B, adicionada 30% de calcário e 10% de areia. Esta mistura base foi denominada TCA (terra + calcário + areia). Para a obtenção do material final a ser utilizado como camada de cobertura, adicionou-se carvão vegetal moído, na proporção de 75% de TCA + 25% de carvão. Após ser triturado, o carvão foi lavado para eliminação do pó, ficando apenas os fragmentos. Após o preparo do material final, o pH foi aferido.

As caixas foram incubadas em sala de cultivo à temperatura ambiente, sendo a camada de cobertura mantida úmida durante todo o período de cultivo. Logo após a colonização parcial da camada de cobertura, realizou-se o “ruffling”, de acordo com Dias *et al.*, (2013). Após a colonização total da camada de cobertura, a umidade relativa do ar foi mantida em  $90\% \pm 5$ .

Os cogumelos foram colhidos quando apresentavam crescimento máximo possível, porém, antes de se iniciar a abertura do píleo. O excesso de terra da base do estipe foi removido com um pincel e os cogumelos foram contados, pesados e depois desidratados.

## 2.7 Cálculo da eficiência biológica e produtividade

A eficiência biológica corresponde à relação entre a massa de cogumelos frescos colhidos e a massa seca do composto, em percentagem (**EB = [massa de cogumelos frescos/massa de composto seco] x 100**). A produtividade pode ser definida de forma parecida, porém, considera-se a produção de cogumelos frescos por composto úmido (**P = [massa de cogumelos frescos/massa de composto úmido] x 100**).

## 2.8 Variáveis analisadas

Além da análise de produtividade e eficiência biológica, avaliou-se também: número de basidiomas, massa média de cogumelos (expressa em gramas) e tempo para o primeiro fluxo (tempo demandado para o primeiro fluxo, expresso em dias).

**Figura 2.** Aspectos morfológicos da cultura de *Agaricus subrufescens* linhagem ABL 04/49 em placa e dos basidiomas produzidos.



Legenda: (A) *ABL 04/49* em crescimento micelial em placa de petri, meio Ágar Composto. (B) Basidiocarpos de *ABL 04/49* em frutificação. (C) Basidiocarpó de *ABL 04/49* pós-colheita. (D) Corte longitudinal de um basidiocarpó de *ABL 04/49*.

Fonte: Do autor (2023)

## 2.9 Estatística

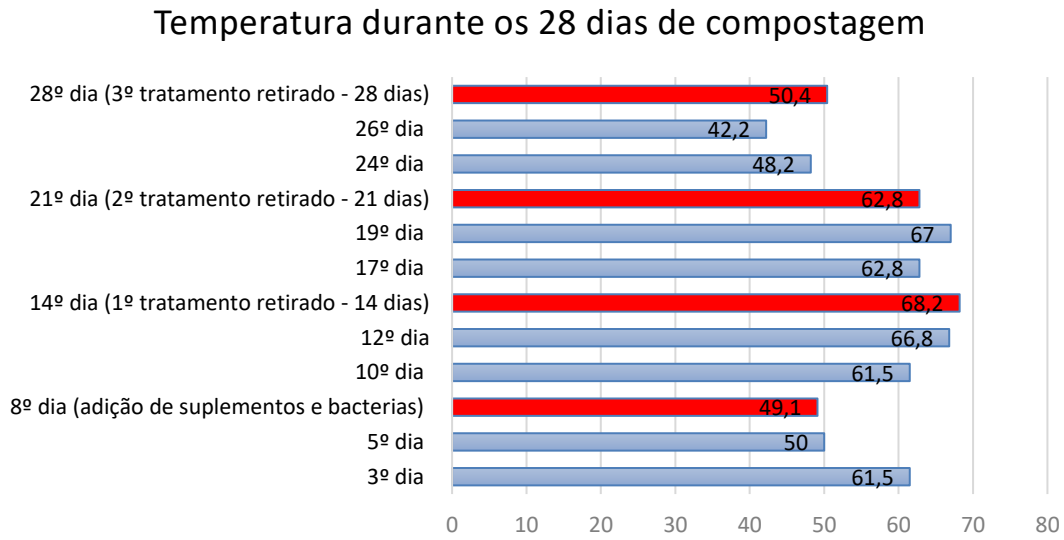
O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 3 tratamentos e 5 repetições, num total de 15 parcelas experimentais. Após obtenção da ANOVA, os dados quantitativos tiveram as médias avaliadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade com o auxílio do programa SISVAR – UFLA (FERREIRA, 2008).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de compostagem a temperatura oscilou entre 42,2°C e 68,2°C (Figura 2). Diversos fatores são responsáveis pela qualidade final e estabilidade do composto, como pH, nitrogênio, umidade, granulometria das partículas e a temperatura, sendo esta um dos principais fatores (ZHANG *et al.*, 2012). Neste trabalho, a temperatura elevou-se rapidamente, atingindo 61,1°C aos 3 dias de compostagem, a qual caiu rapidamente para 50°C

no 5º dia de compostagem, provavelmente em função da rápida assimilação dos açúcares prontamente solúveis no substrato. Após a adição dos suplementos e dos aditivos bacterianos no 8º dia, a temperatura voltou a elevar-se até atingir a temperatura máxima de 68,2°C no 14º dia.

**Figura 3.** Evolução da temperatura em todo o processo de compostagem durante os 28 dias.



Obs.: Barras em vermelho destacam o dia da adição de suplementos e aditivos microbianos e o dia de todos os tratamentos, respectivamente 14, 21, e 28 dias

Fonte: Do autor (2023)

Ribeiro *et al.* (2017) avaliaram a adição de inóculos de *B. cereus* e *B. megaterium* em 4 pilhas de compostagem e demonstraram que, com a adição desses inóculos, houve influência positiva nos valores de temperatura e na degradação tanto da celulose quanto da hemicelulose durante o período termofílico do processo de compostagem. A adição dos inóculos bacterianos influenciou o processo de compostagem, com alteração na degradação de celulose e hemicelulose, assim como na alteração da temperatura e níveis de nitrogênio ao longo da compostagem, resultando em melhorias de qualidade do composto final.

Conforme pode-se observar na tabela 1, os dados de produtividade (P) e eficiência biológica (EB) demonstram que a utilização apenas dos aditivos bacterianos é suficiente para garantir a qualidade do composto, mesmo no tempo mais curto de compostagem (14 dias). Na verdade, os resultados obtidos foram até superiores aos obtidos por Figueiredo *et al.*, 2013, que relataram uma produtividade 10,25 e 14,50% quando utilizaram *B. megaterium*, e *Bacillus cereus*, respectivamente e uma produtividade de 18,75% com a utilização do

consórcio entre bactérias (*B. megaterium* + *B. cereus*) e o fungo *Scytalidium thermophilum*. Esses valores, mesmo que menores aos encontrados neste trabalho, demonstram que, com apenas a adição de um aditivo microbiano no processo de compostagem, já foi o suficiente para se obter um composto de qualidade, semelhante aos substratos produzidos no Brasil usando o sistema convencional (Fases I e II). Zied *et al.* (2010) usando diferentes camadas de cobertura obteve média de 15,5% de produtividade, enquanto que Siqueira *et al.* (2011) relataram produtividade entre 10 e 13,28% em função de diferentes teores iniciais de nitrogênio no composto. Colauto *et al.* (2010), testando materiais alternativos à turfa como camada de cobertura, obtiveram produtividade de 11,8%. No presente trabalho, a produtividade foi de 24,3% para o substrato obtido com apenas 14 dias de compostagem, o qual não distinguiu estatisticamente do substrato obtido com 28 dias de compostagem. Isso significa que, ao se utilizar os aditivos bacterianos, não há necessidade de se prolongar a compostagem com o intuito de se amenizar o problema da amônia no composto, uma vez que as espécies bacterianas utilizadas são eficientes na assimilação da mesma.

Curiosamente, a produtividade no substrato obtido com 21 dias de compostagem foi significativamente inferior aos demais, o que não parece ser justificado a não ser por variáveis não controladas neste experimento. Mesmo para este tratamento, o valor de 16,3% pode ser considerado um excelente valor de produtividade para este cogumelo. Dias *et al.*, (2013) obtiveram a melhor produtividade (18,7%) ao utilizar composto canadense produzido segundo a mesma tecnologia utilizada para o cultivo do cogumelo Champignon, além de usar turfa canadense como camada de cobertura e a técnica de ruffling. Portanto, esses resultados não apenas confirmam a eficácia biotecnológica relatada por Figueiredo *et al.*, (2013) para a utilização de aditivos microbianos na compostagem, mas demonstram também que é possível utilizar apenas os aditivos bacterianos e que o sistema funciona bem, mesmo que a formulação do composto seja modificada. Enquanto que Figueiredo *et al.*, (2013) utilizaram substrato à base de bagaço de cana e feno de coast-cross, neste trabalho, a grama batatais foi utilizada em substituição ao feno de coast-cross.

Semelhantemente, quando se avalia os dados de eficiência biológica (Tabela 1), observa-se valores dificilmente encontrados em outros trabalhos. O menor resultado foi de 71,2% para 21 dias de compostagem, enquanto que, para 14 e 28 dias de compostagem, a EB foi de 92,08 e 97,68% respectivamente, não se diferenciando estatisticamente entre si. Para todos os trabalhos encontrados, os melhores resultados de EB dificilmente chegam a 60%, como os relatados por Siqueira *et al.*, (2009) e Martos *et al.*, (2017), os quais relataram valores de 54,6 e 56,1%, respectivamente. O melhor resultado de EB foi relatado por Pardo-

Gimenez *et al.*, (2020), os quais obtiveram um valor de 60,6% de EB quando fizeram a suplementação do composto de cultivo com o produto comercial Champfood®. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho com a utilização dos aditivos bacterianos são realmente dignos de nota e demonstram a importância biotecnológica de utilização desses aditivos, em especial para os processos de baixa tecnologia dos países em desenvolvimento.

**Tabela 1.** Valores médios de produtividade e eficiência biológica, tempo para o primeiro fluxo, número de cogumelos colhidos, MMC (massa média de cogumelos), da linhagem de *A. subrufescens* ABL 04/49 em diferentes tempos de compostagem adicionada de *Bacillus megaterium* (CCMA1246) e *Bacillus cereus* (CCMA 1235).

Tratamentos	Produtividade (%)	Eficiência Biológica (%)	Tempo para o primeiro fluxo (dias)	Nº de cogumelos	MMC (kg)
T1 - 14 dias	24,3 a	92,1 a	49,5 b	23 a	52,86 a
T2 - 21 dias	16,3 b	71,2 b	46,2 b	22 a	37,15 b
T3 - 28 dias	27,0 a	97,7 a	33,8 a	29 a	46,56 a
CV (%)	11,2	12,4	7,34	25,17	11,1

\*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de significância de 5%.

Fonte: Do autor (2023).

Não se observou diferenças significativas quanto ao número médio de basidiomas entre os tratamentos, os quais foram praticamente idênticos entre T1 e T2. Para T1 e T3, o número médio foi de 23 e 29, entretanto, sem diferença significativa. Conseqüentemente, a massa média de cogumelos foi similar entre T1 e T3, mas estes foram superiores ao T2. Considerando que o tamanho dos basidiomas constitui um fator importante na qualidade comercial deste cogumelo, mais uma vez, a obtenção do substrato de cultivo com 14 dias de compostagem mostra-se mais adequado para este propósito.

Quanto ao tempo médio para o primeiro fluxo, o tratamento de 28 dias de compostagem apresentou o tempo mais curto para o primeiro fluxo com 33 dias, se diferenciando estatisticamente dos demais, os quais apresentaram um tempo médio de 49,5 e 46,2 dias para 14 e 21 dias de compostagem, respectivamente. Neste contexto, é importante levar em consideração se valeria a pena estender o tempo de compostagem em duas semanas para alcançar uma precocidade maior na produção dos cogumelos. O substrato obtido por uma compostagem mais longa resultaria numa produção de cogumelos cerca de 16 dias mais cedo do que o substrato obtido com apenas duas semanas de compostagem. Entretanto, novos estudos deverão ser conduzidos para confirmar esses dados.



#### 4. CONCLUSÃO

A utilização de um consórcio de bactérias no processo de compostagem (*B. megaterium*, *B. cereus*) pode ser usada como uma alternativa (sem utilizar a fase de condicionamento) no cultivo do cogumelo *A. subrufescens* para acelerar a maturação do composto, diminuir o tempo de compostagem, aumentar a produtividade e aumentar a bioconversão, podendo ser aplicada em pequena escala por pequenos produtores de cogumelos, sem a necessidade de uma estrutura de condicionamento do composto.

## REFERÊNCIAS

- AYEKA P.A. Potential of Mushroom Compounds as Immunomodulators in Cancer Immunotherapy: A Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2018: 7271509. doi: 10.1155/2018/7271509. 2018.
- COLAUTO NB, SILVEIRA AR, EIRA AF, LINDE GA. Alternative to peat for *Agaricus brasiliensis* yield. **Bioresource Technology**. 101:712-716. (2010).
- DIAS, E.S.; ZIED, D.C.; RINKER, D. L. Physiologic response of *Agaricus subrufescens* using different casing materials and practices applied in the cultivation of *Agaricus bisporus*. **Fungal Biology**, Volume 117, Issues 7–8, July–August, Pages 569-575, 2013.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium** (Lavras), v. 6, p. 36-41, 2008.
- FIGUEIREDO, V. R., MARTOS, E. T., SIQUEIRA, F. G., MACIEL, W. P., SILVA, R. D., RINKER, D. L., & DIAS, E. S. Microbial inoculation during composting improves productivity of sun mushroom (*Agaricus subrufescens* Peck). **African Journal of Microbiology Research**, 7(35): 4430-4434, 2013.
- FIRENZUOLI, F., GORI, L., & LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei Murrill*: review of literature and pharmaco-toxicological problems. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, 5(1), 3-15. (2008).
- DEL CARMEN VARGAS-GARCÍA, M., SUÁREZ-ESTRELLA, F. F., LÓPEZ, M. J., & MORENO, J. Influence of microbial inoculation and co-composting material on the evolution of humic-like substances during composting of horticultural wastes. **Process Biochemistry**, 40(6):1438-1443, 2006.
- INSAM, H.; BERTOLDI, M. Microbiology of the composting process. **Compost Science and Technology**, Waste Management Series, Elsevier Ltd: p. 25-48, 2007.
- LLARENA-HERNÁNDEZ, C. R., LARGETEAU, M. L., FERRER, N., REGNAULT-ROGER, C., & SAVOIE, J. M. Optimization of the cultivation conditions for mushroom production with European wild strains of *Agaricus subrufescens* and Brazilian cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 94(1), 77-84. (2014).
- MARTOS, E. T.; ZIED, D. C.; JUNQUEIRA, P. P. G. ; RINKER, D. L. ; SILVA, R.; TOLEDO, R. C. C.; DIAS, E. S. Casing layer and effect of primordia induction in the production of *Agaricus subrufescens* mushroom. **Agriculture and Natural Resources**, v.51, p. 231-234, 2017.
- PARDO-GIMÉNEZ, ARTURO; PARDO, JOSÉ EMILIO; DIAS, EUSTÁQUIO SOUZA; RINKER, DANNY LEE; CAITANO, CINTHIA ELEN CARDOSO; ZIED, DIEGO CUNHA. Optimization of cultivation techniques improves the agronomic behavior of *Agaricus subrufescens*. **Scientific Reports**, v. 10, p. 8154, 2020.
- RIBEIRO, N. D. Q., SOUZA, T. P., COSTA, L. M. A. S., CASTRO, C. P. D., & DIAS, E. S. Microbial additives in the composting process. **Ciência e Agrotecnologia**, 41, 159-168. (2017).

- RÓZSA, S., MĂNIUȚIU, D. N., POȘTA, G., GOCAN, T. M., ANDREICA, I., BOGDAN, I., ... & LAZĂR, V. Influence of the Culture Substrate on the *Agaricus blazei* Murrill Mushrooms Vitamins Content. **Plants**, 8(9), 316. 2019.
- SILVA C, F; AZEVEDO R, S; BRAGA C; SILVA R; DIAS E, S; SCHWAN R, F. Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis*. **Brazilian Journal in Microbiology**. 40 (3):590-600. (2009).
- SIQUEIRA F, G, DIAS E, S, SILVA R, MARTOS E, T, RINKER D, L. Cultivation of *Agaricus blazei* ss. Heinemann using different soils as source of casing materials. **Scientia Agricola**. 66 (6):827-830. (2009).
- SIQUEIRA FG, MARTOS ET, SILVA EG, SILVA R, DIAS ES. Biological efficiency of *Agaricus brasiliensis* cultivated in compost with nitrogen concentrations. **Horticultura Brasileira** 29:157-161. (2011).
- SOUZA A.C.S., CORREA V.G., GONCALVES G.A., SOARES A.A., BRACHT A., PERALTA R.M. *Agaricus blazei* Bioactive Compounds and their Effects on Human Health: Benefits and Controversies. **Current Pharmaceutical Design**. 2017; 23:2807–2834. doi: 10.2174/1381612823666170119093719. 2017.
- TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A., & ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource technology**, 72(2), 169-183. 2000.
- VENKATESH GOBI, V., RAJASANKAR, S., RAMKUMAR, M., DHANALAKSHMI, C., MANIVASAGAM, T., JUSTIN THENMOZHI, A., MOHAMED ESSA, M; CHIDAMBARAM, R;. *Agaricus blazei* extract attenuates rotenone-induced apoptosis through its mitochondrial protective and antioxidant properties in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Nutritional Neuroscience**. 21, 97–107. doi: 10.1080/1028415X.2016.1222332, 2018.
- VIEIRA JUNIOR, W. G., CENTEIO CARDOSO, R. V., FERNANDES, Â., FERREIRA, I. C. F. R., BARROS, L., PARDO-GIMÉNEZ, A., ... & ZIED, D. C. Influence of strains and environmental cultivation conditions on the bioconversion of ergosterol and vitamin D2 in the sun mushroom. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 102(4), 1699-1706. (2022).
- WISITRASSAMEEWONG, K., KARUNARATHNA, S. C., THONGKLANG, N., ZHAO, R., CALLAC, P., MOUKHA, S., ... & HYDE, K. D. *Agaricus subrufescens*: a review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riade, v. 19, n. 2, p. 131-146, Apr. 2012.
- ZENG, G. M., HUANG, H. L., HUANG, D. L., YUAN, X. Z., JIANG, R. Q., YU, M., ... & LIU, X. L. Effect of inoculating white-rot fungus during different phases on the characteristics of humic acid. **Chemosphere**, 68(4):368-374, 2009.
- ZHANG, L.; SUN, X. Effects of earthworm casts and zeolite on the two-stage composting of green waste. **Waste Management**, 39:119-129, 2015.
- ZHAO, R., KARUNARATHNA, S., RASPÉ, O., PARRA, L. A., GUINBERTEAU, J., MOINARD, M., ... & CALLAC, P. Major clades in tropical *Agaricus*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 51, n. 1, p. 279-296, 2011.
- ZIED, D. C., PARDO GIMENEZ, A., PARDO GONZALEZ, J. E., SOUZA DIAS, E., CARVALHO, M. A., & MINHONI, M. T. D. A. Effect of cultivation practices on the  $\beta$ -

glucan content of *Agaricus subrufescens* basidiocarps. **Journal of agricultural and food chemistry**, 62(1), 41-49. (2014).

ZIED DC, MINHONI MTA, KOPYTOWSKI-FILHO J, ANDRADE MCN. Production of *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) on different casing layers and environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 26:1857-1863. (2010).

## ARTIGO 02

Article published in Research In Microbiology:  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104116>

**DECODING THE CHROMOSOME-SCALE GENOME OF THE NUTRIENT-RICH  
*Agaricus subrufescens*: A RESOURCE FOR FUNGAL BIOLOGY AND  
BIOTECHNOLOGY**

## RESUMO

*Agaricus subrufescens*, também conhecido como “cogumelo do sol”, possui significativo valor nutricional e medicinal. No entanto, o seu curto prazo de validade devido ao processo de escurecimento resulta em perdas pós-colheita, a menos que seja rapidamente desidratado. Isto restringe a sua disponibilidade aos consumidores na forma de cápsulas. Uma sequência do genoma de *A. subrufescens* pode levar a novas alternativas de cultivo ou à aplicação de estratégias de edição genética para retardar o processo de escurecimento. Montamos um genoma em escala cromossômica usando uma abordagem híbrida combinando sequenciamento *Illumina* e *Nanopore*. O genoma foi montado em 13 cromossomos e 31 estruturas não posicionadas, totalizando 44,5 Mb com 96,5% de completude e 47,24% de conteúdo de GC. Foram identificados 14.332 genes codificadores de proteínas, sendo 64,6% do genoma coberto por genes e 23,41% por elementos transponíveis. O mitogenoma foi circularizado e codificou quatorze genes mitocondriais típicos. Foram identificados quatro genes da polifenoloxidase e o locus do mating-type. A análise filogenômica apoia a inserção de *A. subrufescens* no clado dos Agaricomycetes. Esta é a primeira sequência genômica disponível de uma cepa do “cogumelo do sol”. Os resultados estão disponíveis através de um Genome Browser (<https://plantgenomics.ncc.unesp.br/gen.php?id=Asub>) e podem apoiar futuros estudos biológicos e genômicos de fungos.

**Palavras-chave:** *Agaricus subrufescens*, basidiomicetos, sequenciamento híbrido de DNA, genoma completo

## ABSTRACT

*Agaricus subrufescens*, also known as the "sun mushroom" has significant nutritional and medicinal value. However, its short shelf life due to the browning process results in post-harvest losses unless it's quickly dehydrated. This restricts its availability to consumers in the form of capsules. A genome sequence of *A. subrufescens* may lead to new cultivation alternatives or the application of gene editing strategies to delay the browning process. We assembled a chromosome-scale genome using a hybrid approach combining *Illumina* and *Nanopore* sequencing. The genome was assembled into 13 chromosomes and 31 unplaced scaffolds, totalling 44.5 Mb with 96.5% completeness and 47.24% GC content. 14,332 protein-coding genes were identified, with 64.6% of the genome covered by genes and 23.41% transposable elements. The mitogenome was circularized and encoded fourteen typical mitochondrial genes. Four polyphenoloxidase genes and the Mating-type locus were identified. Phylogenomic analysis supports the placement of *A. subrufescens* in the Agaricomycetes clade. This is the first available genome sequence of a strain of the "sun mushroom." Results are available through a Genome Browser (<https://plantgenomics.ncc.unesp.br/gen.php?id=Asub>) and can support further fungal biological and genomic studies.

**Keywords:** *Agaricus subrufescens*, basidiomycetes, hybrid DNA sequencing, chromosome-scale genome assembly

## 1 INTRODUCTION

*Agaricus subrufescens*, also known as the "mushroom of the sun" or "medicinal mushroom," is native to Brazil and referred to as "Almond Portobello" or "Royal Sun Agaricus" worldwide (DA EIRA *et al.*, 2005; HERREIRA *et al.*, 2012; KERRIGAN, 2005, 2007; SOUZA DIAS *et al.*, 2008; STAMETS *et al.*, 2002; ZIED *et al.*, 2021). It is low in fat, crude fiber, and ash, but high in protein, total carbohydrates, and available carbohydrates (PARDO-GIMÉNEZ *et al.*, 2020). The mushroom is medicinal, containing high levels of bioactive substances such as ergosterol,  $\beta$ -glucans, agaritin, blazeispirol, proteoglycans, lectin, p-coumaric acid, and sodium pyroglutamate (SABINO FERRARI *et al.*, 2021). These bioactive compounds have prophylactic and therapeutic benefits, including antimicrobial and immunomodulatory properties (SMIDERLE *et al.*, 2011; SORIMACHI *et al.*, 2001). Previous studies have isolated bioactive compounds and validated their medicinal potential (AYEKA, 2018; DA SILVA DE SOUZA *et al.*, 2017; GONZAGA *et al.*, 2009; LEVITZ, 2010; VENKATESH GOBI *et al.*, 2018; WISITRASSAMEEWONG *et al.*, 2012). Also, *A. subrufescens* is a secondary decomposer fungus, which means it can easily colonize substrates that have previously been subjected to the action of other microorganisms (MORIN *et al.*, 2012). It exhibits versatility by utilizing agricultural waste materials as substrate due to its enzymatic apparatus capable of breaking down complex compounds such as cellulose, hemicellulose, and lignin into simpler and more assimilable compounds, like monomers (DO VALLE *et al.*, 2014).

The genus *Agaricus* accounts for approximately 15% of the production of edible mushrooms globally. However, the actual output of *A. subrufescens* is often neglected (ROYSE *et al.*, 2017). In Brazil, *A. subrufescens* ranks fourth among cultivated mushroom species, along with species such as *Flamullina velutipes*, *Pleurotus dijamor*, and *Pleurotus eryngii*. The estimated national production is 900 tons per year, which is 6% of the total (PARDO-GIMÉNEZ *et al.*, 2020). However, *A. subrufescens* is highly perishable, and its production for fresh consumption is limited due to rapid darkening, or browning, during processing and storage. This browning limits its commercialization primarily to dried powder in medicinal capsules.

Among the factors that directly impact the browning of *A. subrufescens* mushrooms, such as production flow, the number of phenolic compounds, storage temperature, and humidity, the production and activity of polyphenol oxidase (PPO) enzymes (tyrosinase and

laccase) are notable (JOSHI *et al.*, 2018; LEI *et al.*, 2018). The browning process results in a final product that does not meet market standards, primarily due to colour and appearance being the main factors in defining the mushroom's value (LIN & SUN, 2019).

The comparison of fungal genomes can reveal important information on the production of various bioactive compounds and metabolic pathways (BRANDENBURGER *et al.*, 2018). High-quality genome assemblies of several mushroom-producing basidiomycete fungi have been reported in recent studies, including *Schizophyllum commune* (OHM *et al.*, 2010), *Ganoderma lucidum* (S. CHEN *et al.*, 2012), *Agaricus bisporus* (MORIN *et al.*, 2012), *Volvarellia volvacea* (BAO *et al.*, 2013), *Flammulina velutipes* (PARK *et al.*, 2014), *Lentinula edodes* (L. CHEN *et al.*, 2016), *Sparassis crispa* (KIYAMA *et al.*, 2018), *Auricularia heimuer* (Y. YUAN *et al.*, 2019), *Hericium erinaceus* (GONG *et al.*, 2020), *Russula griseocarnosa* (YU *et al.*, 2020), *Pleurotus ostreatus* (LEE *et al.*, 2021) and *Phlebopus portentosus* (WAN *et al.*, 2021). *A. bisporus*, a species closely related to *A. subrufescens*, has several genome sequences available on a chromosomal scale, with an average size of 30 Mb and ~11,500 genes distributed across 13 chromosomes (MORIN *et al.*, 2012) (SONNENBERG *et al.*, 2020).

We assembled and annotated the chromosome-scale genome of *A. subrufescens* ABL 04/49 and compared it with other related genomes. The lack of a complete genome sequence of *A. subrufescens* has impeded a deeper understanding of mechanisms related to bioactive compound biosynthesis, such as PPOs, hindering further studies based on genome editing. However, genome editing techniques have the potential to overcome oxidation issues in mushrooms, creating opportunities for developing improved strains. The prior knowledge of the complete genome of *A. bisporus* was critical in knocking out one of its six PPO genes, reducing PPO activity by 30% and mitigating the browning process.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Sampling and genomic sequencing of *A. subrufescens***

#### **2.1.1 Strain and cultivation conditions**

The *A. subrufescens* strain ABL 04/49 used in this work was retrieved from the fungal culture collection at CECOG-UNESP in Dracena, São Paulo, and reactivated on BDA medium (200 g of potato, 15 g of agar, and 15 g of glucose). The *A. subrufescens* ABL 04/49 strain was discovered in 2004 in a commercial crop in São José do Rio Preto, São Paulo,

Brazil. It has been used experimentally for nearly 20 years. According to Zied et al. (2014), this strain produces medium-sized mushrooms with a strong texture and has a reduced time to first harvest (approximately 40 days). It also has an average to high yield and thrives at high production temperatures (around 28 °C). Recently, VIEIRA JUNIOR *et al.*, (2022) highlighted its exceptional agronomic performance and its ability to convert vitamin D into ergosterol in both field and protected environments. The dikaryotic, phase of *A. subrufescens* was cultured at 28°C for 15 days in Erlenmeyer flasks containing 50 ml of malt broth, under constant agitation at 80 rpm. The mycelium was collected from the liquid medium, filtered using a Whatman absorbent filter paper (14 µm), packaged in aluminium paper, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for further DNA extraction.

### **2.1.2 DNA extraction and purification**

The frozen mycelium was macerated and divided into two 50 mL Falcon tubes, each containing 10 mL of lysis buffer (Tris pH 8.0, 200 mM; EDTA pH 8.0, 50 mM; SDS, 2%; NaCl, 250 mM; proteinase K, 100 µg mL<sup>-1</sup>).

In one tube, the mixture was agitated for 15 minutes and then incubated at 65°C for an additional 15 minutes. One volume of phenol-chloroform was added to the mixture for deproteinization, and the tubes were gently shaken while keeping the mixture chilled. The tubes were then centrifuged at 6,700 x g for 10 minutes at 4°C, and the upper phase was collected. The same procedure was repeated with phenol-chloroform (1:1) and then with chloroform-isoamyl alcohol (24:1). After the final deproteinization step, the supernatant was transferred to microtubes containing one volume of chilled isopropanol. The tubes were stored in a freezer for 30 minutes, then centrifuged at 9,600 x g for 30 minutes at 4°C. The supernatant was discarded, and the pellet was washed with 70% ethanol. The pellet was then dried in a dry bath at 55°C, and the DNA was resuspended in 20 µL of TE buffer. The other falcon tube was used for high molecular weight (HMW) DNA extraction using the Quick-DNA HMW MagBead Kit (Zymo Research), following the manufacturer's recommendations.

The purity of the extracted DNAs was evaluated using the Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the quantification was performed using the Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the Qubit dsDNA BR Assay Kit.

## **2.2 Genome Sequencing and Assembly**



### **2.2.1 Preparation and Sequencing of the Illumina MiSeq Library**

The DNA sample obtained through the phenol-chloroform protocol was sent for sequencing to NGS - Soluções Genômicas (<http://ngsgenomics.com.br/>) in Piracicaba, São Paulo, Brazil. The construction of the DNA libraries was performed using the Nextera DNA Flex Kit (Illumina), and the sequencing process followed the manufacturer's recommendations. The libraries were paired-end sequenced (2 x 100 bp) on the Illumina MiSeq platform.

### **2.2.2 Preparation and Sequencing of the GridION™ Nanopore Library**

The high molecular weight (HMW) DNA of *A. subrufescens* strain ABL 04/49 was sequenced on a GridION™ platform at the Federal University of Pampa - UNIPAMPA, in São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brazil, as described previously (DE LIMA FERREIRA *et al.*, 2022). Briefly, approximately 4 µg of unsheared genomic DNA was treated with the Rapid Sequencing Kit (SQK-RAD004; Oxford Nanopore Technologies, UK). The resulting library was sequenced on the GridION™ platform using a Spot-ON Mk1 flow cell (FLO-MIN 106 R9 version; Oxford Nanopore Technologies, UK) with the R9 Library Loading Bead Kit (EXP-LLB001; Oxford Nanopore Technologies, UK). The raw reads were acquired using the MinKNOW software v3.5.6 in a 72-hour experiment, and base calling was performed using the Albacore software v2.0.2.

### **2.3. *A. subrufescens* strain ABL 04/49 genome stats**

The estimation of genome size, heterozygosity, and repeated content assessment was performed through a kmer-based statistical approach using the jellyfish tool (MARÇAIS & KINGSFORD, 2011) and GenomeScope2 (VURTURE *et al.*, 2017).

### **2.4 Hybrid genome assembly of *A. subrufescens* strain ABL 04/49**

A hybrid genome assembly strategy was employed, combining the Illumina short-reads and the GridION long-reads, using MaSuRCA v 4.0.7 software (Maryland Super- Read Celera Assembler) (ZIMIN *et al.*, 2013). Chromosomal assembly was performed through a comparative and manual approach, using genomic data from closely related species with

complete genomes at the chromosome-scale available at NCBI: *Agaricus bisporus* strain KMCC00040 (GCA\_001682475.1) and *A. bisporus* var. *bisporus* H97 (GCA\_000300575.2), as references. The primary and alternate assemblies generated by MaSuRCA were used to process the *A. subrufescens* ABL 04/49 genome assembly at the chromosome scale. The RagTag tool (ALONGE *et al.*, 2022) was used for this purpose, with minimap2 (LI, 2018) and JupiterPlot (<https://github.com/JustinChu/JupiterPlot>) tools used for alignment and visualization. Additionally, the SAMBA tools and the “close\_scaffold\_gaps.sh” script from the MaSuRCA package were used for manual validation of chromosome assembly. The markers generated in a previous study, which provided the linkage map of *A. subrufescens* (FOULONGNE-ORIOLE *et al.*, 2016), were used to guide and validate the assembly at the chromosome level and identify the mating-type locus. The genome assembly was checked for completeness using the BUSCO program (KIM *et al.*, 2022) with the agaricales\_odb10 database, KAT tools (k-mer spectra) (CHOR *et al.*, 2009), and merquy (RHIE *et al.*, 2020).

## 2.5 Genome Structural Annotation: Transposable Elements and Genes

The *de novo* detection of TEs (transposable elements) was performed using the EDTA pipeline (OU *et al.*, 2019). The portion of the genome corresponding to TEs was masked (soft-masked) and subsequently used for the structural annotation step. To identify the genetic evidence, we used public RNAseq data from the JSR3 strain of *A. subrufescens* available on GenBank (BioProject ID PRJNA305463) and referring to different stages of development: mycelium, fruiting body, and primodium (SRAs: SRR11871366, SRR11871367, SRR11871368, SRR6407106, SRR6407107, SRR6407108, SRR6407109, SRR6407110, SRR6407111, SRR6407112). These RNAseq data were assembled with the Trinity tool (GRABHERR *et al.*, 2011) using the *de novo* and genome-guided approach. These transcriptome assembly results were used by the PASA program (HAAS *et al.*, 2008) to identify gene models.

Subsequently, gene prediction and annotation were performed using the BRAKER 1 + 2 software (HOFF *et al.*, 2019), with RNAseq data used as evidence for BRAKER 1, and OrthoDB database (KUZNETSOV *et al.*, 2023) was used as evidence for BRAKER2, according to the recommendations of the BRAKER tool. The BRAKER 1 + 2 and PASA prediction results were combined with the EVIDENCE MODELER tool (Version 1.1.1) (HAAS *et al.*, 2008), and used in two rounds in the PASA tool (HAAS *et al.*, 2008) to identify isoforms and annotation corrections and generate the final structural annotation. The

quality of the genomic annotation was assessed by the BUSCO program using the agaricales\_odb10 database (KIM *et al.*, 2022) and compared with the BUSCO completeness obtained by the genomic assembly.

## 2.6 Functional annotation

All coding regions and predicted isoforms were functionally annotated using EggNOG-mapper Version 1.0, with the EggNOG Version 5.0 database (HUERTA-CEPAS *et al.*, 2019), and BLAST searches against the basidiomycete database from the UniProt database (COUDERT *et al.*, 2023). The results were categorized, and functional annotation of each coding region and isoform, as well as Gene Ontology and KEGG enzyme association, were performed using the software Blast2GO (CONESA *et al.*, 2005) and BlastKOALA (KANEHISA *et al.*, 2016).

## 2.7 Annotation of secondary metabolites and active enzymes of CAZymes carbohydrates in *A. subrufescens*

The annotation of secondary metabolites was performed using the FungiSMASH online platform (BLIN *et al.*, 2021). Glycosyltransferases (GTs), auxiliary activities (AA) and carbohydrate-binding modules (CBMs) in *A. subrufescens* lineage ABL 04/49, were annotated through the dbCAN2 platform (<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/blast.php>) (YIN *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2018).

## 2.8 Comparative Analysis

We used the JupiterPlot tool (<https://github.com/JustinChu/JupiterPlot>) for comparative analysis on a macrosyntenic scale among *A. subrufescens* and the species *A. bisporus* KMC00540 and *A. bisporus* var. *bisporus* H97. The MCscan tool ([https://github.com/tanghaibao/jcvi/wiki/MCscan - Python-version](https://github.com/tanghaibao/jcvi/wiki/MCscan-Python-version)) was used for comparative analysis on a microsytenic scale of loci containing genes encoding PPOs and mating-type (MAT). The OrthoVenn2 pipeline (XU *et al.*, 2019) was used for identifying gene families and conducting GO enrichment comparative analysis. For comparison, the genomes of *A. bisporus* H97 (GCA\_000300575.2), and *Saccharomyces cerevisiae* S288C (baker's yeast) (GCA\_000146045.2) were used.

## 2.9 Phylogenomic analysis of *Agaricus subrufescens* ABL 04/49

The phylogenomic analysis was conducted using the BUSCO Phylogenomics program (a Python pipeline for constructing species phylogenies using BUSCO proteins) ([https://github.com/jamiemcg/BUSCO\\_phylogenomics](https://github.com/jamiemcg/BUSCO_phylogenomics)) in supermatrix mode, using complete genome assembly data. For this analysis, the genomes of the basidiomycetes *Agaricus bisporus* H39 (GCA\_001682475.1), *Agaricus bisporus* var. *bisporus* H97 (GCA\_000300575.2), *Agaricus bisporus* ARP23 (GCA\_006491665.1), *Agaricus bisporus burnettii* H119p4 (GCA\_014872705.1), *Volvariella volvacea* V23 (GCA\_000349905.1), *Lentinula edodes* W1-26 (GCA\_001700625.1), *Flammulina velutipes* KACC42780 (GCA\_000633125.1), *Pleurotus ostreatus* PC9 (GCA\_014466165.1), *Phlebobopus portentosus* PP17026 (GCA\_020232755.1), *Russula griseocranosa* LJ24 (GCA\_004801975.1), *Hericium erinaceus* CS-4 (GCA\_006506795.2), and *Auricularia heimuer* Dai\_13782 (GCA\_002287115.1) were used, in addition to the assembled genome of *Agaricus subrufescens* strain ABL 04/49. The genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* S288C (baker's yeast) (GCA\_000146045.2) was used as an outgroup.

## 2.10 Mitochondrial genome assembly, annotation and comparative analyses

The mitochondrial genome of *A. subrufescens* strain ABL 04/49 was obtained from the assembly results. The annotation was carried out using the MFannot platform (<https://github.com/BFL-lab/Mfannot>). The introns were determined with RNAweasel (<https://github.com/BFL-lab/RNAweasel>). The mitochondrial genome of *A. bisporus* H97 (JX271275) (FÉRANDON *et al.*, 2013) was used as reference for comparative analyses. The comparative figures were generated with clinker (GILCHRIST & CHOOI, 2021) and Kablammo (WINTERSINGER & WASMUTH, 2015).

## 2.11 Genome Browser and access to genomic data

The assembled genome sequence of *A. subrufescens* ABL 04/49 has been deposited with the NCBI under BioProject PRJNA926637 and accession number JAQOTE000000000. Raw genomic sequencing data were deposited in the SRA bank under accession numbers SRR23198184 (Illumina), and SRR23198183 (ONT). The predicted genes/proteins dataset is freely available for download from Zenodo at <https://zenodo.org/record/8199855> (DOI:

10.5281/zenodo.8199855). A genome browser utilizing JBrowse2 (DIESH *et al.*, 2023), which contains our complete set of genomic data, is available at: <https://plantgenomics.ncc.unesp.br/gen.php?id=Asub>.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

Our study resulted in the successful generation of a chromosomally-scaled genome assembly of *Agaricus subrufescens*, commonly referred to as the "sun mushroom," with a high-quality annotation that covers 96.5% of the complete genome assembly. The achievement was made possible by utilizing a hybrid assembly approach that combined *Illumina* short-reads with Oxford *Nanopore* long-reads, in addition to leveraging available data from previously sequenced *A. bisporus* H97 genome (MORIN *et al.*, 2012), KMCC00540 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term=GCA\\_001682475.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term=GCA_001682475.1)) and a Genetic Linkage Map of *A. subrufescens* (FOULONGNE-ORIOLE *et al.*, 2016), allowing for a better understanding of genomic architecture, gene functions and stimulating general research on this mushroom.

#### 3.1 Sequencing and assembly of the *A.subrufescens* strain ABL 04/49 genome

The dikaryotic genome of *A. subrufescens* strain ABL 04/49 was sequenced by a hybrid approach. We obtained 11,567,801 short-reads (2x100bp) and 4,842,231 long-reads (143 kb, N50: 4.4kb) from the *Illumina* and *GridION*<sup>TM</sup> sequencing platforms, respectively, corresponding to 13.64 Gb of data.

Based on k-mers analyses, the genome of *A. subrufescens* strain ABL 04/49 is demonstrates a heterozygous rate of 1.48%, with an estimated size of 42 Mb. Approximately 11 Mb of this genome is related to the repetitive fraction (Figure 1A). The genomic assembly process recovered a total of 54 scaffolds, with an N50 of 1.5 Mb and L50 of 9 Mb. These scaffolds occupy 42 Mb and have coverage of 324 x (Table 1).

**Table 1.** *A. subrufescens* strain ABL 04/49 genome primary assembly (hybrid assembly) stats.

Parameter	Value
Number of scaffolds	54
Total size of scaffolds	42,004,609 bp

Longest scaffold	4,823,740 bp
Shortest scaffold	21,345 bp
Number of scaffolds > 1k nt	54 (100 %)
Number of scaffolds > 10k nt	54 (100 %)
Number of scaffolds > 100k nt	50 (92.6 %)
Number of scaffolds > 1M nt	14 (25.9 %)
Mean scaffold size	777,863 bp
Median scaffold size	400,172 bp
N50 scaffold length	1,579,673 bp
L50 scaffold count	9

---

The genome size of Agaricomycetes fungi varies from 20 Mb to approximately 200 Mb, with the number of coding regions ranging from 9,501 to 39,074 (LI *et al.*, 2018). The average genome sizes of Ascomycota and Basidiomycota fungi are 36.91 Mb and 46.48 Mb, respectively (MOHANTA & BAE, 2015). Similarly to other fungi of the order Agaricales, *A. subrufescens* ABL 04/49 has a genome size similar to some fungi of that order, and slightly larger than the strains of *A. bisporus* H97 (30.3 Mb) (MORIN *et al.*, 2012), *A. bisporus* ARP 23 (33.4 Mb) (O'CONNOR *et al.*, 2019), and *A. bisporus* var. *burnettii* H119P4 (30.7 Mb) (SONNENBERG *et al.*, 2020).

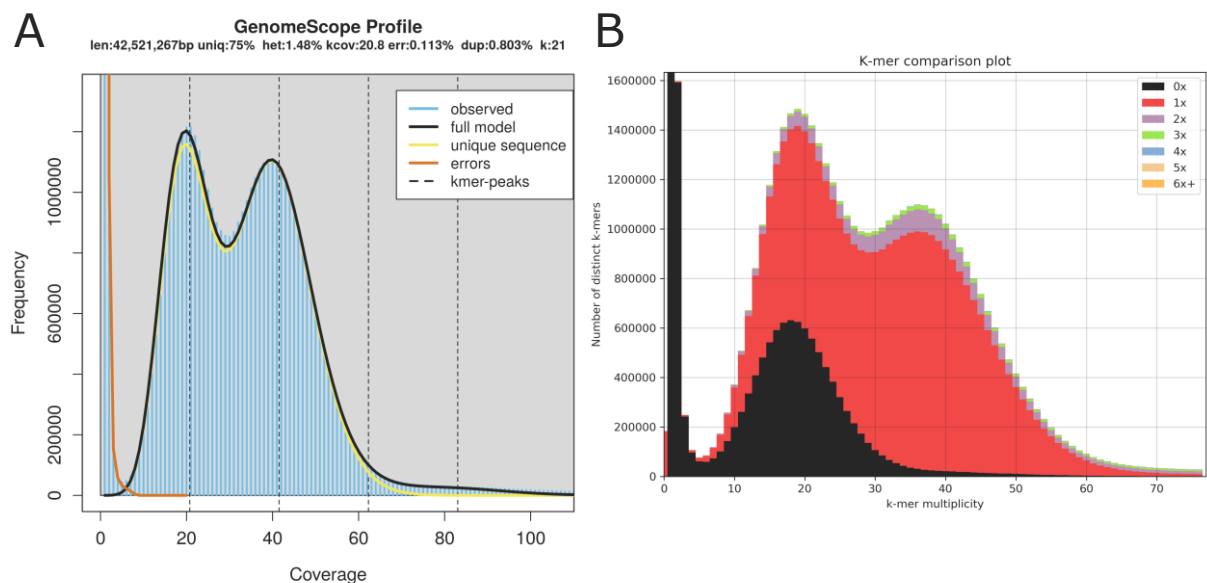
The comparative assembly approach utilizing the complete genomes in the chromosomal scale of *Agaricus bisporus* (strains KMC00540 and H97) combined with the use of the RagTag tool and manual analysis enabled the reconstruction of 13 chromosomes and 31 smaller scaffolds (unplaced, totalling 2.5 Mb, N50 152 Kb), in addition to the mitochondrial genome (Table 2, 3). The *A. subrufescens* chromosomes were organized and numbered in ascending order of size. Similarly, *A. bisporus* KMC00540 and *A. bisporus* var. *bisporus* H97 also have 13 chromosomes. It was observed that most of the chromosomes in *A. subrufescens* maintain high levels of synteny to the chromosomes of *A. bisporus*, suggesting low levels of rearrangement between these genomes.

The *A. subrufescens* genetic linkage map, based on 16 linkage groups (LG) (FOULONGNE-ORIOLE *et al.*, 2016), was mapped onto the *A. subrufescens* strain ABL 04/49 chromosome level assembly, revealing that the LGs are generally syntenic to the assembly, but with some slight variations (Table S1). For instance, LG2-LG7, LG10, and LG13-LG15 are syntenic, while LG1, LG8, LG9, LG11, LG12, and LG16 exhibit variations when compared to the *A. subrufescens* ABL 04/49 assembly. Indeed, structural variations and complexities within genomic regions, coupled with individual genetic polymorphisms and

potential inaccuracies in marker identification, can all contribute to discrepancies between genetic markers and their mapped positions on the genome assembly. However, in general, these results support the assembly of chromosomes I, II, III, IV, VIII, and IX. The other LGs are too small in centimorgan (cM) units. Furthermore, using previously determined markers, it was possible to identify the mating-type locus (MAT) located on chromosome I.

The final assembly has a BUSCO completeness of 96.5% (C: 96.5% [S: 92.2%, D: 4.3%], F: 0.4%, M: 3.1%, n: 3870), consensus quality value (QV) of 38.49, an error rate of 0.00014, and k-mer completeness of 81.204. K-mer spectra analyses (Figure 1B) confirm that the genome has heterozygous characteristics and considerable repetitive content.

**Figure 1.** Analysis of the *A. subrufescens* strain ABL 04/49 genome using the GenomeScope and KAT (k-mer spectra) tools. **(A)** The GenomeScope analysis reveals a heterozygosity rate of 1.48% in the genome, with an estimated size of 42 Mb. **(B)** The k-mer spectra analysis confirms the presence of heterozygosity and duplications within the genome.



After structural annotation, 14,332 genes were identified, and a total of 3,918 isoforms, totalling 18,250 coding regions (Tables 2 and 3). The structural annotation obtained a BUSCO completeness of 97.5% (C: 97.5% [S:80.2%, D:17.3%], F:0.6%, M:1.9%, n: 3870). Approximately 23 % (9,793,453 bp) of the genome of *A. subrufescens* ABL 04/49 is composed of transposable elements (TEs) as shown in Table 2. Chromosome VI has the highest concentration of TEs, while chromosomes III and IV have the lowest (Table 3). The majority of these elements belong to the LTR-RT class, with 4.06% as Copy LTR, 5.47% as Gypsy LTR, and 0.06% as unknown LTR. Class II elements make up 2.43% of the *A. subrufescens* ABL 04/49 genome (Tables 3 and 4).

**Table 2.** General characteristics of the *A. subrufescens* ABL 04/49 genome.

Genome size (bp)	44,531,294
Number of chromosomes	13
Unplaced sequences	31
GC Content (%)	47.24 %
Number of genes	14,332
High-quality genes	11,910
tRNAs	185
rRNAs	13
% of genome covered by genes	64.6%
% of the genome covered by TEs	23.41%
% of genome covered by CDS	56.1%
Number of coding sequences (CDS)	18,250
Biggest Gene (bp)	103,448
Biggest CDS (bp)	15,198
Average/exon/gene ratio	7

**Table 3.** Number and size of chromosomes, genes and transposable elements identified in the *A. subrufescens* ABL 04/49 genome.

Chromosomes	Size (bp)	Number of genes	Count TEs	bp Masked TEs	(%) Masked TEs
I	6,080,401	3,227	1,482	1,267,774	20.85
II	4,658,285	2,651	1,297	1,034,171	22.20
III	4,249,451	2,420	898	687,619	16.18
IV	3,668,528	2,292	606	605,592	16.50
V	3,547,326	1,706	1,055	875,981	24.69
VI	3,166,853	1,297	1,722	1,148,347	36.26
VII	3,036,421	1,595	731	679,720	22.38
VIII	3,018,530	1,534	755	697,196	23.09
IX	2,579,579	1,179	998	735,037	28.49
X	2,468,124	1,203	829	671,893	27.22
XI	2,308,036	1,039	682	694,308	30.08
XII	1,631,491	789	438	333,726	20.45
XIII	1,589,676	760	418	362,089	22.77

**Table 4.** Distribution of different classes and lineages of transposable elements in the genome of *A. subrufescens* ABL 04/49.



Class	Count	bp Masked	% Masked
<b>CLASS 01</b>			
LTR (Copies)	1860	1.697.873	4.06
LTR (Gypsy)	1370	2.288.248	5.47
LTR (unknow)	43	25.782	0.06
NonLTR (Line_element)	289	392.125	0.94
<b>CLASS 02</b>			
TIR (CACTA)	482	462.507	1.11
TIR (Mutator)	549	293.688	0.70
TIR (PIF_Hambinger)	43	47.643	0.11
TIR (Tc1_Mariner)	117	122.327	0.29
TIR (hAT)	183	92.201	0.22
NonTIR (helitron)	176	361.215	0.86
Repeat-region	6799	4.009.844	9.59
Total interspersed	11911	9.793.453	23.41

### 3.2 Functional annotation of *A. subrufescens* ABL04/49 genome

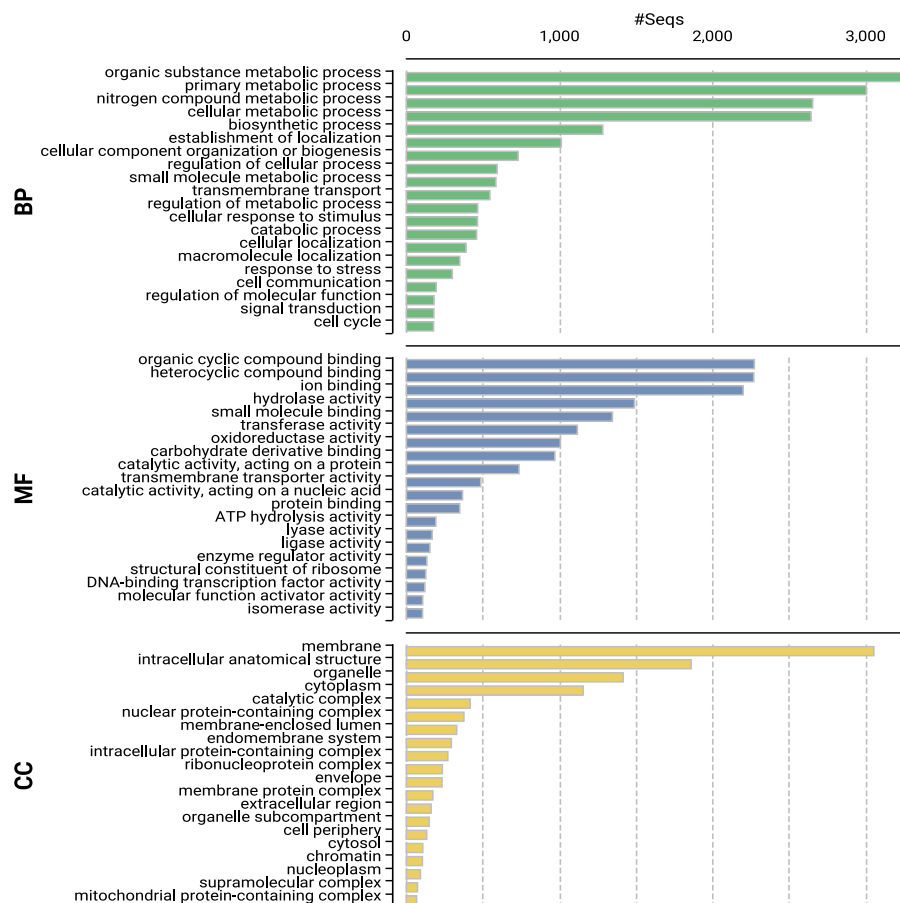
Functional annotation of the genome of *A. subrufescens* ABL 04/49 identified 14,332 genes, of which 11,910 (83%) have orthologs in other basidiomycete fungi and were classified as high-quality genes (Table 2). Among these high-quality genes, 6,446 were associated with Gene Ontology (GO) terms (Figure 2), with 4,324 annotated by the BlastKoala platform and 3,264 having Enzyme Commission numbers (E.C) (Figure 3A and Figure S1).

The ability to obtain energy from complex substrates has accompanied these fungi for millions of years through families of conserved genes, mainly the so-called glycoside hydrolases (GHs) (FLOUDAS *et al.*, 2012), and the broad spectrum of GH families necessary to digest cellulose (e.g., GH5, GH6, and GH7) and hemicellulose (e.g., GH3, GH10, and GH43) were found in the genome of *A. subrufescens* ABL 04/49. Three candidate AA2 genes responsible for lignin degradation, as well as 52 genes encoding auxiliary enzymes for lignin degradation, were also found in the genome of *A. subrufescens*. The most abundant classes of enzymes were hydrolases, transferases, and oxidoreductases, while isomerases were the least abundant. A total of 300 CAZymes were identified in the *A. subrufescens* ABL 04/49 genome (Figure 3B), with 113 containing a signal peptide. The most

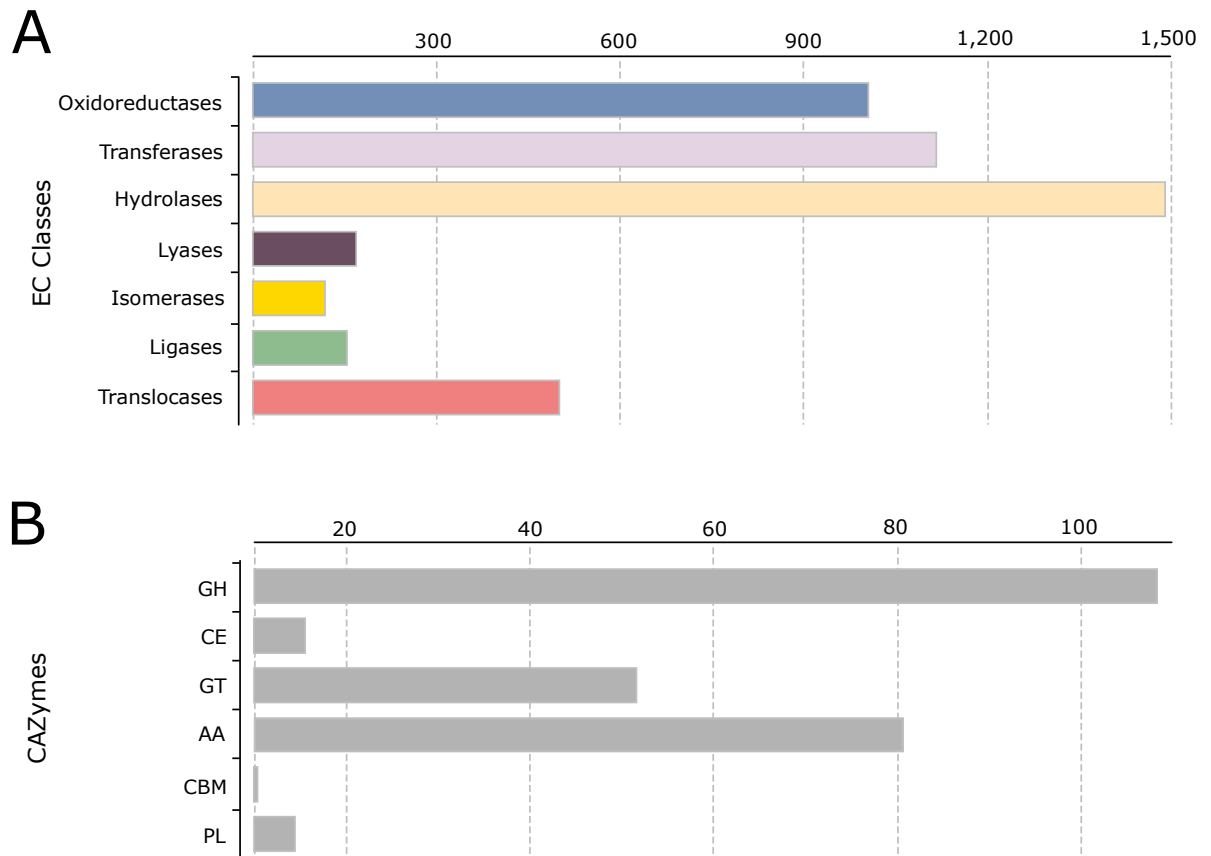
abundant CAZymes were AA3 (44 occurrences), AA1 (21 occurrences), GH5 (19 occurrences), GH16 and GT2 (11 occurrences), GH18 (10 occurrences), and GH47 (7 occurrences), while the other CAZymes had 1 to 5 occurrences (Table S2).

Peroxidases (PODs) are enzymes that use peroxide as a substrate or oxygen as an electron acceptor to catalyze a large number of oxidative reactions in living organisms (KIDWAI *et al.*, 2020). Lignin Peroxidases (LiPs), Manganese peroxidase (MnPs), and versatile peroxidases (VPs) are the main peroxidases for lignin decomposition. The genome of *A. subrufescens* contains three candidate AA2 genes and 52 genes that code for auxiliary enzymes involved in lignin degradation. In contrast, earlier studies have indicated that *A. bisporus* H97 possesses a limited set of peroxidase (POD) machinery for lignin degradation, with only two MnP genes detected in its genome (MORIN *et al.*, 2012).

**Figure 2.** Gene Ontology (GO) annotation showing the genes with the 20 highest GO counts (GO level 3) for biological processes, cellular components, and molecular functions in *A. subrufescens* ABL 04/49. **BP:** Biological Process, **MF:** Molecular Function, **CC:** Cellular Component.



**Figure 3.** (A) Distribution of each class of enzymes among genes that have an Enzyme Commission Number (EC number) in the genome of *A. subrufescens* ABL 04/49. (B) Distribution of CAZymes in the genome of *A. subrufescens* ABL 04/49.



*A. subrufescens* genome has 26 gene clusters that encode secondary metabolites. Only four are unique to this fungus, while others are similar to those found in *A. bisporus* H97. Comparative analysis identified six compounds produced, including strobilurin, zaragozic acids, and citrulline (2x). The two citrulline gene clusters in *A. subrufescens* are identical (Table 5).

**Table 5.** Secondary metabolites identified with the FungiSMASH tool in *A. subrufescens* ABL 04/49.

Location	Loci	Size (nt)	Genes	Type	Probable compound	Comments
chr1	5,627,227..5,648,694	21,468	3	indole	-	100% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr2	2,996,287..3,042,352	46,066	25	T1PKS	strobilurin	72% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr4	463,223..484,693	21,471	8	terpene	-	-
chr5	1,165,525..1,211,271	45,747	12	NRPS-like	-	46% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr5	1,371,559..1,391,756	20,198	11	terpene	Zaragozic acids	70% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr5	2,790,670..2,806,197	15,528	6	terpene	citrulline	62% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr5	3,329,361..3,350,395	21,035	7	terpene	citrulline	62% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr6	206,161..224,020	17,860	9	terpene	-	80% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97

chr6	306,613..327,192	20,580	7	terpene	-	-
chr6	367,606..388,871	21,266	8	terpene	-	21% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr7	310,444..330,304	19,861	8	terpene	-	100% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr7	996,067..1,011,600	15,534	5	siderophore	-	100% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr7	1,197,330..1,219,052	21,723	9	terpene	-	100% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr8	1,273,004..1,294,151	21,148	13	terpene	-	77% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr8	2,892,606..2,936,121	43,516	17	NRPS-like	-	84% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr9	1,302,406..1,361,140	58,735	19	NRPS-like T1PKS	strobilurin	88% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr9	1,631,217..1,651,794	20,578	7	terpene	-	80% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr9	2,122,860 2,144,339	- 21,480	10	Terpene	-	75% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97

chr10	1,646,832..1,691,126	44,295	15	NRPS-like	-	-
chr11	1,848,916..1,924,880	75,965	26	NRPS-like	-	-
chr12	561,722..598,405	36,684	11	NRPS-like	-	91% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
chr12	1,587,845..1,631,491	43,647	15	NRPS-like	-	50% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
scf7180000000485	18,857..40,004	21,148	13	terpene	-	77% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
scf7180000000485	120,071..178,867	58,797	17	NRPS-like T1PKS	strobilurin	12% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
scf7180000000524	137,619..152,165	14,547	7	terpene	-	60% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97
scf7180000000581	39,133..107,365	68,233	20	NRPS-like T1PKS	-	12% of genes shared with <i>A. bisporus</i> H97

---

### 3.3 Comparative genomics and analysis of polyphenol oxidase (PPO) and mating-type locus (MAT)

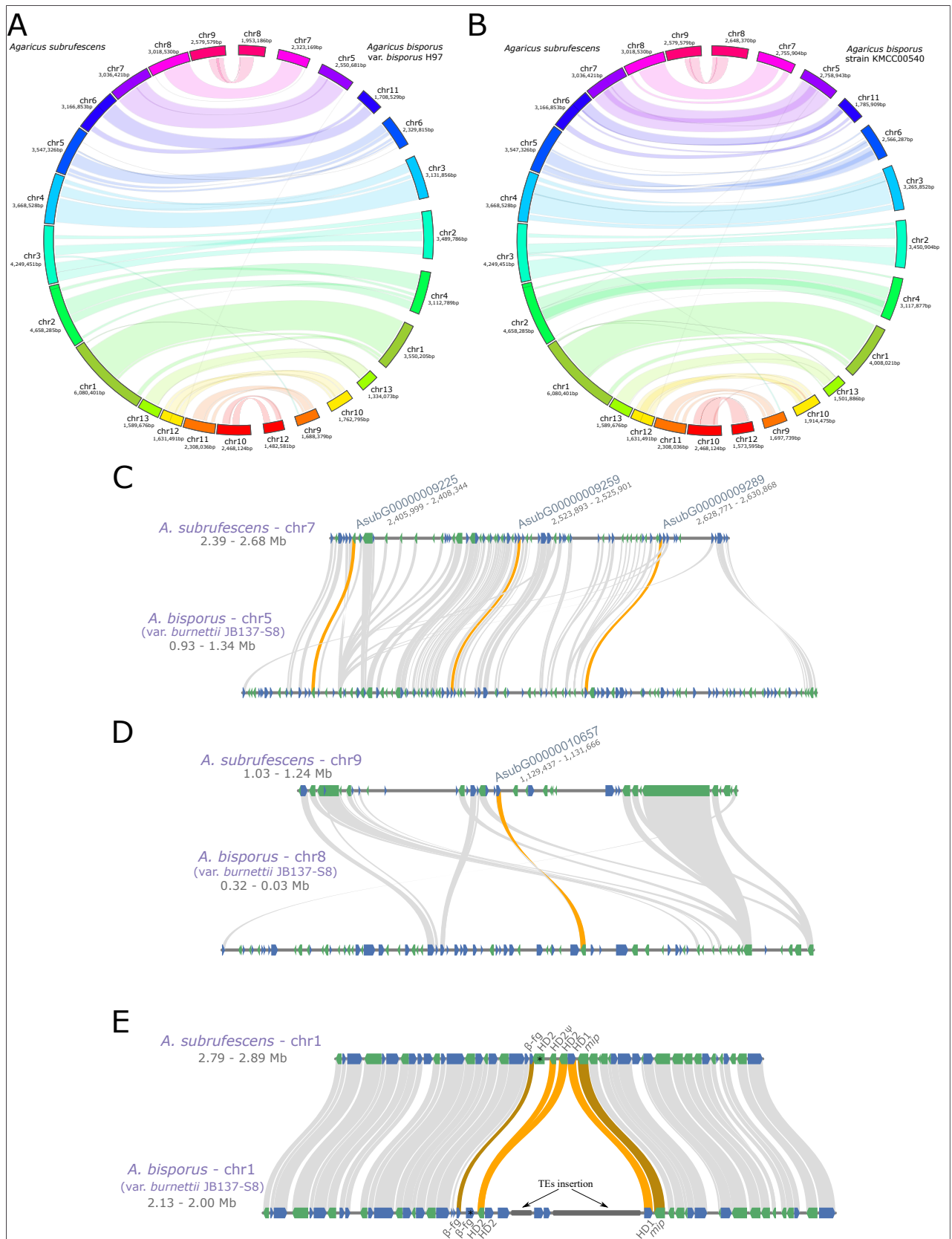
*A. subrufescens* ABL04/49 exhibits relative macrosynteny among its chromosomes when compared to the genomes of *A. bisporus* KMC00540 and *A. bisporus* var. *bisporus* H97 (Figure 4 A and B). However, the major differences are located in the telomeric and centromeric regions. The Average Nucleotide Identity (ANI) values between *A. subrufescens* ABL 04/49 and *A. bisporus* species is approximately 77% (SD: 3). Four PPOs were identified in *A. subrufescens* ABL 04/49, mainly distributed on chromosome VII, where three copies are located between positions 2,405,999 and 2,630,868, while the other copy is present on chromosome IX at position 1,129,437 and 1,131,666. Microsynteny analysis, when compared to the genome of *A. bisporus* var. *burnettii* JB137-S8, indicates significant colinearity and synteny among the PPOs present on chromosome VII, but the locus where the PPO is located on chromosome IX exhibits little colinearity (Figure 4 C and D).

In the life cycle of basidiomycetes, the mating type is regulated by two distinct genetic loci (FOULONGNE-ORIOU *et al.*, 2021). The first locus, typically referred to as the HD or MatA locus, is located on chromosome I. This locus encompasses the mip and  $\beta$ -fg genes, which flank the homeodomain transcription factors (HD) implicated in mating (Figure 4E). Although both *Agaricus* species share flanking genes collinearity and synteny, the organization of the MatA locus is different between them. For instance, *A. bisporus* var. *burnettii* JB137-S8 exhibits the insertion of transposable elements between HD1 and HD2 and two copies of the  $\beta$ -fg flanking the HD2 pair, as previously described (FOULONGNE-ORIOU *et al.*, 2021), while *A. subrufescens* ABL 04/49 presents only one  $\beta$ -fg, flanking three HD2 genes. The first *A. subrufescens* ABL 04/49 HD2 gene is exclusive, showing no homologs to *A. bisporus* var. *burnettii* JB137-S8, and the other two HD2 genes exhibit homologs to *A. bisporus* var. *burnettii* JB137-S8, but the first *A. subrufescens* ABL 04/49 HD2 copy showing homologs is a pseudogene. Conversely, *A. bisporus* var. *burnettii* JB137-S8 also exhibits an exclusive HD2 copy. Furthermore, two STE3-type pheromone receptor genes, which may be involved in mating, are present on chromosome X (1,337,084-1,338,172) and XIII (659,621-661,544). They exhibit homology and synteny with their corresponding loci in the genome *A. bisporus* var. *burnettii* JB137-S8.

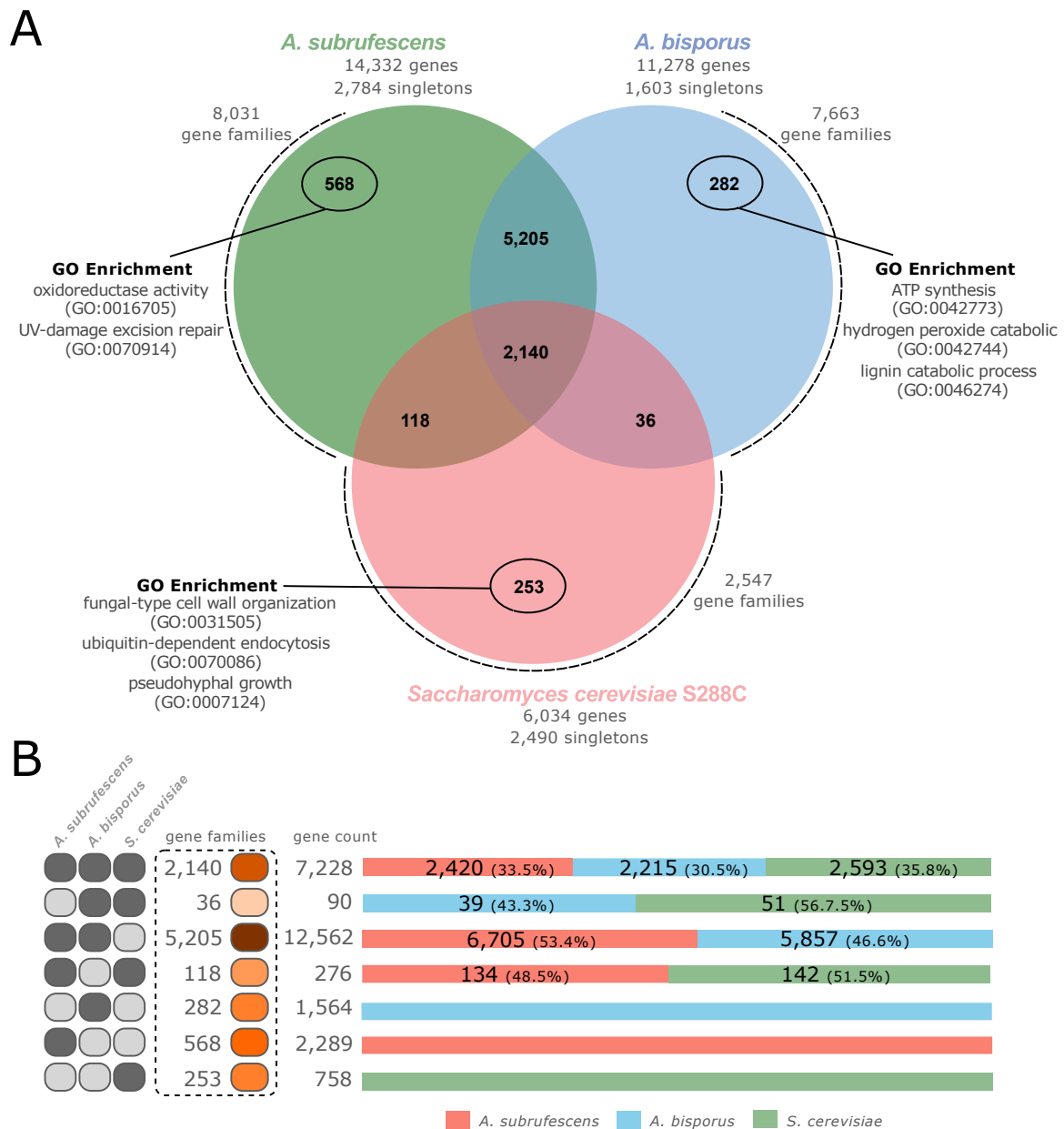
Comparative analysis among *A. subrufescens* ABL 04/49, *A. bisporus* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* showed that on average, 2,300 genes are shared between each species, totaling 2,140 gene families (Figure 5). Enrichment analysis of Gene Ontology (GO) terms for these shared genes determined that biological processes related to rRNA processing (GO:0006364), rRNA methylation (GO:0031167), cytoplasmic translation (GO:0002181), transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0006366), proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process (GO:0043161), and transmembrane transport (GO:0055085) are enriched (p-value < 0.05). In contrast, when comparing only within the *Agaricus* genus, 5,205 gene families are shared between *A. subrufescens* and *A. bisporus*. The shared genes between these two species of *Agaricus* are enriched for biological processes such as modulation by symbiont of host process (GO:0044003), carbohydrate metabolic process (GO:0005975), cellulose catabolic process (GO:0030245), rRNA processing (GO:0006364), polysaccharide catabolic process (GO:0000272), mRNA cis splicing, via spliceosome (GO:0045292), and xylan catabolic process (GO:0045493). Additionally, molecular functions such as oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen (GO:0016705), oxidoreductase activity (GO:0016491), zinc ion binding (GO:0008270), and hydrolase activity (GO:0016787) are enriched (p-value < 0.05). Finally, a total of 2,289 (568 families), 1,564 (282 families), and 758 (253 families) genes were identified as unique to *A. subrufescens* ABL 04/49, *A. bisporus*, and the yeast *S. cerevisiae*, respectively. These unique genes show GO term enrichment (p-value < 0.05) specific to each fungus, indicating the genomic particularities of each species (Figure 5).

**Figure 4.** (A and B) Macrosyntenic scale analysis between chromosomes of *A. bisporus* KMC00540 and *A. bisporus* var. *bisporus* H97 in comparison to the chromosomes of *A. subrufescens* ABL 04/49. The 13 chromosomes of *A. bisporus* strains are represented by coloured blocks on the right, and the 13 chromosomes of *A. subrufescens* strain ABL 04/49 are represented by blocks of the same colours on the left. (C and D) Microsyntenic scale analysis of the Polyphenol oxidase encoding genes locus in *A. subrufescens* ABL 04/49. (E) Mating-type (MAT) locus located on chromosome 1 showing the *mip* and  $\beta$ -*fg* genes flanking the homeodomain (HD) transcription factors involved in mating.





**Figure 5.** Gene families shared among *A. bisporus* H97, *Saccharomyces cerevisiae*, and *A. subrufescens* ABL04/49.

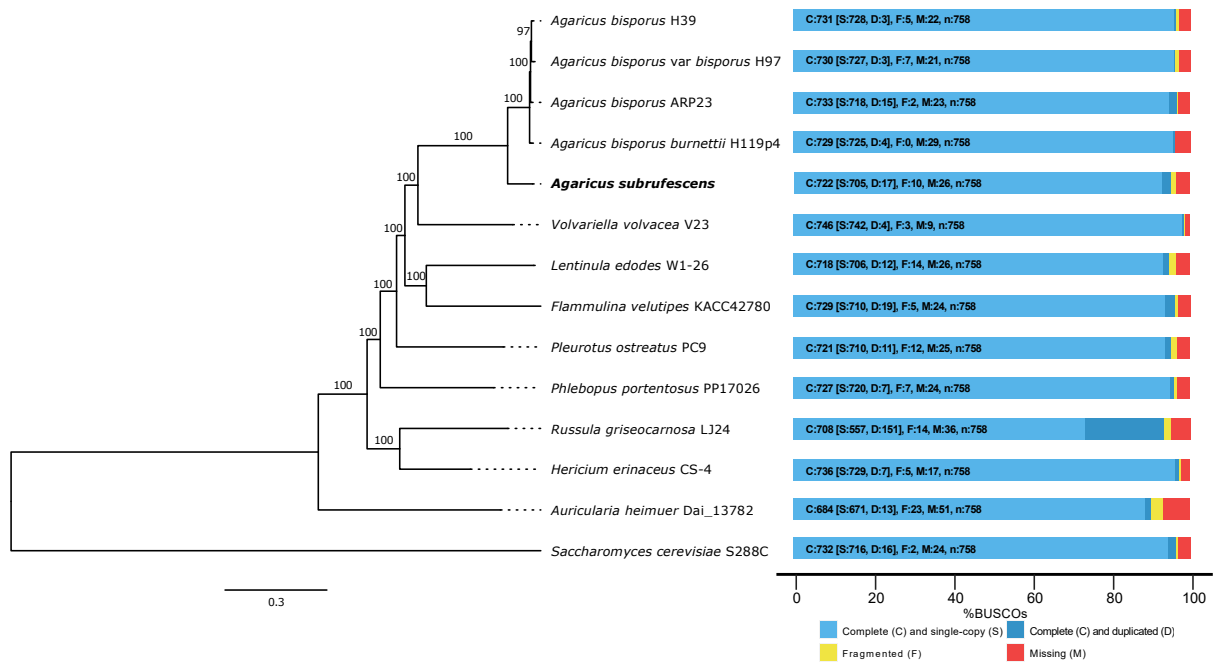


### 3.4 Phylogenomic analyses

The phylogenomic analyses conducted in this study accurately placed *A. subrufescens* ABL 04/49 within the *Agaricomycetes* clade, as anticipated. Notably, the sun mushroom (*A. subrufescens* ABL 04/49) formed a distinct clade, separate from the *A. bisporus* lineages (Figure 6). These findings align with previous investigations into the phylogenetic relationships among *A. bisporus* lineages. In particular, our phylogeny revealed that all four

*A. bisporus* lineages examined in this study were grouped together in a monophyletic clade, consistent with the results of O'CONNOR (O'CONNOR *et al.*, 2019).

**Figure 6.** Phylogenomic tree based on the complete genomes of various edible basidiomycete mushrooms, highlighting the phylogenetic position of *A. subrufescens* ABL04/49 relative to others and % BUSCO values.



### 3.5 Mitochondrial genome and comparative analyses

During the whole-genome sequence assembly process, the complete and circular sequence containing 131,364 bp (27.81 % of CG content) of *A. subrufescens* ABL 04/49 mtDNA was successfully obtained as a single scaffold. A total of fourteen typical mitochondrial genes encoding subunits of the electron transport chain and of the ATP-synthase complex (*nad1*, 2, 3, 4, 4L, 5 and 6, *cob*, *cox1*, 2 and 3, *atp6*, 8 and 9), along with 27 tRNAs and single copies of *rnS* and *rnL*, were identified (Table 6). Most fungal genomes contain a conserved ribosomal protein S3 gene (*rps3*) for transcriptional regulation and 14 conserved protein-coding genes (*nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, *nad6*, *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *atp6*, *atp8*, and *atp9*) that encode subunits of the respiratory chain complexes for energy metabolism (KANG *et al.*, 2017; X. YUAN *et al.*, 2017). In *A. bisporus* H97, 14 genes encoding typical mitochondrial genes that encode subunits of the electron transport chain and ATP synthase complex were observed (FÉRANDEZ *et al.*, 2013).

We observed significant synteny between the *A. subrufescens* mitochondrial genome and that of the closely-related species *A. bisporus*, highlighting the conservation of genetic organization between these taxa (Figure 7A). Both mitogenomes exhibit an average nucleotide identity of 86%, with 60% of their mitogenomes sequence being shared (Figure 7A and B). These similarities also extend to the eroded copies of *rpo1* and *dpo2*, which are shared between both mitogenomes. This observation suggests that the pseudogenization of these genes may represent ancient events that occurred prior to the differentiation of the two species, highlighting a shared evolutionary history. In general, these findings demonstrate that the synteny pattern observed in the mitogenomes mirrors the synteny pattern detected between the chromosomes of both species, further emphasizing the conservation of genetic organization across these taxa.

**Table 6.** Mitochondrial genes identified in *A. subrufescens* ABL 04/49 mitogenome and comparisons against *A. bisporus* H97 (FÉRANDON *et al.*, 2013).

<i>A. bisporus</i>				<i>A. subrufescens</i>		
	Introns	Intron Type	Endonuclease	introns	Type	Endonuclease
nad1	2	2x IB	-	3	3x IB	1x GIY-YIG
nad2	1	IC2	-	0	-	-
nad3	0	-	-	0	-	-
nad4	1	IB	1x LAGLIDADG	1	IB	1x LAGLIDADG
nad4L	0	-	-	0	-	-
nad5	4	2x IB, ID, and II	1x LAGLIDADG	2	2x IB	1x LAGLIDADG and 1x GIY-YIG
nad6	0	-	-	0	-	-
cob	6	5x IB and 1 ID	4x LAGLIDADG	7	4x IB, 2x ID and IA	4x LAGLIDADG

cox1	19	10x IB, ID, IA, 2x IB(3'), IB(5'), and II	11x LAGLIDADG, 5x GIY-YIG, 1x RT	19	13x IB, IA, ID, and 4x IB(5')	12x LAGLIDADG, 6x GIY-YIG
cox2	2	IC1	2x GIY-YIG	3	3x IB	1x LAGLIDADG, 1 GIY-YIG
cox3	1	IB	1x LAGLIDADG	1	IB	1x LAGLIDADG
atp6	0	-	-	0	-	-
atp8	0	-	-	0	-	-
atp9	0	-	-	0	-	-
rns	0	-	-	1	IC2	1x LAGLIDADG
rnL	5	IA, IB, IC2, and II	1x LAGLIDADG	5	2x IB, 2x IA, and IC2	1x LAGLIDADG

As observed for *A. bisporus* mtDNA (FÉRANDON *et al.*, 2013), the *A. subrufescens* mitochondrial genome also serves as a remarkable reservoir of group I introns (45 group I introns), yet no group II introns were detected (Table 6). Interestingly, the primary differences between both mitogenomes are associated with the number of introns within each gene (Figure 7C) and the presence of plasmid-derived sequences (Figure 7A). For instance, while *A. bisporus* mtDNA contains two large inverted repeats that duplicate a cluster of tRNA genes (FÉRANDON *et al.*, 2013) (Figure 7A and D), *A. subrufescens* mtDNA features two different family B DNA polymerase genes (*dpo3* and *dpo4*). These genes are similar to proteins encoded by DNA *polB* genes described as plasmid-like sequences integrated into the mitochondrial genome of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* (AAB84226.1 and CAA73185.1, exhibiting 63% similarity), with lesser similarity (<50%) observed in *Sclerotinia nivalis* and *Neurospora intermedia* mitogenomes, and in *Pleospora typhicola* plasmid.

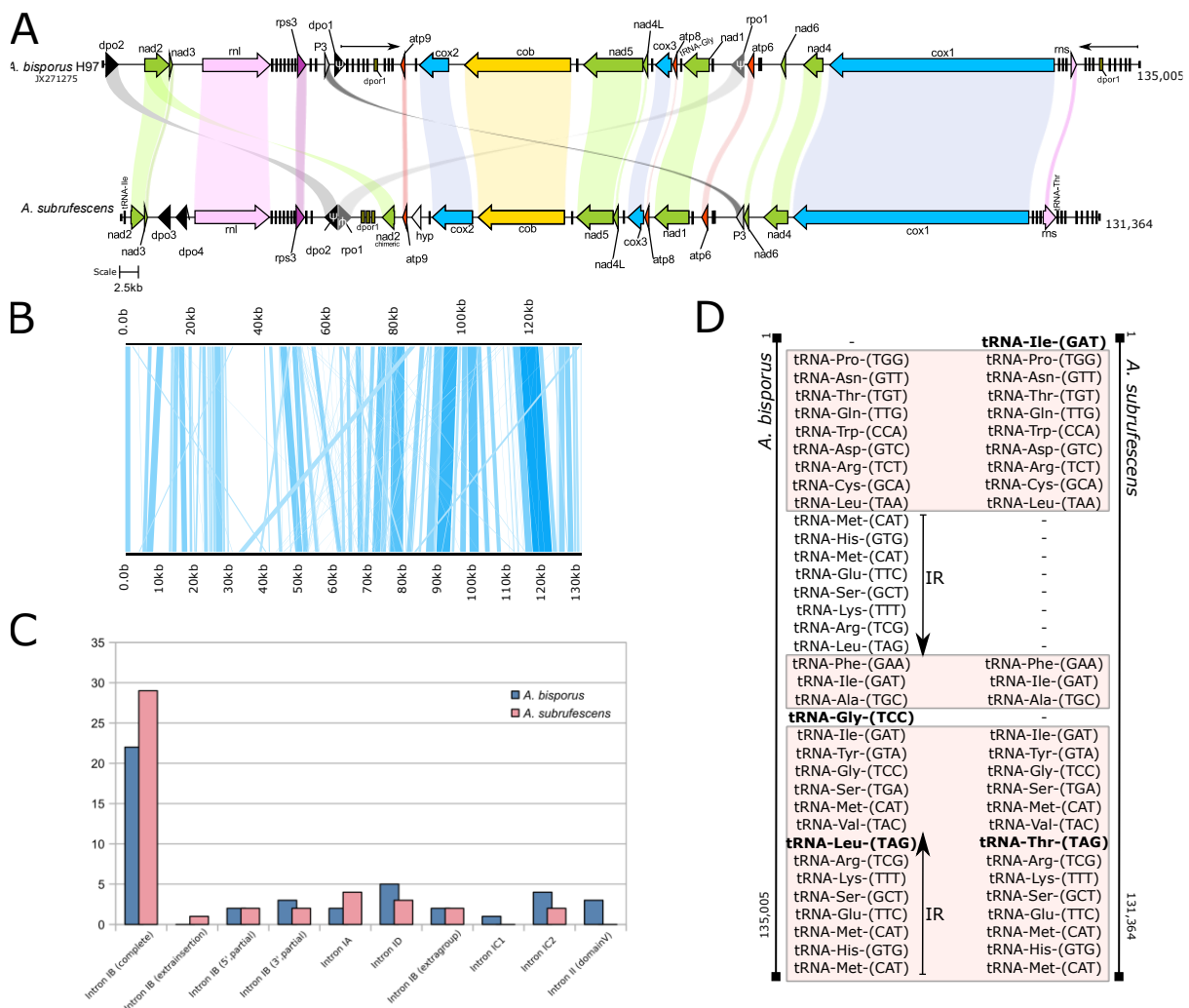
Discrepancies in intron number and content are emphasized within the *nad1*, *nad2*, *nad5*, *cob*, *cox2*, and *rns* genes. As observed in the *A. bisporus* mitogenome (FÉRANDON *et al.*, 2013), a majority of *A. subrufescens* mitochondrial group I introns harbor a homing endonuclease gene encoding a DNA endonuclease. The intron variation identified in both species implies a complex mechanism of intron loss and gain following species divergence and evolution.

Moreover, *A. subrufescens* mtDNA also harbors an additional and chimeric *nad2* gene copy. This chimeric gene has 1,355 bp in length, in comparison to and 3,302 bp found in both *A. subrufescens* and *A. bisporus* mitogenomes. However, only the region corresponding to the first 522 bp from the N-terminal of the protein coding sequence shows 75% of similarity. The rest of the predicted peptide, including the C-terminal, does not show any similarity with sequences available in public databases. Further transmembrane helices prediction based on the DeepTMHMM algorithm (HALLGREN *et al.*, 2022) revealed at least five transmembrane domains in the C-terminal, strongly suggesting that the protein product of this gene may be embedded in the membrane showing a predicted function similar to mitochondrial complex I and energy production.

Finally, while both mitogenomes carry the same set of 20 distinct tRNAs, minor variations in the location of each tRNA locus have been observed. For example, the *A. subrufescens* mtDNA displays a unique tRNA-Ile situated downstream of the *nad2* gene, and a tRNA-Thr positioned upstream of the *rns* gene. In contrast, the *A. bisporus* mtDNA exhibits

a tRNA-Gly situated between the *atp8* and *nad1* genes, as well as a duplicated cluster of tRNAs found in both inverted repeats.

**Figure 7.** (A) Schematic representation illustrating the comparisons between *A. subrufescens* and *A. bisporus* mitogenomes. Plasmid-derived and hypothetical sequences are depicted as gray, black, and white arrows, while mitochondrial genes are represented as colored arrows. tRNAs are displayed as small bars. Variations in the tRNA loci are highlighted. The two large inverted repeats in *A. bisporus* are shown as smaller black arrows. (B) Linear representation of discontinuous mega BLAST comparisons between both mtDNA sequences. (C) Bar plot showing the introns types identified in *A. subrufescens* and *A. bisporus* mitogenomes. (D) Positional tRNA comparisons between the two *Agaricus* mitogenomes.



## 4 CONCLUSION

In conclusion, we have successfully assembled the first high-quality chromosome-scale genome of *Agaricus subrufescens*, the "sun mushroom," using a hybrid approach



combining Illumina and Nanopore sequencing. This genome sequence provides valuable information about the genetic background of *A. subrufescens*, including the identification of PPO genes and the Mating-type locus. The genome assembly and annotation results are publicly available through a Genome Browser and can serve as a useful resource for further studies in fungal biology and genomics. The availability of the genome sequence may also lead to new cultivation alternatives or the application of gene editing strategies to delay the browning process and reduce post-harvest losses, which will increase the availability of this mushroom to consumers in various forms.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Minas Gerais Research Foundation (FAPEMIG) for providing financial support for this research project. CGA received a PhD scholarship from FAPEMIG, and AMV and VSP received a research fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (#303061/2019–7 and #302569/2021–9, respectively). This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior — Brasil (CAPES) — Finance Code 001. In addition, we extend our gratitude to the Brazilian Microbiome Project (<http://www.brmicrobiome.org>) for their support in this study.

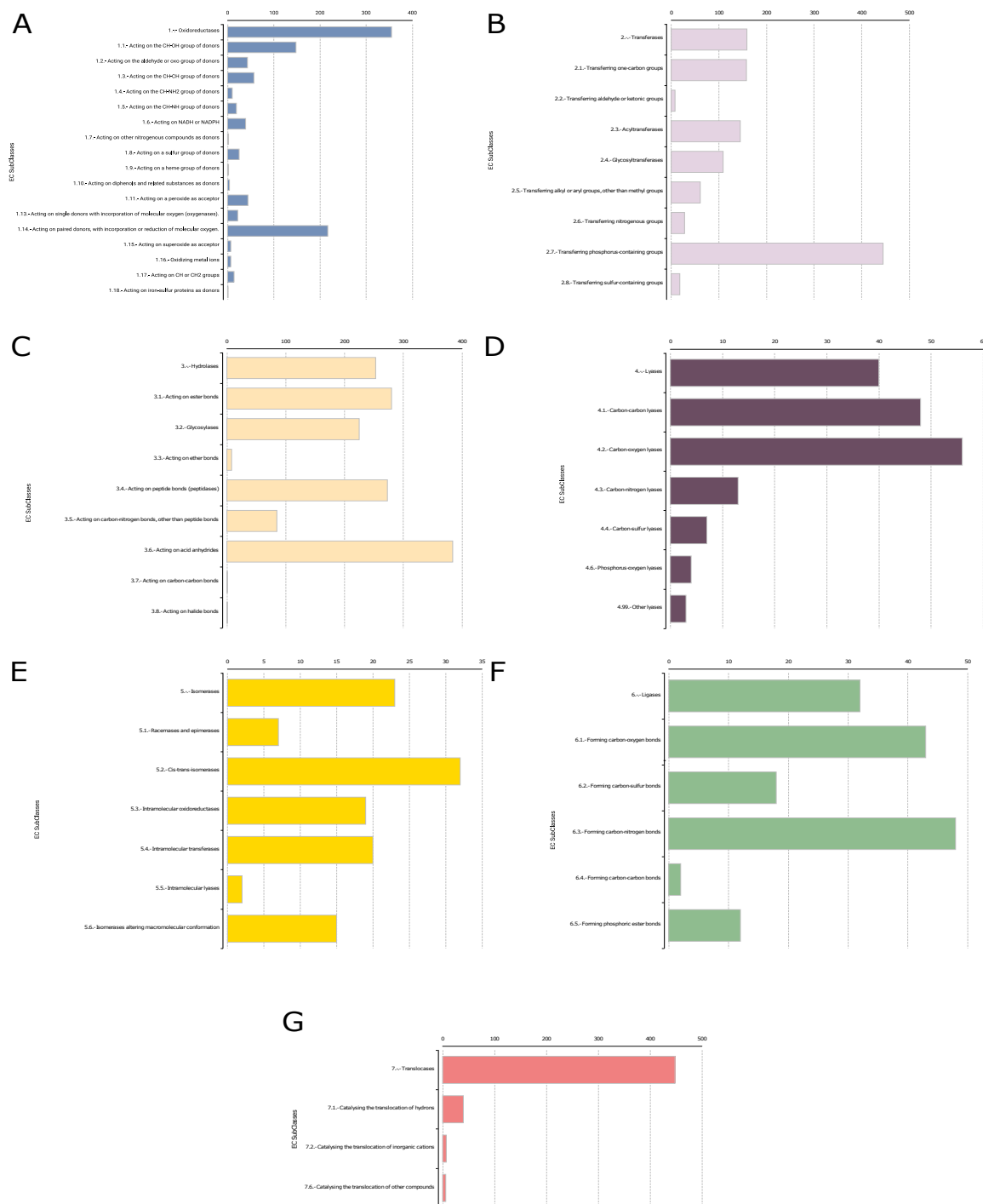
## DATA ACCESSIBILITY

The assembled genome sequence of *A. subrufescens* ABL 04/49 has been deposited with the NCBI under BioProject PRJNA926637 and accession number JAQOTE000000000. Raw genomic sequencing data were deposited in the SRA bank under accession numbers SRR23198184 (Illumina), and SRR23198183 (ONT). The predicted genes/proteins dataset is freely available for download from Zenodo at <https://zenodo.org/record/8199855> (DOI: 10.5281/zenodo.8199855). A genome browser utilizing JBrowse2 (DIESH *et al.*, 2023), which contains our complete set of genomic data, is available at: <https://plantgenomics.ncc.unesp.br/gen.php?id=Asub>.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104116>

**Figure S1.** Distribution of each class of enzymes among genes that have an Enzyme Commission Number (EC number) in the genome of *A. subrufescens* ABL 04/49.



**Table S1.** Comparison of *A. subrufescens* Genetic Linkage Map and ABL 04/49 Chromosome Level Assembly (online <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104116>)

**Table S2.** Summary of Carbohydrate-Active Enzymes (CAZymes) and Lignin-Degrading Genes Identified in *A. subrufescens* ABL 04/49 genome.

CAZy	CAZy numbers
AA1	21
AA2	3
AA3	44
AA5	8
AA8	2
AA9	4
AA12	1
AA14	1
CBM1	1
CBM13	1
CE1	3
CE4	3
CE8	2
CE9	1
CE12	2
CE15	1
CE16	1
CE17	1
GH1	2
GH2	2
GH3	9
GH5	19
GH6	1
GH7	1
GH9	1
GH10	1
GH12	1
GH13	7
GH15	2
GH16	11
GH17	2
GH18	10
GH20	3
GH25	1
GH27	4
GH28	3
GH29	1
GH30	2
GH31	4
GH35	1
GH37	2
GH38	1
GH43	5
GH44	1
GH47	7
GH51	1

GH53	1
GH55	1
GH63	1
GH71	1
GH72	1
GH74	1
GH76	1
GH78	3
GH79	4
GH85	2
GH88	1
GH92	5
GH95	1
GH105	1
GH115	2
GH125	1
GH152	5
GH154	1
GH162	1
GT1	3
GT2	11
GT3	2
GT4	4
GT8	1
GT15	3
GT20	3
GT21	1
GT22	2
GT24	1
GT32	1
GT33	1
GT35	1
GT39	4
GT48	2
GT49	1
GT57	2
GT58	1
GT59	1
GT66	1
GT69	3
GT90	3
PL1	2
PL4	1
PL8	1
PL26	1
PL35	1
PL38	2
PL42	1

---

## 5 REFERENCES

- Alonge, M., Lebeigle, L., Kirsche, M., Jenike, K., Ou, S., Aganezov, S., Wang, X., Lippman, Z. B., Schatz, M. C., & Soyk, S. (2022). Automated assembly scaffolding using RagTag elevates a new tomato system for high-throughput genome editing. *Genome Biology*, 23(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02823-7>
- Ayeka, P. A. (2018). Potential of Mushroom Compounds as Immunomodulators in Cancer Immunotherapy: A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2018, 7271509. <https://doi.org/10.1155/2018/7271509>
- Bao, D., Gong, M., Zheng, H., Chen, M., Zhang, L., Wang, H., Jiang, J., Wu, L., Zhu, Y., Zhu, G., Zhou, Y., Li, C., Wang, S., Zhao, Y., Zhao, G., & Tan, Q. (2013). Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) genome. *PLoS One*, 8(3), e58294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058294>
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W29–W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>
- Brandenburger, E., Braga, D., Kombrink, A., Lackner, G., Gressler, J., Künzler, M., & Hoffmeister, D. (2018). Multi-genome analysis identifies functional and phylogenetic diversity of basidiomycete adenylate-forming reductases. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 112, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.07.008>
- Chen, L., Gong, Y., Cai, Y., Liu, W., Zhou, Y., Xiao, Y., Xu, Z., Liu, Y., Lei, X., Wang, G., Guo, M., Ma, X., & Bian, Y. (2016). Genome Sequence of the Edible Cultivated Mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) Reveals Insights into Lignocellulose Degradation. *PLoS One*, 11(8), e0160336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160336>
- Chen, S., Xu, J., Liu, C., Zhu, Y., Nelson, D. R., Zhou, S., Li, C., Wang, L., Guo, X., Sun, Y., Luo, H., Li, Y., Song, J., Henrissat, B., Levasseur, A., Qian, J., Li, J., Luo, X., Shi, L., ... Sun, C. (2012). Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nature Communications*, 3, 913. <https://doi.org/10.1038/ncomms1923>
- Chor, B., Horn, D., Goldman, N., Levy, Y., & Massingham, T. (2009). Genomic DNA k-mer spectra: models and modalities. *Genome Biology*, 10(10), R108. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-10-r108>
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674–3676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>
- Coudert, E., Gehant, S., de Castro, E., Pozzato, M., Baratin, D., Neto, T., Sigrist, C. J. A., Redaschi, N., Bridge, A., & UniProt Consortium. (2023). Annotation of biologically relevant ligands in UniProtKB using ChEBI. *Bioinformatics*, 39(1). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac793>
- da Eira, A. F., Didukh, M. Y., de Amazonas, M. A. L., & Stamets, P. (2005). 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*, 7(3), 507–511.

<https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v7.i3.70>

- da Silva de Souza, A. C., Correa, V. G., Goncalves, G. de A., Soares, A. A., Bracht, A., & Peralta, R. M. (2017). *Agaricus blazei* Bioactive Compounds and their Effects on Human Health: Benefits and Controversies. *Current Pharmaceutical Design*, 23(19), 2807–2834. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170119093719>
- de Lima Ferreira, J. K., de Mello Varani, A., Tótola, M. R., Fernandes Almeida, M., de Sousa Melo, D., Ferreira Silva E Batista, C., Chalfun-Junior, A., Pimenta de Oliveira, K. K., Wurdig Roesch, L. F., & Satler Pylro, V. (2022). Phylogenomic characterization and pangenomic insights into the surfactin-producing bacteria *Bacillus subtilis* strain RI4914. *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 53(4), 2051–2063. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00815-0>
- Diesh, C., Stevens, G. J., Xie, P., De Jesus Martinez, T., Hershberg, E. A., Leung, A., Guo, E., Dider, S., Zhang, J., Bridge, C., Hogue, G., Duncan, A., Morgan, M., Flores, T., Bimber, B. N., Haw R, Cain, S., Buels, R. M., Stein, L. D., Holmes, I. H. JBrowse 2: a modular genome browser with views of synteny and structural variation. *Genome Biol.* 2023 Apr 17;24(1):74. doi: 10.1186/s13059-023-02914-z.
- do Valle, J. S., Molecular Biology laboratory, Paranaense University, Praça Mascarenhas de Moraes 4282, CEP 87502-210, Umuarama-PR, Brazil. Laboratory of Biotechnological Processes, Department of Chemical Engineering, Federal University of Paraná, CEP 81531-970, Curitiba-PR, Brazil., Vandenberghe, L. P. de S., Santana, T. T., Linde, G. A., Colauto, N. B., & Soccol, C. R. (2014). Optimization of *Agaricus blazei* laccase production by submerged cultivation with sugarcane molasses. *African Journal of Microbiology Research*, 8(9), 939–946. <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6508>
- Férandon, C., Xu, J., & Barroso, G. (2013). The 135 kbp mitochondrial genome of *Agaricus bisporus* is the largest known eukaryotic reservoir of group I introns and plasmid-related sequences. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 55, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.01.009>
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. A., Henrissat, B., Martínez, A. T., Otilar, R., Spatafora, J. W., Yadav, J. S., Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Ferreira, P., Findley, K., ... Hibbett, D. S. (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*, 336(6089), 1715–1719. <https://doi.org/10.1126/science.1221748>
- Foulongne-Oriol, M., Rocha de Brito, M., Cabannes, D., Clément, A., Spataro, C., Moinard, M., Dias, E. S., Callac, P., & Savoie, J.-M. (2016). The Genetic Linkage Map of the Medicinal Mushroom *Agaricus subrufescens* Reveals Highly Conserved Macrosynteny with the Congeneric Species *Agaricus bisporus*. *G3*, 6(5), 1217–1226. <https://doi.org/10.1534/g3.115.025718>
- Foulongne-Oriol, M., Taskent, O., Kües, U., Sonnenberg, A. S. M., van Peer, A. F., & Giraud, T. (2021). Mating-Type Locus Organization and Mating-Type Chromosome Differentiation in the Bipolar Edible Button Mushroom. *Genes*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/genes12071079>
- Gilchrist, C. L. M., & Chooi, Y.-H. (2021). clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics*, 37(16), 2473–2475.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab007>

- Gong, W., Wang, Y., Xie, C., Zhou, Y., Zhu, Z., & Peng, Y. (2020). Whole genome sequence of an edible and medicinal mushroom, *Hericium erinaceus* (Basidiomycota, Fungi). *Genomics*, *112*(3), 2393–2399. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.01.011>
- Gonzaga, M. L. C., Bezerra, D. P., Alves, A. P. N. N., de Alencar, N. M. N., Mesquita, R. de O., Lima, M. W., Soares, S. de A., Pessoa, C., de Moraes, M. O., & Costa-Lotufo, L. V. (2009). In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by an alpha-(1-->4)-glucan-beta-(1-->6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. *Journal of Natural Medicines*, *63*(1), 32–40. <https://doi.org/10.1007/s11418-008-0286-4>
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, *29*(7), 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Haas, B. J., Salzberg, S. L., Zhu, W., Pertea, M., Allen, J. E., Orvis, J., White, O., Buell, C. R., & Wortman, J. R. (2008). Automated eukaryotic gene structure annotation using EVidenceModeler and the Program to Assemble Spliced Alignments. *Genome Biology*, *9*(1), R7. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-r7>
- Hallgren, J., Tsigirigos, K. D., Pedersen, M. D., Almagro Armenteros, J. J., Marcatili, P., Nielsen, H., Krogh, A., & Winther, O. (2022). DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. In *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
- Herreira, K. M. S., Alves, E., Costa, M. D., & Dias, E. S. (2012). Electron microscopy studies of basidiosporogenesis in *Agaricus brasiliensis*. *Mycologia*, *104*(6), 1272–1280. <https://doi.org/10.3852/11-294>
- Hoff, K. J., Lomsadze, A., Borodovsky, M., & Stanke, M. (2019). Whole-Genome Annotation with BRAKER. *Methods in Molecular Biology*, *1962*, 65–95. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_5)
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., von Mering, C., & Bork, P. (2019). eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D309–D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>
- Joshi, K., Warby, J., Valverde, J., Tiwari, B., Cullen, P. J., & Frias, J. M. (2018). Impact of cold chain and product variability on quality attributes of modified atmosphere packed mushrooms (*Agaricus bisporus*) throughout distribution. *Journal of Food Engineering*, *232*, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.03.019>
- Kanehisa, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *Journal of Molecular Biology*, *428*(4), 726–731. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>
- Kang, X., Hu, L., Shen, P., Li, R., & Liu, D. (2017). SMRT Sequencing Revealed Mitogenome Characteristics and Mitogenome-Wide DNA Modification Pattern in. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1422. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01422>

- Kerrigan, R. W. (2005). *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. *Mycologia*, 97(1), 12–24. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.12>
- Kerrigan, R. W. (2007). Inclusive and Exclusive Concepts of *Agaricus subrufescens* Peck: A Reply to Wasser et al. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 9(1), 79–84. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v9.i1.100>
- Kidwai, M., Ahmad, I. Z., & Chakrabarty, D. (2020). Class III peroxidase: an indispensable enzyme for biotic/abiotic stress tolerance and a potent candidate for crop improvement. *Plant Cell Reports*, 39(11), 1381–1393. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02588-y>
- Kim, J., Park, M.-J., Shim, D., & Ryoo, R. (2022). De novo genome assembly of the bioluminescent mushroom *Omphalotus guepiniiformis* reveals an *Omphalotus*-specific lineage of the luciferase gene block. *Genomics*, 114(6), 110514. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110514>
- Kiyama, R., Furutani, Y., Kawaguchi, K., & Nakanishi, T. (2018). Genome sequence of the cauliflower mushroom *Sparassis crispa* (Hanabiratake) and its association with beneficial usage. *Scientific Reports*, 8(1), 16053. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34415-6>
- Kuznetsov, D., Tegenfeldt, F., Manni, M., Seppey, M., Berkeley, M., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2023). OrthoDB v11: annotation of orthologs in the widest sampling of organismal diversity. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D445–D451. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac998>
- Lee, Y.-Y., Vidal-Diez de Ulzurrun, G., Schwarz, E. M., Stajich, J. E., & Hsueh, Y.-P. (2021). Genome sequence of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* strain PC9. *G3*, 11(2). <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkaa008>
- Lei, J., Li, B., Zhang, N., Yan, R., Guan, W., Brennan, C. S., Gao, H., & Peng, B. (2018). Effects of UV-C treatment on browning and the expression of polyphenol oxidase (PPO) genes in different tissues of *Agaricus bisporus* during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 139, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.11.022>
- Levitz, S. M. (2010). Innate recognition of fungal cell walls. *PLoS Pathogens*, 6(4), e1000758. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000758>
- Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 34(18), 3094–3100. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>
- Li, H., Wu, S., Ma, X., Chen, W., Zhang, J., Duan, S., Gao, Y., Kui, L., Huang, W., Wu, P., Shi, R., Li, Y., Wang, Y., Li, J., Guo, X., Luo, X., Li, Q., Xiong, C., Liu, H., ... Dong, Y. (2018). The Genome Sequences of 90 Mushrooms. *Scientific Reports*, 8(1), 9982. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28303-2>
- Lin, X., & Sun, D.-W. (2019). Research advances in browning of button mushroom (*Agaricus bisporus*): Affecting factors and controlling methods. *Trends in Food Science & Technology*, 90, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.007>
- Marçais, G., & Kingsford, C. (2011). A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of k-mers. *Bioinformatics*, 27(6), 764–770. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr011>
- Martinez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D., Schmoll, M., Kubicek, C. P., Ferreira, P., Ruiz-Duenas, F. J., Martinez, A. T., Kersten, P., Hammel, K. E., Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Lindquist, E., Sabat, G., Bondurant, S. S., Larrondo, L. F.,



- Canessa, P., Vicuna, R., ... Cullen, D. (2009). Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(6), 1954–1959. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809575106>
- Mohanta, T. K., & Bae, H. (2015). The diversity of fungal genome. *Biological Procedures Online*, *17*, 8. <https://doi.org/10.1186/s12575-015-0020-z>
- Morin, E., Kohler, A., Baker, A. R., Foulongne-Oriol, M., Lombard, V., Nagy, L. G., Ohm, R. A., Patyshakuliyeva, A., Brun, A., Aerts, A. L., Bailey, A. M., Billette, C., Coutinho, P. M., Deakin, G., Doddapaneni, H., Floudas, D., Grimwood, J., Hildén, K., Kües, U., ... Martin, F. (2012). Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(43), 17501–17506. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206847109>
- O'Connor, E., McGowan, J., McCarthy, C. G. P., Amini, A., Grogan, H., & Fitzpatrick, D. A. (2019). Whole Genome Sequence of the Commercially Relevant Mushroom Strain var. ARP23. *G3*, *9*(10), 3057–3066. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400563>
- Ohm, R. A., de Jong, J. F., Lugones, L. G., Aerts, A., Kothe, E., Stajich, J. E., de Vries, R. P., Record, E., Levasseur, A., Baker, S. E., Bartholomew, K. A., Coutinho, P. M., Erdmann, S., Fowler, T. J., Gathman, A. C., Lombard, V., Henrissat, B., Knabe, N., Kües, U., ... Wösten, H. A. B. (2010). Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nature Biotechnology*, *28*(9), 957–963. <https://doi.org/10.1038/nbt.1643>
- Ou, S., Su, W., Liao, Y., Chougule, K., Agda, J. R. A., Hellinga, A. J., Lugo, C. S. B., Elliott, T. A., Ware, D., Peterson, T., Jiang, N., Hirsch, C. N., & Hufford, M. B. (2019). Benchmarking transposable element annotation methods for creation of a streamlined, comprehensive pipeline. *Genome Biology*, *20*(1), 275. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1905-y>
- Pardo-Giménez, A., Pardo, J. E., Dias, E. S., Rinker, D. L., Caitano, C. E. C., & Zied, D. C. (2020). Optimization of cultivation techniques improves the agronomic behavior of *Agaricus subrufescens*. *Scientific Reports*, *10*(1), 8154. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65081-2>
- Park, Y.-J., Baek, J. H., Lee, S., Kim, C., Rhee, H., Kim, H., Seo, J.-S., Park, H.-R., Yoon, D.-E., Nam, J.-Y., Kim, H.-I., Kim, J.-G., Yoon, H., Kang, H.-W., Cho, J.-Y., Song, E.-S., Sung, G.-H., Yoo, Y.-B., Lee, C.-S., ... Kong, W.-S. (2014). Whole genome and global gene expression analyses of the model mushroom *Flammulina velutipes* reveal a high capacity for lignocellulose degradation. *PloS One*, *9*(4), e93560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093560>
- Rhie, A., Walenz, B. P., Koren, S., & Phillippy, A. M. (2020). Merquy: reference-free quality, completeness, and phasing assessment for genome assemblies. *Genome Biology*, *21*(1), 245. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02134-9>
- Royse, D. J., Baars, J., & Tan, Q. (2017). Current overview of mushroom production in the world. In *Edible and Medicinal Mushrooms* (pp. 5–13). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119149446.ch2>
- Sabino Ferrari, A. B., Azevedo de Oliveira, G., Mannocho Russo, H., Carvalho Bertozo, L., Silva Bolzani, V., Cunha Zied, D., Farias Ximenes, V., & Zeraik, M. L. (2021).

- Pleurotus ostreatus and *Agaricus subrufescens* : investigation of chemical composition and antioxidant properties of these mushrooms cultivated with different handmade and commercial supplements. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(1), 452–460. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14660>
- Smiderle, F. R., Ruthes, A. C., van Arkel, J., Chanput, W., Iacomini, M., Wichers, H. J., & Van Griensven, L. J. L. D. (2011). Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 58. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-58>
- Sonnenberg, A. S. M., Sedaghat-Telgerd, N., Lavrijssen, B., Ohm, R. A., Hendrickx, P. M., Scholtmeijer, K., Baars, J. J. P., & van Peer, A. (2020). Telomere-to-telomere assembled and centromere annotated genomes of the two main subspecies of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveal especially polymorphic chromosome ends. *Scientific Reports*, 10(1), 14653. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71043-5>
- Sorimachi, K., Ikehara, Y., Maezato, G., Okubo, A., Yamazaki, S., Akimoto, K., & Niwa, A. (2001). Inhibition by *Agaricus blazei* Murill fractions of cytopathic effect induced by western equine encephalitis (WEE) virus on VERO cells in vitro. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(7), 1645–1647. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.1645>
- Souza Dias, E., Labory, C. R. G., Herrera, K. M. S., Alves, A. A., Torres, G. A., & Rinker, D. L. (2008). Cytological studies of *Agaricus brasiliensis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24(11), 2473–2479. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9769-4>
- Stamets, P., Wasser, S. P., da Eira, A. F., Didukh, M. Y., & de Amazonas, M. A. L. (2002). Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4(4), 24. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v4.i4.10>
- Venkatesh Gobi, V., Rajasankar, S., Ramkumar, M., Dhanalakshmi, C., Manivasagam, T., Justin Thenmozhi, A., Essa, M. M., & Chidambaram, R. (2018). *Agaricus blazei* extract attenuates rotenone-induced apoptosis through its mitochondrial protective and antioxidant properties in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Nutritional Neuroscience*, 21(2), 97–107. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2016.1222332>
- Vieira Junior, W. G., Centeio Cardoso, R. V., Fernandes, Â., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Pardo-Giménez, A., ... & Zied, D. C. (2022). Influence of strains and environmental cultivation conditions on the bioconversion of ergosterol and vitamin D2 in the sun mushroom. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(4), 1699-1706.
- Vurture, G. W., Sedlazeck, F. J., Nattestad, M., Underwood, C. J., Fang, H., Gurtowski, J., & Schatz, M. C. (2017). GenomeScope: fast reference-free genome profiling from short reads. *Bioinformatics*, 33(14), 2202–2204. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx153>
- Wan, J.-N., Li, Y., Guo, T., Ji, G.-Y., Luo, S.-Z., Ji, K.-P., Cao, Y., Tan, Q., Bao, D.-P., & Yang, R.-H. (2021). Whole-Genome and Transcriptome Sequencing of Reveals Its Associated Ectomycorrhizal Niche and Conserved Pathways Involved in Fruiting Body Development. *Frontiers in Microbiology*, 12, 732458. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.732458>

- Wintersinger, J. A., & Wasmuth, J. D. (2015). Kablammo: an interactive, web-based BLAST results visualizer. *Bioinformatics*, *31*(8), 1305–1306. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu808>
- Wisitrassameewong, K., Karunarathna, S. C., Thongklang, N., Zhao, R., Callac, P., Moukha, S., Férandon, C., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2012). *Agaricus subrufescens*: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *19*(2), 131–146. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.01.003>
- Xu, L., Dong, Z., Fang, L., Luo, Y., Wei, Z., Guo, H., Zhang, G., Gu, Y. Q., Coleman-Derr, D., Xia, Q., & Wang, Y. (2019). OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W52–W58. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz333>
- Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F., & Xu, Y. (2012). dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, *40*(Web Server issue), W445–W451. <https://doi.org/10.1093/nar/gks479>
- Yuan, X., Feng, C., Zhang, Z., & Zhang, C. (2017). Complete Mitochondrial Genome of and Identification of Molecular Markers for the Oomycetes. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1484. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01484>
- Yuan, Y., Wu, F., Si, J., Zhao, Y.-F., & Dai, Y.-C. (2019). Whole genome sequence of *Auricularia heimuer* (Basidiomycota, Fungi), the third most important cultivated mushroom worldwide. *Genomics*, *111*(1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.12.013>
- Yu, F., Song, J., Liang, J., Wang, S., & Lu, J. (2020). Whole genome sequencing and genome annotation of the wild edible mushroom, *Russula griseocarnosa*. *Genomics*, *112*(1), 603–614. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.04.012>
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., Busk, P. K., Xu, Y., & Yin, Y. (2018). dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W95–W101. <https://doi.org/10.1093/nar/gky418>
- Zied, D. C., Pardo Gimenez, A., Pardo Gonzalez, J. E., Souza Dias, E., Carvalho, M. A., & Minihoni, M. T. D. A. (2014). Effect of cultivation practices on the  $\beta$ -glucan content of *Agaricus subrufescens* basidiocarps. *Journal of agricultural and food chemistry*, *62*(1), 41–49. <https://doi.org/10.1021/jf403584g>
- Zied, D. C., Vieira Junior, W. G., Soares, D. M. M., Stevani, C. V., Dias, E. S., Iossi, M. R., & Pardo-Giménez, A. (2021). Overview of four *Agaricus subrufescens* strains used in the last 15 years in Brazil and other countries and current potential materials for the future. *Mycological Progress*, *20*(8), 953–966. <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01711-x>
- Zimin, A. V., Marçais, G., Puiu, D., Roberts, M., Salzberg, S. L., & Yorke, J. A. (2013). The MaSuRCA genome assembler. *Bioinformatics*, *29* (21), 2669–2677. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt476>