



JANAIRA SANTANA NUNES RIBEIRO

**REP-PCR, ULTRAESTRUTURA DE
LINHAGENS DE *Agaricus bisporus* E DE SUA
INTERAÇÃO COM *Lecanicillium fungicola***

LAVRAS – MG

2014

JANAIRA SANTANA NUNES RIBEIRO

**REP-PCR, ULTRAESTRUTURA DE LINHAGENS DE *Agaricus bisporus* E DE
SUA INTERAÇÃO COM *Lecanicillium fungicola***

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

Orientador

Dr. Eduardo Alves

Co-orientador

Dr. Eustáquio Souza Dias

Dr. Diego Cunha Zied

LAVRAS – MG

2014

Ficha catalográfica

JANAIRA SANTANA NUNES RIBEIRO

**REP-PCR, ULTRAESTRUTURA DE LINHAGENS DE *Agaricus bisporus* E DE
SUA INTERAÇÃO COM *Lecanicillium fungicola***

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

APROVADA em 17 de julho de 2014.

Dr. Edson Ampélio Pozza	UFLA
Dr^a Patrícia Gomes Cardoso	UFLA
Dr^a Simone Cristina Marques	UFLA
Dr. Diego Cunha Zied	UNESP

Dr. Eduardo Alves
Orientador

Dr. Eustáquio Souza Dias
Dr. Diego Cunha Zied
Co-orientadores

LAVRAS – MG

2014

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus que me guia e me dá forças para nunca desistir dos meus objetivos.

A minha mãe (Maria Santana), irmãos (Francisco Junior, Edna Maria, Rosália Nunes e Jucélia Nunes) e meu marido (Fernando Barreto) ao apoio e incentivo para minha ascensão pessoal e principalmente pela inesgotável confiança nas minhas capacidades.

Ao meu orientador Eduardo Alves e co-orientador Eustáquio Sousa Dias, pela confiança, orientação, paciência e ao conhecimento compartilhado durante a realização desse trabalho.

Ao meu co-orientador Diego Zied pela disponibilidade e orientação.

As minhas três amigas Manuela Brito, Cláudia Labory e Simone Marques, que possibilitaram essa caminhada com seu apoio, confiança, estímulos e generosamente oferecidos. Elas, que muitas vezes me ouviram e me deram uma palavra de ânimo, tanto quando eu alcançava minhas conquistas, quanto quando enfrentava algumas dificuldades que iam surgindo.

A todos meus colegas do Laboratório de Cogumelos e do Laboratório de Microscopia e Análise Ultraestrutural por toda ajuda, troca de experiência e pela alegria que tornava o ambiente de trabalho tão agradável.

As minhas amigas de residência (Amanda, Andréia, Alessandra, Terezinha e Natália), com quem dividi momentos de alegria e descontração.

A Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola ao conhecimento e formação.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola aos ensinamentos.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Por fim, durante a realização do curso, muitas pessoas tiveram participação no desenvolvimento desse projeto, seja por meio de informações, seja por reflexões que me fizeram analisar cada situação. Foram tantas pessoas que eu prefiro não citar e acabar esquecendo de alguém. Assim, a todos meus agradecimentos por terem me ajudado na realização dessa pesquisa que, hoje, concede-me a oportunidade de obter título de Doutora.

RESUMO

O *Agaricus bisporus* é o cogumelo comestível mais apreciado e cultivado no mundo. No Brasil, o fungo apresenta elevada diversidade de linhagens de diferentes origens dificultando o cultivo por ausência de informações importantes como variabilidade genéticas, características morfológicas e agronômicas. Além disso, a presença de parasitas que levam a ocorrência de doenças no cultivo, como a bolha seca, causada por *Lecanicillium fungicola*, também dificultam a produção desse cogumelo, causando perdas econômicas. Dois estudos foram conduzidos envolvendo este cogumelo. No primeiro, 14 linhagens de *A. bisporus* foram avaliadas com a técnica de Rep-PCR e por microscopia eletrônica. A técnica de Rep-PCR permitiu agrupar os isolados a partir da similaridade. Por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi possível a observação de hifas de conexão entre os basídios. Também foram visualizados, predominantemente dois basidiósporos por basídio, com a ocorrência ocasional de basídios com um, três e quatro basidiósporos. Por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram observados núcleos, vacúolos, corpos lipídicos e vesículas, além de substâncias de reserva presentes nos basidiósporos. O estudo demonstra que todas as linhagens brasileiras são pertencentes a variedade *bisporus*, e que possuem uma variação genética significativa, podendo apresentar características peculiares. No segundo foi avaliado por MEV, o processo de infecção de *L. fungicola* em três linhagens brasileiras de *A. bisporus*. Foi possível visualizar o processo de infecção do *L. fungicola* em três linhagens de *A. bisporus*, tanto na fase vegetativa, como na fase de formação dos basidiocarpos. As micrografias demonstram a resistência do micélio vegetativo à infecção, tendo sido observado o processo de colonização e reprodução do parasita apenas em basidiocarpos, com formação de fiálides, conidióforos e verticílios. A formação de cristais de oxalato cálcio foi observada, utilizado a microanálise de raios X, tanto no ponto de encontro das hifas em placa, como na infecção dos basidiocarpos. Esses cristais podem estar relacionados com a patogenicidade do *L. fungicola*. Esse é o primeiro estudo que demonstra o processo de infecção do *L. fungicola*, desde o início da formação dos tubos germinativos (16 horas) até a colonização total do tecido (50 horas) em basidiocarpos de *A. bisporus*.

Palavras-chave: cogumelo, micopatógeno, microscopia eletrônica, rep-PCR.

ABSTRACT

Agaricus bisporus is the most appreciated and cultivated edible mushroom in the world. In Brazil, the productive sector has a wide range of strains from different origins. It makes hard to cultivate this mushroom due to the lack of important information such as genetic variability, and morphological and agronomical characteristics. The presence of parasites which lead to the occurrence of diseases in the cultivation like the dry bubble disease caused by *Lecanicillium fungicola* have also hampered this mushroom production as well as caused great economic losses. The better understanding of the produced strains and their differences likewise the interaction between the mushroom and pathogens allow the improvement of techniques that enable a reduction of production costs, resulting in lower costs for both the producer and the consumer. The present theses was split into two studies. On the first, fourteen *A. bisporus* strains were evaluated with Rep-PCR technique and electronic microscopy. Rep-PCR technique allowed separating isolates into two groups according to their similarity. Using Scanning Electron Microscopy (SEM) it was possible to observe connection hyphae between basidia. Two basidia per basidiospore were also noticed with occasional occurrence of basidium with one, three and four basidiospores. Using Transmission electron microscopy (TEM), nuclei, vacuoles, lipid bodies and vesicles, besides reserve substances present in basidiospores were observed. On the second, the infection process of *A. bisporus* by *L. fungicola* was investigated with SEM. The infection process of *L. fungicola* in three strains of *A. bisporus* was visualized both at vegetative phase and at the phase of fruiting body formation. Micrographs show resistance of vegetative mycelium to infection. However, the colonization process and fungi reproduction on basidiocarps with phialides, conidiophores and whorls of *L. fungicola*. The formation of calcium oxalate crystals using X-ray microanalyses both at the matching point of the hyphae in the plate and basidiocarps infection was also observed.

Keywords: Mushroom, myco pathogen, electron microscopy, Rep-PCR.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1	<i>Agaricus bisporus</i>	10
2.2	Avaliação molecular por Rep-PCR	10
2.3	<i>Lecanicillium fungicola</i>	12
2.4	Doença Bolha Seca.....	14
2.5	Estudos da Ultraestrutura dos cogumelos	15
3	REFERÊNCIAS.....	17

SEGUNDA PARTE: ARTIGOS CIENTÍFICOS SUBMETIDOS

ARTIGO 1: Análise Rep-PCR e ultraestrutura de diferentes linhagens de *Agaricus bisporus*.....22

ARTIGO 2: Avaliação do processo de infecção por *Lecanicillium fungicola* em *Agaricus bisporus* por microscopia eletrônica de varredura

44

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O *Agaricus bisporus* (Lange) popularmente conhecido como Champignon é um alimento apreciado principalmente por seu valor gastronômico, nutritivo e medicinal, fato que tem estimulado a produção e o cultivo (SAIQA et al., 2008). Em 2011 a produção mundial de cogumelos foi de aproximadamente 7,7 milhões de toneladas, sendo o *A. bisporus* considerado o cogumelo comestível mais importante economicamente, representando quase metade da produção mundial de cogumelos (FAOSTAT, 2014)

O fungicultor deve compreender algumas peculiaridades em relação à fisiologia, nutrição e metabolismo do fungo para obter um cultivo de sucesso. Os principais fatores para o sucesso da produção são: utilização de uma linhagem com potencial genético elevado; produção de um composto que seja mais seletivo possível para o desenvolvimento do fungo; tecnologia de cultivo adequada para o controle das variáveis ambientais; utilização de camada de cobertura de qualidade, higiene, mão-de-obra qualificada para colheita; monitoramento e controle de pragas e doenças (MANOLOPOULOU et al., 2007).

A produção mundial de cogumelos e as tecnologias de cultivo tendem a evoluir em paralelo com o mercado consumidor, visto que a exigência pela qualidade do produto é o objetivo dos produtores de cogumelos. Portanto, além de fornecer produtividades elevadas, a linhagem utilizada no cultivo deve possuir características peculiares para atender ao mercado, como coloração e morfologia. Em países cujo cultivo de cogumelos existe a longa data, é comum a utilização de linhagens de *A. bisporus* com denominações, morfologia e características produtivas estabelecidas para os fungicultores (DIAMANTOPOULOU; PHILIPPOUSSIS, 2001). No Brasil, não há informações importantes dessas linhagens, dentre elas, suas características genéticas (híbrido ou não), suas condições de crescimento (temperatura, umidade relativa do ar, teor de CO₂), época do ano mais apropriada para o cultivo e até mesmo que variedade está sendo cultivada (Champignon ou Bitorquis).

Outro problema é a presença de contaminantes e doenças nos cultivos como *L. fungicola* resultando em grandes perdas econômicas. Esse micopatógeno é o agente causador da doença bolha seca em *A. bisporus* que vem comprometendo a produção do cogumelo e provocando grandes perdas de produtividade (BERNARDO et al., 2004). O

patógeno induz o aparecimento de vários sintomas como manchas no basidiocarpo e descascamento do estipe, que já podem ser observadas a partir de 72 horas após a infecção.

A técnica por Rep-PCR é uma importante ferramenta na avaliação de diversidade dos isolados. A microscopia eletrônica pode contribuir para a descrição das linhagens que são utilizadas no país, bem como ajudar a elucidar a relação patógeno-hospedeiro. Conhecer bem as linhagens produzidas suas características genéticas e morfológicas, bem como a interação entre o cogumelo e o patógeno, permitem não só o conhecimento sobre as linhagens produzidas no país, mais facilitará novas pesquisas para controle do *L. fungicola* no cultivo do *A. bisporus*. Assim, o estudo foi realizado com o objetivo de:

- a) Avaliar, por Rep-PCR, a diversidade genética das linhagens de *A. bisporus*;
- b) Observar o processo de basidiosporogênese e a variação do número de basidiósporos produzidos por basídio nos diferentes isolados em *A. bisporus*;
- c) Acompanhar a interação entre *L. fungicola* e *A. bisporus* por MEV;

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Agaricus bisporus*

A ordem Agaricales compreende trezentos gêneros, sendo que cerca de cinco mil representantes comestíveis, medicinais, alucinógenos, micorrízicos, saprófitos, parasitas, entre outros, sendo de grande interesse do ponto de vista alimentício, etnológico, industrial e ecológico (ALEXOPOULOS et al., 1996). As espécies dessa ordem têm sido classificadas e descritas, baseando-se, fundamentalmente nos caracteres morfológicos, anatômicos e bioquímicos dos basidiomas (SOUZA; AGUIAR, 2003).

Na Europa e na Ásia já se comercializa mais de 50 variedades de *Agaricus* que se diferenciam uma das outras quanto a forma e cor (liso, escamoso, branco, creme, castanho, marrom), fragilidade, produtividade, resistência às doenças, necessidades nutritivas e condições climáticas. Em países cujo cultivo de cogumelos existe a longa data, é comum a utilização de linhagens de *A. bisporus* com denominações, morfologia e características produtivas estabelecidas para os fungicultores (DIAMANTOPOULOU; PHILIPPOUSSIS, 2001). No Brasil, desde o início do cultivo do *A. bisporus*, não houve um processo rastreabilidade das linhagens que foram trazidas dos outros países, que permitiria manter um banco de dados e informações sobre todas as etapas de cultivo, atestando, desta forma, a qualidade do produto.

Agaricus bisporus (Champignon de Paris) é a espécie de cogumelo mais cultivada e consumida no mundo (ROYSE; CHALUPA, 2009). A importância deste cogumelo vai além de dados econômicos e nutricionais. A participação em processos biogeoquímicos em pastagens, florestas de bambu, dunas costeiras (KERRIGAN, 1986), bem como seu potencial para biorremediação de metais pesados ou outros poluentes tóxicos como fenóis, já foi relatado (GARCIA et al., 2005, KAMEDA et al., 2006).

Inúmeras descobertas importantes marcam o caminho para o conhecimento sobre *A. bisporus*. Dentre as principais descobertas, no que se refere à reprodução sexuada pode-se citar: o ciclo de vida marcado pela predominância do pseudo-homotalismo, confirmado por Raper et al (1972); a descoberta do locus *BSN*, presente no cromossomo *I*, que apresenta um comportamento eficaz e dominante na determinação da número de esporos formados no basídio (IMBERNON et al., 1996); a descrição de três variedades de *A. bisporus* (var. *bisporus*, var. *burnettii* e var. *eurotetrasporus*) que diferem entre si

por ciclo de vida, tamanho do esporo e o número médio do basidiósporos por basídios (CALLAC et al., 2006).

Agaricus bisporus var. *bisporus* possui predominantemente ciclo de vida com pseudohomotalismo (RAPER et al., 1976), em que apesar da existência do fator de incompatibilidade, o micélio heterocariótico pode se desenvolver a partir da germinação dos esporos que é autofértil, pois normalmente possuem basidiósporos com dois núcleos de "mating type" diferentes. Essa variedade apresenta cerca de 90% de basídios bispóricos (CALLAC et al., 1993).

Agaricus bisporus var. *burnettii* descoberto por Callac et al (1993) no deserto de Sonora da Califórnia, possui um ciclo de vida heterotálico, sendo o micélio produzido pela germinação do esporo sexual é incapaz de autofertilização e por isso torna-se necessário um tipo sexual compatível para o cruzamento. Neste caso há uma baixa ocorrência de basídios bispóricos.

Callac et al (1998) ainda descreveram uma espécie rara de *A. bisporus* var. *Eurotetrasporus* encontrada na Europa. Essa espécie também possui basídios tetrapóricos apresentando homotalismo primário, em que micélio autofértil pode ser produzido pela germinação de esporos com núcleos sem fator de incompatibilidade. A predominância de basídios tetraspóricos em *A. bisporus*, resulta da presença do alelo dominante (*Bsn-t*) no locus *BSN*, que determina o número de esporos por basídio (CALLAC et al., 2006).

2.2 Avaliação molecular por Rep-PCR

Micro-organismos compõem uma das maiores fontes de diversidade genética disponíveis entre os seres vivos (PROSSER et al., 2007). O desenvolvimento da biologia molecular tem contribuído para identificar, compreender a diversidade genética e a caracterização de espécies, além de auxiliar a detecção dos detalhes entre linhagens (PARELLONI, 1993). As técnicas de sequenciamento e métodos eletroforéticos têm sido comumente utilizadas para estudos de taxonomia de fungos (GUARRO et al., 1999). A interpretação dos géis de eletroforese de PCR pode ser utilizada para quantificar a variabilidade genética. Essa técnica oferece vantagens por ser rápida e versátil possibilitando que um grande número de genótipos possa ser caracterizado em pouco tempo (FUNGARO; VIEIRA, 1998).

Os genomas microbianos possuem cerca de 5% de sequências repetidas de DNA (USSERY et al., 2004). Alguns dados sugerem que o DNA repetitivo pode estar envolvido na síntese ou catabolismo de RNA e DNA (TOBES; RAMOS, 2005), ou podem ser mediadores da evolução do genoma (SCHMIDT; ANDERSON, 2006). As Sequências Palindrômicas Extragênicas Repetitivas (Rep-PCR) constitui na amplificação de sequências repetidas no genoma (VERSALOVIC et al., 1994). Quando essas sequências são detectadas, dentro de uma distância amplificável durante a reação de polimerase em cadeia, um produto de PCR de tamanho característico é gerado, de modo que o genoma possa gerar um padrão de polimorfismo em um gel (VERSALOVIC et al., 1991). O Rep-PCR tem demonstrado ser uma ferramenta valiosa para rastrear e analisar a variabilidade de micro-organismos (RADEMAKER et al., 2008).

Na última década o Rep-PCR tem sido utilizado para avaliação de patógenos de animais e plantas, micro-organismos do solo, e de inúmeros ambientes (FRYE; HEALY, 2006; RADEMAKER et al., 2008). Gurel et al (2010) demonstraram que a técnica de Rep-PCR foi eficaz para mostrar a diversidade genética em isolados de *Fusarium culmorum* coletados a partir de campos de trigo, na Turquia. A análise de agrupamento mostrou concordância com a distância dos locais de amostragem, em que foi encontrada maior similaridade entre isolados de mesma região agroecológica. Castro et al (2011) testaram a variabilidade intraespecífica entre isolados de *Edwardsiella tarda* utilizando quatro métodos baseados em reação de polimerase em cadeia (PCR), e concluíram que o Rep-PCR foi capaz de maior discriminação dentro das estirpes avaliadas. Existem outros estudos na literatura com aplicação do Rep-PCR para analisar a variabilidade intraespecífica. Entretanto, nenhum estudo de caracterização de *A. bisporus* com utilização dessa técnica foi encontrado. A discriminação genética das linhagens de cogumelos produzidos no Brasil pode favorecer futuros estudos de caracterização e permitirá a criação de um banco de dados para o acompanhamento as linhagens brasileiras.

2.3 *Lecanicillium fungicola*

Lecanicillium fungicola pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Subclasse Hypocreales, Ordem, Family Cordycipitaceae, Hypocreomycetidae e Gênero *Lecanicillium*. Esse fungo é

caracterizado por possuir conidióforos distintos, sendo dispostos em forma de espiral com duas a cinco voltas de três a sete fiáldes. Os conídios são grandes e desiguais (ZARE; GAMS, 2008).

Lecanicillium fungicola foi descrito pela primeira vez como *Acrostalagmus fungicola* por Preuss (1851). Posteriormente o micopatógeno foi relatado por pesquisadores franceses Costantin e Dufour (1892). Smith (1924) propôs o nome *Constatinii cephalosporium*. Ware (1933) mudou o nome para *Verticillium malthousei*. Somente em 1936, outro pesquisador relatou o patógeno como *Verticillium fungicola* (HASSEBRAUK, 1936).

A espécie *L. fungicola* foi por muito tempo classificada como *V. fungicola*. Zaayen e Gams (1982) fizeram uma revisão sobre a taxonomia e patogenicidade de fungos do gênero *Verticillium*, baseados principalmente em diferenças fisiológicas e propuseram a criação de três variedades de *V. fungicola* (*V. fungicola* var. *fungicola*, *V. fungicola* var. *aleophillum* e *V. fungicola* var. *flavidum*).

Zare e Gams (2008), estudando o *V. fungicola* por análises morfológicas e moleculares observaram que a espécie estava bem mais próxima do gênero *Lecanicillium*. Com isso, a espécie *V. fungicola* e suas variedades foram renomeados a *L. fungicola* var. *aleophillum*, *L. fungicola* var. *flavidum* e *L. fungicola* var. *fungicola*.

Este fungo é patógeno de vários basidiomicetos, sendo o *A. bisporus* considerado o seu principal hospedeiro (BERENDSEN et al., 2010). As duas variedades de *L. fungicola*, variedade *fungicola* e *aleophillum*, diferenciam entre si principalmente devido à última apresentar uma maior taxa de crescimento em temperatura mais elevada. Consequentemente, *A. bitorquis*, que se desenvolve em temperaturas mais elevadas do que *A. bisporus*, é o principal hospedeiro da variedade *aleophillum*, embora ambas as variedades possam infectar as espécies de *Agaricus* citadas (ZARE; GAMS, 2008). A subespécie *fungicola* é habitualmente relatada na Europa, enquanto a variedade *aleophillum* é comum na América do Norte (LARGETEAU; SAVOIE, 2010).

A infecção do *L. fungicola* acontece quando os cogumelos apresentam-se no início da formação dos basidiocarpos ou em fase de colheita (LARGETEAU; SAVOIE, 2008). Aparentemente, a adesão do patógeno ao hospedeiro ocorre pela presença de hidrofobinas na parede celular de ambos os fungos (CALONJE et al., 2000). O reconhecimento acontece a partir de glicogalactomananas presentes na parede do *L. fungicola* que são capazes de reconhecer e se ligar a lectina do hospedeiro. A lectina pode ser isolada somente a partir dos basidiomas, o que explicaria o fato da infecção

não ocorrer na hifa vegetativa (GARCÍA MENDOZA et al., 2003; BERNARDO et al., 2004). Largeteau et al (2007) confirmaram que lectina apresenta-se apenas no tecido do corpo de frutificação e está envolvida no reconhecimento e interação com o hospedeiro.

Após a ligação inicial, o *L. fungicola* pode crescer inter e intracelularmente nas hifas do corpo de frutificação do *A. bisporus*. A invasão ocorre por meio da combinação de dois processos. O enfraquecimento da parede celular do *A. bisporus* devido à produção de enzimas líticas por *L. fungicola* e por pressão mecânica por formação do apressório e penetração da estrutura de penetração (CALONJE et al., 1997, DRAGT et al., 1996). Como a parede celular *A. bisporus* consiste principalmente de quitina e glucanas, o patógeno possui enzimas hidrolíticas (quitinases e glucanases) que desempenham um papel importante na quebra da parede das células hospedeiras, permitindo que a infecção se desenvolva (CALONJE ET AL., 2000 ; MILLS et al., 2000) .

2.4 Doença bolha seca

A doença bolha seca é uma das doenças mais comuns em cogumelos comestíveis, sendo uma das maiores preocupações no cultivo de *A. bisporus* (BERENDSEN et al., 2012). Os sintomas da doença, causada por este fungo, depende do tempo de infecção, estágio de desenvolvimento da cultura e da variabilidade genética do hospedeiro (BAAR et al., 2007). Quando a infecção ocorre na fase em que os cogumelos estão desenvolvidos ou em fase de colheita, é comum o aparecimento de manchas escuras de tonalidade castanha, bordos irregulares e não definidos na superfície do píleo. Nesse caso, pode ocorrer ainda rachaduras, aparecimento de fendas e descascamento do estipe. Em corte longitudinal pode-se observar uma cavidade interna também escurecida. Em virtude disto os cogumelos tornam-se secos, enrugados e inadequados para o consumo (LARGETEAU; SAVOIE 2008).

Outro tipo de sintoma ocorre em uma fase intermediária do cultivo (formação do botão), no início da formação do corpo de frutificação. Nesse caso observa-se uma espécie de estiolamento, isto é, o corpo de frutificação não mais se desenvolve e adquire uma coloração amarelada. A infecção ainda pode ocorrer preciosamente, causando uma massa indiferenciada do tecido do estipe e do píleo formando uma massa disforme que dá origem ao nome bolha seca (BERENDSEN et al., 2010).

Os esporos do patógeno espalham-se facilmente por meio da poeira, equipamentos utilizados no cultivo e terra de cobertura, sendo linhagens comerciais de

A. bisporus geralmente muito suscetíveis à doença bolha seca (DRAGT et al., 1996). Assim, a primeira forma de prevenir a incidência da doença é com boas práticas de higiene e saneamento (GROGAN, 2008). A temperatura e umidade relativa são fatores importantes tanto para o cultivo do cogumelo quanto na disseminação da doença (GRIENSVEN, 1988). Nair e Macauley (1987) observaram que a manipulação da temperatura e umidade durante a produção de cogumelos pode afetar o desenvolvimento da doença. Em seus experimentos, os autores demonstraram que as reduções da temperatura de 20 °C para 14 °C e umidade de 90% para 80% durante vários dias foram capazes de diminuir significativamente a quantidade de cogumelos infectados.

Os métodos de controle também incluem a utilização de fungicidas. Os primeiros fungicidas usados para controlar a doença Bolha seca foram ditiocarbamatos, principalmente Zineb (YODER et al., 1950.), mais tarde substituído por Mancozeb (NEWMAN; SAVIDGE, 1969). Holmes et al (1971) propuseram a utilização de um fungicida contendo carbendazim (metilbenzilimidazol carbamato - MBC), mas o uso prolongado resultou em isolados resistentes de *L. fungicola* (WUEST et al., 1974). O próximo fungicida utilizado para controlar a bolha seca continha em sua fórmula o clorotalonil como ingrediente ativo, conhecido como Tetraclo Isoftalonitrilo (GANDY; SPENCER, 1976). No entanto, após 20 anos de aplicação o *L. fungicola* começou a desenvolver resistência e o clorotalonil também passou a ser ineficaz no controle da doença (BONNEN; HOPKINS, 1997). Atualmente, o Procloraz-Mg é o mais utilizado para o controle da bolha seca, mas dados sugerem que a sensibilidade do patógeno vem diminuindo (GROGAN, 2008).

2.5 Estudos da ultraestrutura do cogumelo

O surgimento de microscópios mais modernos, entre eles os microscópios eletrônicos de transmissão e de varredura, permitiu o estudo de amostras frescas e o mínimo de manipulação possível durante o processamento (COLLINS et al., 1993). A caracterização da ultraestrutura de fungos é fundamental para entender alguns aspectos do desenvolvimento celular e taxonômico, como por exemplo, germinação de esporos, interações hospedeiros-patógenos, comportamento nuclear, estudos de organelas, estudos sobre a organização celular, o conhecimento sobre processos de controle de disseminação, controle de atividades economicamente importantes e patogenicidade (MIMS, 1991).

A microscopia eletrônica foi utilizada para estudos taxonômicos e desenvolvimento celular e comportamento nuclear de *A. bisporus*. Greuter e Rast (1975) visualizaram, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, mitocôndrias, ribossomos e corpos lipídicos em basidiósporos de *Agaricus bisporus*. Os autores ainda descreveram a disposição de três camadas da parede celular dos basidiósporos, duas camadas mais espessas e uma mais delgada próxima ao citoplasma. A microscopia eletrônica também foi de grande importância para descrever os ciclos de vida, tamanhos de esporos e o número médio de basidiósporos por basídio de diferentes variedades de *A. bisporus* (CALLAC et al., 2006). No entanto, as linhagens brasileiras nunca foram observadas quanto sua ultraestrutura. As análises ultraestruturais podem auxiliar na descrição do perfil dos isolados de *A. bisporus* cultivados no Brasil.

A microscopia eletrônica também tem sido uma ferramenta presente com intuito de explicar a interação hospedeiro-patógeno na relação *L. fungicola* - *A. bisporus*. North e Wuest (1993) utilizaram microscopia eletrônica de varredura para observar o processo de infecção do *L. fungicola* e *A. bisporus* e não visualizaram formação de estruturas especializadas de penetração. No entanto, Dragt et al (1996) utilizando microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelaram que *L. fungicola* forma estruturas especializadas de penetração para infecção em *A. bisporus*. Tal fato foi confirmado por Calonje et al (1997). A resistência do micélio vegetativo de *A. bisporus* ao *L. fungicola* também tem sido analisada por de microscopia eletrônica (CALONJE et al., 2000; SHAMSHAD et al., 2009). Apesar dos estudos envolvendo a interação *L. fungicola* - *A. bisporus*, não há informações a respeito do tempo em que o patógeno leva desde a formação dos tubos germinativos até colonização total do tecido do hospedeiro, dados importantes para o desenvolvimento de estratégias de controle.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, CHARLES W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 69 p.1996.
- BAAR, J.; STRAATSMA, G.; PARADI, I.; AMSING, G.M. Edible mushrooms: from industrial cultivation to collection from the wild. *In: Food Mycology A Multifaceted Approach to Fungi and Food*. Dijksterhuis J., Samson R.A. (Eds.). p. 361-374.2007. ISBN 0-8493-9818-5.
- BERENDSEN, R. L.; KALKHOVE, S.I.C.; LUGONES, L.G.; BAARS, J.J.P.; WÖSTEN, H.A.B.; BAKKER, P.A.H.M. Effects of fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from mushroom cultures on *Lecanicillium fungicola*. **Biological Control**, v. 63, p. 210–221. 2012.
- BERENDSEN, R.L.; BAARS, J. P.; , KALKHOVE, S. I. C. ; LUGONES, L.G.;; WÖSTEN, H.A. B.; BAKKER, P. A. H. M. Pathogen profile *Lecanicillium fungicola*: causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. **Molecular Plant Pathology**, v.11, p 585-595. 2010.
- BERNARDO, D.; CABO, AP.; NOVAES-LEDIEU, M.; MENDOZA, G.C. *Verticillium* disease or ‘dry bubble’ of cultivated mushrooms: the *Agaricus bisporus* lectin recognizes and binds the *Verticillium fungicola* cell wall glucogalactomannan. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 729–735, 2004.
- BONNEN, A.M.; HOPKINS, C. Fungicide resistance and population variation in *Verticillium fungicola*, a pathogen of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. **Mycology Research**, v.101, p. 89-96. 1997.
- CALLAC, P.; BILLETTE, C.; IMBERNON, M.; KERRIGAN, R.W. Morphological, genetic and interfertility analyses reveal novel, tetrasporic variety of *Agaricus bisporus* from the Sonoran Desert of California. **Mycologia**, v. 85, p. 835–851. 1993.
- CALLAC, P.; HOCQUART, S.; IMBERNON, M.; DESMERGER, C.; OLIVIER, J.M. *Bsn-t* allele from French field strains of *Agaricus bisporus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p.2105–2110. 1998.
- CALLAC, P.; KAMZOLKINA, O. V.; VOLKOVA, V. N.; KOZLOVA, M. V.; PANCHEVA, E. V.; DYAKOV, Y. T. Karyological evidence for meiosis in the three different types of life cycles existing in *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, v. 98 (5), p. 763-770. 2006.
- CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C.; GALAN, B.; NOVAES-LEDIEU, M. Enzyme activity of the mycoparasite *Verticillium fungicola* on *Agaricus bisporus* fruit body cell walls. **Microbiology**, v.143, p.2999–3006. 1997.
- CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C.; PÉREZ CABO, A.; BERNARDO, D.; NOVAES-LEDIEU, M. Interaction between the mycoparasite *Verticillium fungicola* and the vegetative mycelial phase of *Agaricus bisporus*. **Mycological Research**, v.104,

p.988–992. 2000.

CASTRO, N.; TORANZO, A.E.; BASTARDO, A.; BARJA, J.L.; MAGARIÑOS B. Intraspecific genetic variability of *Edwardsiella tarda* strains from cultured turbot. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 95(3), p. 253-258. 2011.

COLLINS, S.; POPE, R.K.; SCHEETZ, R. W.; RAY, R. I.; WAGNER, LITTLE, B.J. Advantages of environmental scanning electron microscopy in studies of microorganisms. *Microscopy Research Technology*, v. 25, p.398-408, 1993.

CONSTANTIN, J.; DUFOUR, L. Recherches sur la Môle, maladie du champignon de couche. *Revue générale de Botanique*. v. 4, p. 401-406. 1892.

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.

DRAGT, J. W.; GEELS, F. P.; RUTJENS, A. J.; VAN GRIENSVEN, L. J. Resistance in wild types of *Agaricus bisporus* to the mycoparasite *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. *Mushroom Science*, v. 14, p. 679–683. 1995.

DRAGT, J.W.; GEELS, F.P.; DE BRUIJN, W.C.; VAN GRIENSVEN, L.J.L.D. Intracellular infections of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* by the mycoparasite *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. *Mycology Research*, v.100, p. 1082–1086. 1996.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em 05 de maio de 2014.

FRYE, S.R.; HEALY, M. Molecular strain typing using repetitive sequence based PCR. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, v.26, p. 444-471. 2006.

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. **Aplicações da PCR em ecologia molecular**. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: Embrapa, p.205-225. 1998.

GANDY, D.G.; SPENCER, D.M. The use of chlorothalonil for the control of benzimidazole tolerant stains of *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebr. on the cultivated mushroom. *Scientia Horticulturae*, v.5, p. 13-21. 1976.

GARCÍA MENDOZA, G.; BERNARDO D.; PÉREZ CABO, A.; NOVAES-LEDIEU, M. Mechanisms involved in the *Verticillium fungicola* mycoparasitism on *Agaricus bisporus* fruit bodies: *Verticillium* disease or “dry bubble” of cultivated mushrooms. *Recent Research Developments Microbiol*, v. 7, p. 269–278. 2003.

GARCIA, M.A.; ALONSO, J.; MELGAR, M.J. *Agaricus macrosporus* as a potential bioremediation agent for substrates contaminated with heavy metals. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 80, p. 325–330, 2005.

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

GROGAN, J. M. Challenges facing mushroom disease control in the 21st century. In The Proceedings of the sixth international conference on mushroom biology and mushroom products. Bonn: Höntges quickdruck. 2008.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical Microbiology**, v. 12(3), p. 454-500, 1999.

GUREL, F.; ALBAYRAK, G.; DIKEN, O.; CEPNI, E.; TULANI, B. Use of Rep-PCR for Genetic Diversity Analyses in *Fusarium culmorum*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, p. 387-389.2010.

HASSEBRAUK K. Pilzliche Parasiten der getreideroste. **Phytopathology Ztschr**, v.9, p. 514. 1936.

HOLMES, J.H.; COLE, H.; WUEST, P.J. Control of *Verticillium* disease of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* with benomyl spray applications. **Plant Disease Reporter**, v. 55, p. 684-687. 1971.

IMBERNON, M.; GASQUI, P.; KERRIGAN, R.W.; VELCKO, A.J. *BSN*, the primary determinant of basidial spore number and reproductive mode in *Agaricus bisporus*, maps to chromosome I. **Mycologia**, v. 88, p. 749–761. 1996.

KAMEDA, E.; LANGONE, M.A.P.; COELHO, M.A.Z. Tyrosinase extract from *Agaricus bisporus* mushroom and its *in natura* tissue for specific phenol removal. **Environmental Technology**, v. 27, p.1209–1215. 2006.

KERRIGAN, R.W. The Agaricales (Gilled Fungi) of California, 6. Agaricaceae. **Mad River Press**, Eureka, California, 62 pp. 1986.

LARGETEAU ML, REGNAULT-ROGER C, SAVOIE J-M. *Verticillium* disease of *Agaricus bisporus*: variations in host contribution to total fungal DNA in relation to symptom heterogeneity. **European Journal Plant Pathology**, v.118, p.155–164.2007.

LARGETEAU, M. L.; SAVOIE, J. M. Effect of the fungal pathogen *Verticillium fungicola* on fruiting initiation of its host, *Agaricus bisporus*. **Mycological Research**, 112, 825–828. 2008.

LARGETEAU, M.L.; SAVOIE, J.M. Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*: biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.86, p.63–73. 2010.

MANOLOPOULOU, E.; PHILIPPOUSSIS, A.; LAMBRINOS, G.; DIAMANTOPOULOU, P. Evaluation of productivity and postharvest quality during storage of five *Agaricus bisporus* strains. **Journal of Food Quality**, Kalamata, v. 30, p. 646-663, 2007.

MILLS, P.R.; FERMOR, T.; MUTHUMEENAKSHI, S.; LINCOLN, S. Cell wall degrading enzymes produced by *Verticillium* spp. and their relationship to infection in *Agaricus bisporus*. **Mushroom Science**, v. 15, p. 601–605. 2000.

MIMS, C. W. - Using electron microscopy to study plant pathogenic fungi. **Mycologia**, v. 83, p. 1-19, 1991.

NAIR N.G.; MACAULEY B.J. Dry bubble disease of *Agaricus bisporus* and *Agaricus bitorquis*, and its control by prochloraz-manganese complex. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 30, p.107-116. 1987.

NEWMAN, R.H.; SAVIDGE, M. Mancozeb dust – breakthrough in mushroom disease control. **MGA Bulletin**, v.232, p. 161-162. 1969.

NORTH, L.H.; WUEST, P. The infection process and symptom expression of *Verticillium* disease of *Agaricus bisporus*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 15, p. 74-80. 1993.

PALLERONI, N.J. *Pseudomonas* classification-a new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek Internacionl Jornal of General and Molecular Microbiology**, v.64, p.231-251, 1993.

PRESS. *Acrostalagmus fungicola*. **Linnaea**, v. 24, p. 124. 1851.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P; ELLIS, R.J; FIRESTONE, M.K.; FRECKLEON, R.P.; GREEN, L.E.; KILLHAN, K.;LENNON, J.J.; OSBORN, A.M.; SOLAN,M.; VANDER GAST, C.J.; YOUNG,J.P. Essay-the role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, n.5, p.384-392, 2007

RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J. Computer assisted analysis of molecular fingerprint profiles and database construction. In *Molecular Microbial Ecology Manual*.Kowalchuck, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L., and van Elsas, J.D. (eds). Dordrecht, the Netherlands: Springer, p. 1397–1446. 2008.

RAPER, C.A. Sexuality and Life-cycle of the Edible, Wild *Agaricus bitorquis*. **Journal of General Microbiolog**, v. 95, p. 54-66. 1976.

SAIQA, S.; NAWAZ BHATTI, H.; ASIF HANIF, M. Studies on chemical composition and nutritive evaluation of wild edible mushrooms. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v.27 (3), p. 151–154, 2008.

SCHMIDT, A.L.; ANDERSON, L.M. Repetitive DNA elements as mediators of genomic change in response to environmental cues. **Biological Reviews**, v. 81, p. 531–543. 2006.

SHAMSHAD, A.; CLIFTA. B.A.D.; MANSFIELDA. S. Host–parasite interaction between cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* hybrid strain Sylvan A15, and the mycoparasite *Verticillium fungicola*, a causal agent of dry bubble disease. **Australasian Plant Pathology**, v. 38, p. 74–78. 2009

SMITH, D.E.V. Three diseases of cultivated mushrooms. Transactions of the British Mycological Society, v.10, p. 81-97. 1924.

SOUZA, H. Q.; AGUIAR, I. J. Diversidade de Agaricales (Basidiomycota) na Reserva Biológica Walter Egler, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**. v.34 (1), p.43-51. 2003.

TOBES, R.; RAMOS, J.L. REP code: defining bacterial identity in extragenic space. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 225–228. 2005.

USSERY, D.W.; BINNEWIES, T.T.; GOUVEIA-OLIVEIRA, R.; JARMER, H.; HALLIN, P.F. Genome update: DNA repeats in bacterial genomes. **Microbiology**, v. **150**, p.3519–3521. 2004.

VAN GRIENSVEN, L.J.L.D. The cultivation of Mushrooms. *In: The cultivation of mushrooms*. Van Griensven L.J.L.D. (Eds.). Pp. 362-404. 1988.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.24, p. 6823–6831. 1991.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (Rep-PCR). **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5: 25–40. 1994.

WARE, W.M. A disease of cultivated mushrooms caused by *Verticillium malthousei*. **Annals botany**, v. 47, p.763-784. 1933.

WUEST, P.J.; COLE, H.J.R.; SANDERS, P.L. Tolerance of *Verticillium malthousei* to benomyl. **Phytopathology**, v.64, p. 331-334. 1974.

YODER, J.B.; SINDEN, J.; HAUSE, E. Experience with zinc ethylene bis-dithiocarbamate as a fungicide in mushroom cultivation. **Mushroom Science**, v.1, p.100-108. 1950.

ZAAYEN, A. VAN.; GAMS, W. Contribution to the taxonomy and pathogenicity of fungicolous *Verticillium* species. II Pathogenicity. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 88: 143-154, 1982.

ZARE, R.; GAMS, W. A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. **Mycological Research**, V. 112, p. 811–824. 2008.

SEGUNDA PARTE: ARTIGOS CIENTÍFICOS SUBMETIDOS

ARTIGO 1: Análise Rep-PCR e ultraestrutura de linhagens de *A. bisporus*

Artigo nas normas da revista World Journal of Microbiology and Biotechnology

Janaira Santana Nunes

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

Manuela Rocha de Brito

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

Diego Cunha Zied

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Dracena, 17900-000, Dracena, SP, Brasil.

Claudia Regina Gontijo Labory

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil

Eustáquio Souza Dias

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

Eduardo Alves (Autor correspondente)

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil. Fax:

(+55 35) 3829.1281. E-mail: ealves@dfp.ufla.br

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de 14 isolados de *Agaricus bisporus* com a técnica de Rep-PCR e por microscopia eletrônica de varredura. As linhagens ABI 04/02 e ABI 09/10, apresentaram maior dissimilaridade que as demais linhagens. Por microscopia eletrônica de varredura foi observado que o desenvolvimento dos basídios e basidiósporos ocorre de forma assíncrona. Foram visualizadas hifas de conexão entre os basídios. Essa característica já foi anteriormente relatada em *Agaricus brasiliensis*, mas é nova para *A. bisporus*. Foram observados, predominantemente dois basidiósporos por basídio, mas também foram encontrados ocasionalmente basídios com um, três e quatro basidiósporos. A forte correlação entre frequência de basidiósporos por basídio e as linhagens ($\chi^2 = 604,444$, $p \leq 0,0001$) permitiu a construção de um dendograma. As linhagens ABI 04/02, ABI 07/06 e ABI 05/03 tiveram maior dissimilaridade quando comparados aos demais isolados. Ao correlacionar o dendograma gerado com base na frequência do número de basidiósporos por basídio e aquele gerado a partir da técnica de Rep-PCR, observamos que em ambos, a linhagem ABI 04/02 apresenta maior dissimilaridade em relação as outras cepas. A microscopia eletrônica de transmissão permitiu visualizar e caracterizar várias estruturas dos basídios e basidiósporos. Nos basídios foram observados vacúolos, septo doliporo, vesículas e corpos lipídicos. A parede celular dos basidiósporos é constituída de três camadas distintas e apresenta espessura variável. O estudo demonstra uma descrição das linhagens produzidas no Brasil, e facilitará futuras pesquisas caracterização genética e agrônômica dessas linhagens.

Palavras chaves: Cogumelo, Rep-PCR, diversidade genética, basidiosporogênese.

ABSTRACT: This work aimed to assess fourteen *Agaricus bisporus* isolates with Rep-PCR technique and scanning transmission electron microscopies. Rep-PCR technique allowed separating isolates into two groups according to their similarity. ABI 04/02 and ABI 09/10 exhibited higher genotypic variations when compared to the others. Using scanning electron microscopy, we observed basidia and basidiospores developing asynchronously during basidiocarp production. Connection hyphae between basidia were observed. This characteristic had been previously reported for *Agaricus brasiliensis*, even though it is novel for *A. bisporus*. Predominantly, two basidia per basidiospore have been observed, but basidia with one, three or four basidiospores were also noticed. The strong correlation between the frequency of basidiospores per basidium and strains ($\chi^2 = 604,444$, $p \leq 0,0001$) allowed the construction of a dendrogram. ABI 04/02, ABI 07/06 and ABI 05/03 strains had higher dissimilarity in comparison to the other isolates. By correlating the dendrogram created based on the frequency of the number of basidiospores per basidium with the other one created with Rep-PCR technique, we noticed in both the dissimilarity presented by ABI 04/02 strain in relation to the other strains. Transmission electron microscopy allowed visualizing and characterizing several structures of basidia and basidiospores. vacuoles, dolipore septum, vesicles and lipid bodies were observed in basidia. The cell wall of basidiospores consists of three distinct layers and presents variable thickness. The study shows a description of the strains produced in Brazil, and it will favor further research about agronomical and genetic characterization of these strains.

Keywords: Mushroom, Rep-PCR, genetic diversity, basidiosporogenesis

INTRODUÇÃO

O *Agaricus bisporus* (Lange) popularmente conhecido como Champignon é o cogumelo mais consumido e mais importante economicamente (Tian et al. 2012), representando cerca de 40% da produção mundial de cogumelos (Royse e Chalupa, 2009). Em 2011, essa produção foi de aproximadamente 7,7 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2013).

Além disso, a produção e demanda de cogumelos vêm aumentando em todo o mundo, inclusive em países em desenvolvimento, estimuladas por novas descobertas científicas acerca de suas propriedades nutricionais e medicinais (Saiqa et al. 2008). Nesses países, o cultivo foi realizado sob baixa tecnologia por muitos anos, como uma atividade que exige mão-de-obra familiar e resulta em baixos níveis de produção (Chang e Miles, 2004).

Atualmente, no Brasil, como maior dificuldade junto ao setor produtivo se tem a elevada diversidade de linhagens utilizadas de origem desconhecida. Como resultado, não se conhece algumas informações importantes dessas linhagens, dentre elas, suas características genéticas (híbrido ou não), suas condições de crescimento (temperatura, umidade relativa do ar, teor de CO₂), época do ano mais apropriada para o cultivo e até mesmo que variedade está sendo cultivada (Champignon ou Bitorquis). Novas tecnologias e a descrição do perfil das linhagens cultivadas no país permitirá custos menores de produção, além de maiores produtividades para consolidação dos empreendimentos que visam o cultivo de cogumelos, especialmente para países em desenvolvimento como o Brasil.

A escolha da linhagem é um fator fundamental para obter-se sucesso no cultivo de cogumelos, pois podem diferir quanto à velocidade de crescimento, resistência a fungos contaminantes, formação de basidiomas, tamanho e forma dos basidiomas, eficiência biológica e produtividade (Diamantopoulou e Philippoussis, 2001). Considerando a importância do *A. bisporus*, os estudos da morfologia e de avaliação molecular podem elucidar o perfil das linhagens cultivadas, permitindo ainda futuros estudos de caracterização genética e seleção de linhagens com melhores características agronômicas.

Comparações morfológicas e genéticas também permitem distinção de isolados de diferentes regiões. Callac et al. (2003) descreveram *A. bisporus var. eurotetrasporus* encontrado na Europa, que possui maior parte dos basídios tetráspóricos. Esse tipo de

cepa pode ser muito útil por facilitar a obtenção de culturas monospóricas, uma vez que esta é uma das grandes limitações nas cepas de *A. bisporus*, as quais produzem basídios bispóricos na sua grande maioria. Callac et al. (2006) descreveram ainda três linhagens de *A. bisporus* que diferem em seus ciclos de vida, tamanhos de esporos e número médio de esporos por basídio.

A utilização da técnica de Rep-PCR (Sequências Palindrômicas Extragênicas Repetitivas) tem sido comum para analisar a diversidade genética de fungos, por ser eficaz, reprodutível, altamente discriminativo e requerer menos tempo que outras técnicas moleculares (Hierro et al. 2004). Gurel et al. (2010) demonstrou que Rep-PCR é uma técnica eficaz na diferenciação de cepas de *Fusarium culmorum*. Apesar dessa técnica já ter sido utilizada na comparação de diferentes espécies de bactérias e fungos ascomicetos, ainda não foi utilizada para distinção de linhagens de *A. bisporus*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de 14 isolados de *Agaricus bisporus* com a técnica de Rep-PCR e por microscopia eletrônica de varredura.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Foram utilizadas 14 linhagens de *A. bisporus* presentes na micoteca do Laboratório de Cogumelos Comestíveis, Departamento de Biologia da UFLA (Tabela 1).

Extração do DNA

A massa micelial de cada isolado foi coletada diretamente da superfície do meio BDA sólido após 15 dias de crescimento e macerada em nitrogênio líquido. A extração de DNA foi feita utilizando DNeasy®Plant Mini Kit (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante.

Rep-PCR

As reações de PCR foram realizadas com o primer (GTG) 5 (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') (Versalovic et al., 1994; Gevers et al., 2001). Cada reação teve volume final de 25 µL, contendo 7,5 uL de *Taq* PCR Master Mix Kit (QIAGEN), 5 pmol.µL⁻¹ de primer (GTG)5, 0,6% formamida, 0,1 mg.mL⁻¹ BSA (Bovine Serum Albumin), 2 µL de DNA e 4 µL água miliQ estéril.

Tabela 1. Descrição das linhagens de *Agaricus bisporus* utilizados neste estudo.

Linhagens	Ano coletado	Localização	Estado	Origem	Características
ABI 11/14	2011	Mogi das Cruzes	SP	Europa	Coloração branca, liso, alta produtividade, resultante de basidiomas com massa elevada.
ABI 11/15	2011	Botucatu	SP	Europa	Coloração branca, liso, alta produtividade, cogumelos com massa intermediária.
ABI 05/03	2005	Cabreuva	SP	Europa	Coloração branca, baixa produtividade resistência a patógenos, que demoram a romper o véu da lamela.
ABI 07/06	2007	Piedade	SP	Europa	Coloração branca, liso, alta produtividade, que demoram a romper o véu.
ABI 11/21	2011	Castro	PR	Europa	Coloração branca, produtividade regular, que demoram a romper o véu da lamela.
ABI 11/16	2011	Botucatu	SP	EUA	Híbrido, denominado “Triple-X, elevada produtividade, porém rompe a lamela com facilidade.
ABI. PB 01/01	2001	Botucatu	SP	EUA	Coloração creme, com escamas distribuídos no píleo e produtividade regular.
ABI.PB 06/02	2001	Itu	SP	EUA	Coloração creme, com pequena quantidade de escamas distribuída no píleo e produtividade regular.
ABI 09/10	2010	Botucatu	SP	China	Coloração branca, liso e baixa produtividade.
ABI 11/19	2011	Mogi das Cruzes	SP	China	Coloração branca, liso, baixa produtividade.
ABI 11/20	2011	Mogi das Cruzes	SP	Japão	Coloração branca, liso, produtividade regular, basidiomas que demoram a

					romper o véu da lamela.
ABI 04/02	2004	Suzano	SP	Desconhecida	Coloração branca, liso, resistência a patógenos, produtividade regular que demoram a romper o véu da lamela.
ABI 06/05	2005	Mogi das Cruzes	SP	Desconhecida	Coloração branca, liso, alta produtividade que demoram a romper o véu da lamela.
ABI 11/18	2011	Botucatu	SP	Desconhecida	Coloração branca, liso, produtividade regular.

As ampliações por PCR foram realizadas com um termociclador (Termocycler T Professional Basic-Biometra, Alemanha) com o seguinte programa: um ciclo inicial de 4 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 45 °C por 1 minuto e 65 °C por 8 minutos, e extensão final de 65 °C por 16 minutos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% durante 7 horas a uma voltagem de 70 V, em 1 X tampão TAE (Tris-acetato 5 M, EDTA 50 mM, pH e ácido acético glacial 1 M). Os perfis foram visualizados sob luz UV, em transluminador (MiniBIS Pro, DNR Bio-imaging systems, Israel). A imagem foi capturada usando software DNR's GelCapture. Os perfis foram analisados utilizando programa BioNumerics versão 4.0 (Applied Maths, Sint-MartensLatem, Bélgica).

Microscopia eletrônica de varredura

Para microscopia eletrônica de varredura e transmissão foram utilizados basidiocarpos frescos resultantes da frutificação de linhagens de *A. bisporus* produzidos de acordo com o protocolo descrito por Zied et al. (2010). Porções das lamelas dos basidiocarpos foram retiradas em pontos equidistantes e imersas em fixador Karnovsky modificado por um período de, no mínimo, 24 horas.

Após fixação, foi utilizado o protocolo padrão para microscopia eletrônica de varredura descrita por Bozzola e Russel (1999) com algumas modificações.

As amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,05 M por três vezes de 10 minutos cada, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1,0% em água por 1 hora e desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, uma vez e 100%, por três vezes). Após a desidratação, as amostras foram levadas para um aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituição de acetona por CO₂ e complementação da secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio (*stubs*) com fita de carbono sobre uma película de papel alumínio e cobertos com o ouro no evaporizador Balzers SCD 050 para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40.

Para contagem dos basidiósporos, todos os campos foram avaliados a distância de trabalho (WD) de 10 mm e aumento de 3500X. Por meio de uma seleção de uma área ao acaso foi estabelecido um valor fixo no eixo Y, percorrendo somente o eixo X (ou vice-versa) de forma que não houvesse sobreposição de imagens entre dois campos

adjacentes ou que um mesmo campo fosse contabilizado mais de uma vez. Para cada linhagem foi obtido 30 imagens. Estimou-se a frequência de basídios portando diferentes números de basidiósporos e a significância dos resultados foi determinada com o teste de qui-quadrado por meio do programa computacional R versão 2.9.1. (R Foundation for Statistical Computing, 2013).

Microscopia eletrônica de transmissão

Com base nas dissimilaridades apresentadas nos estudos de Rep-PCR e microscopia eletrônica de varredura, foi utilizado para a observação em microscópio eletrônico de transmissão as lamelas das linhagens ABI 04/02, ABI 11/20 e ABI PB 01/01.

As lamelas em diferentes estágios foram cortadas à mão livre com bisturi em pedaços de no máximo 1 mm de largura. Alguns basidiocarpos foram coletados e mantidos em beakers estéreis para a liberação dos esporos. Os basidiósporos foram submetidos a um tratamento com HCl 1 Mol L⁻¹ por 10 minutos. Os materiais foram imersos em fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001M), por um período de, no mínimo, 24 horas. Após esse período, os basidiósporos foram centrifugados, lavados em água destilada e centrifugados novamente, resuspenso em ágar (2%) fundido e mantidos a 4 °C para a solidificação.

Após fixação foi utilizado protocolo padrão para microscopia eletrônica de transmissão descrita por Bozzola e Russell (1999) com algumas modificações.

As amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,05M por três vezes de 10 min cada, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1,0% em água por 4 horas, lavadas por duas vezes de 15 minutos em água destilada e transferidas para a solução de acetato de uranila a 0,5% durante 12 horas, a 4 °C. Em seguida, lavadas novamente em água destilada e desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, uma vez e 100% por três vezes). O material foi incluído em gradiente crescente de Spurr (Sigma) /acetona 30% (8 horas), 70% (12 horas) e 100% por duas vezes de 24 horas cada, montado em moldes de silicone e submetido à polimerização em estufa a 70 °C, por 8 horas.

Os excessos de resina nos blocos foram retirados com um aparelho de “Trimming”, sendo o acabamento realizado manualmente com o auxílio de uma lupa e

lâmina de barbear. Secções ultrafinas (<100 nm) foram confeccionadas utilizando-se de um ultramicrotomo Reichert-jung (ultracut) e navalhas de diamante.

Os cortes ultrafinos foram obtidos com navalha de diamante e coletados em grades de cobre de 200 meshes cobertas com formvar. As secções foram pós-contrastadas em acetato de uranila e acetato de chumbo por três minutos cada, secas ao ar, e, em seguida, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80 v.

RESULTADOS

Caracterização genética por Rep-PCR

As 14 linhagens de *A. bisporus* foram submetidas à análise por Rep-PCR, cujos resultados a partir do polimorfismo gerado estão demonstrados na Figura 1. Os isolados, ABI 04/02 e ABI 09/10, provenientes respectivamente de origem desconhecida e da China, apresentaram maior variação genotípica em relação as demais linhagens.

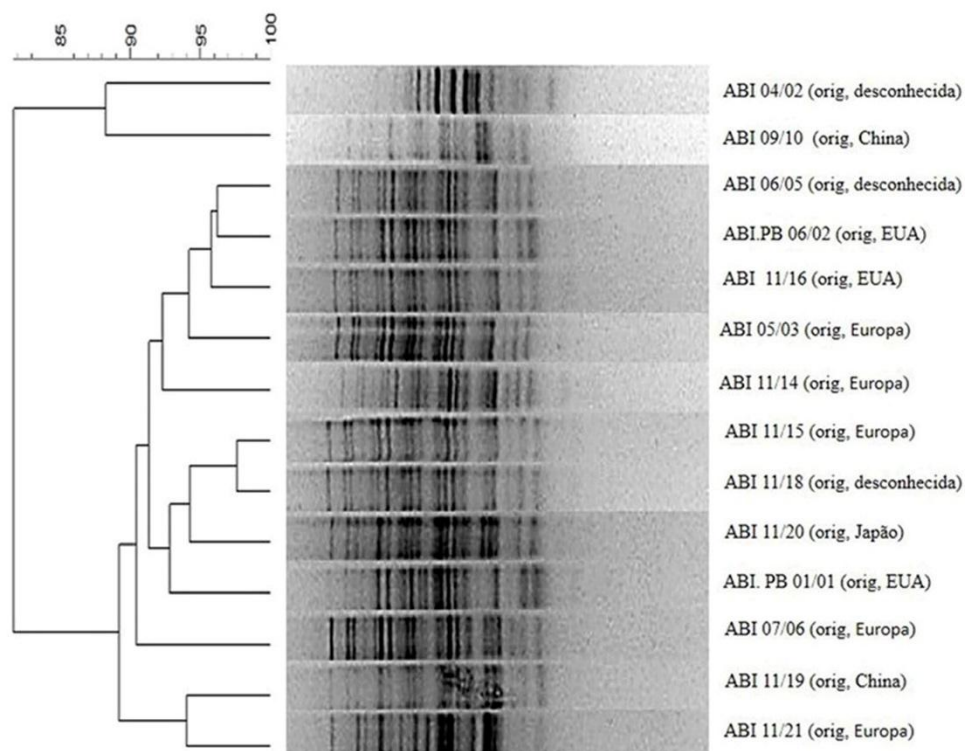


Figura 1. Dendrograma obtido a partir da análise de Rep-PCR 14 linhagens de *Agaricus bisporus* do Brasil.

Análise da ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As lamelas de *A. bisporus* apresentam basidiósporos túrgidos ligados ao basídio por meio do esterigma (Figura 2A-B). Quando maduros, os esporos são ovalados e possuem uma cicatriz denominada apêndice hilar, determinando o ponto de liberação do esterigma. Foi observada a liberação dos basidiósporos, em todas as linhagens, nas amostras retiradas antes da abertura do píleo. Todos os isolados apresentaram lamelas com basídios e basidiósporos em diferentes estágios (Figura 2C-D), demonstrando que o desenvolvimento dessas estruturas ocorre continuamente. As linhagens, exceto ABI 06/05, ABI.PB 06/02 e ABI.PB 01/01, apresentaram hifas de conexão entre os basídios (Figura 3A-D). A medida do diâmetro das hifas de conexão foi calculada no microscópio eletrônico de varredura, apresentando valor médio de 320,37 nm.

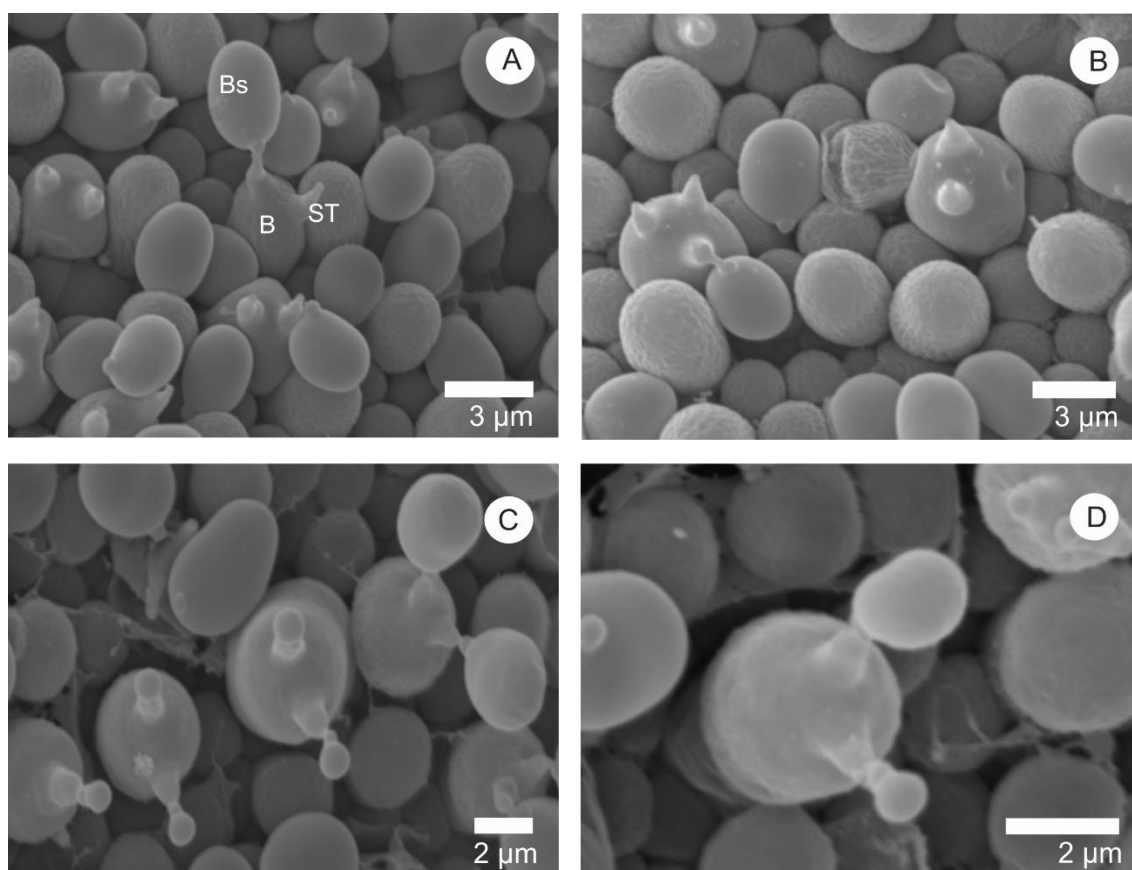


Figura 2. Eletromicrografia de varredura de lamelas de *Agaricus bisporus*. A- B. Basidiósporos ligados ao basídio. C. Desenvolvimento não sincrônico de basídios e basidiósporos em uma mesma região. D. Diferentes estágios de desenvolvimento dos basidiósporos em um mesmo basídio.

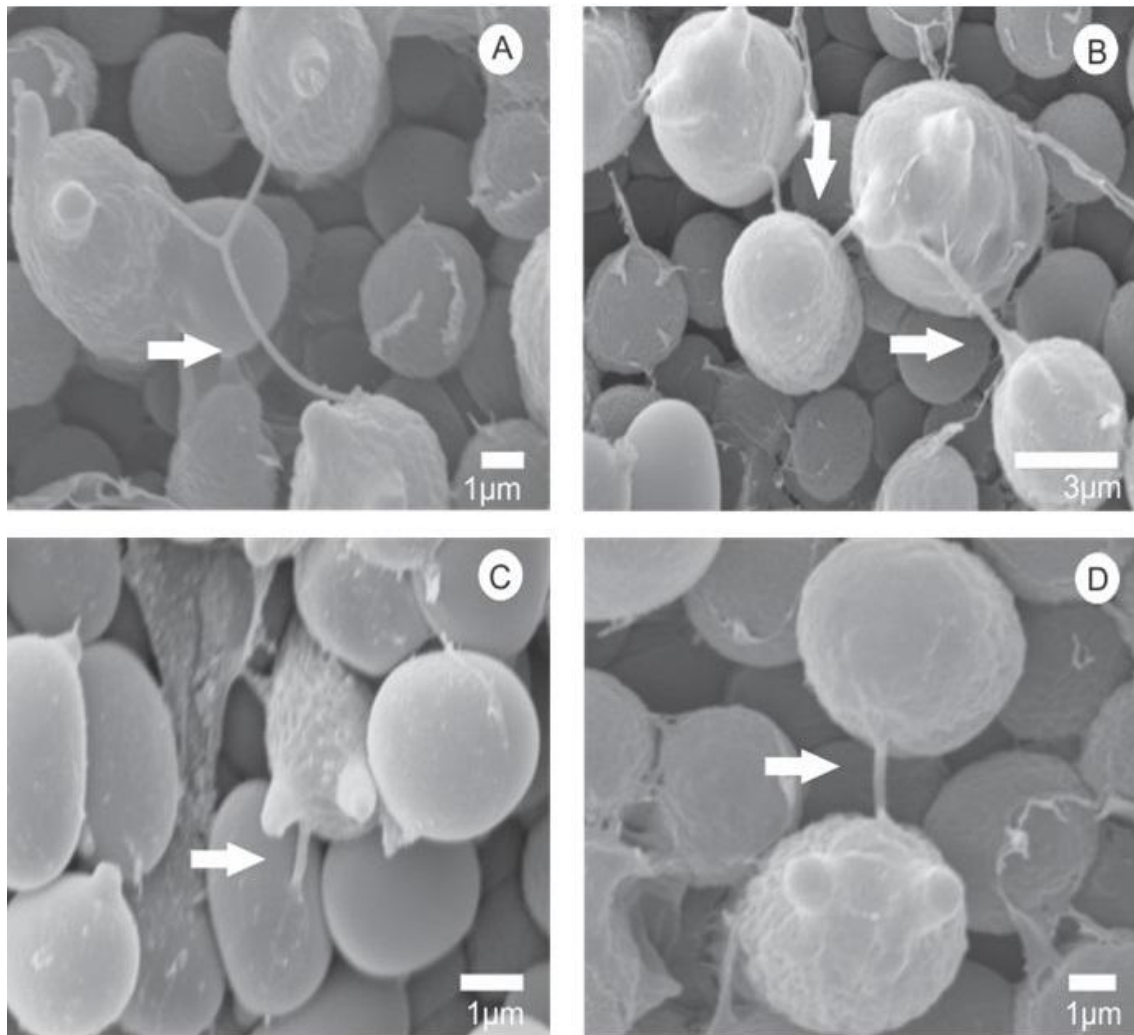


Figura 3. Eletromicrografia de varredura de lamelas de *Agaricus bisporus*. A-D. Basídios ligados entre si por hifas de conexão (indicado por setas). Medida das Hifas: A: 301,07 nm. Médias das hifas em B: 302,5 nm. C: 384,8 nm D:273,4 nm.

A frequência de basidiósporos por basídio está descrita na Tabela 2. Em todas as linhagens foram observados basídios predominantemente bispóricos (Figura 4C-E). Entretanto, todas apresentaram basídios trispóricos (Figura 4F-G). Os isolados também apresentaram basídios monospóricos, com exceção dos isolados ABI 04/02 e ABI 05/03 (Figura 4A-C). Já as linhagens ABI 11/21, ABI 04/02 e ABI.PB 06/02 tiveram, em pequena quantidade, basídios tetraspóricos (Figura 4H-I).

Com base no teste qui-quadrado pode-se observar relação entre número de basidiósporos por basídios e as linhagens ($\chi^2 = 604,444$, $p \leq 0,0001$). A partir desse teste, foi possível construir um dendograma, e as linhagens foram separadas em dois grupos (1 e 2), considerando a dissimilaridade acima de 50% (Figura 5). O grupo 2, formado por ABI 04/02, ABI 07/06 e ABI 05/03, apresentaram menor similaridade em relação às demais

linhagens.

Tabela 2. Número (Nº) e frequência (Freq.) de basídios de *Agaricus bisporus* com 1, 2, 3 e 4 basidiósporos.

Linhasgens	ABI 11/14	ABI 11/15	ABI 11/16	ABI 11/18	ABI 11/19	ABI 11/20	ABI 11/21	ABI 06/05	ABI 04/02	ABI 05/03	ABI 07/06	ABI 09/10	ABL/PB 01/01	ABL/PB 06/02
Basidiósporos por basídios	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.
1	1,70%	0,80%	1,10%	0,60%	4,00%	1,70%	2,30%	4,70%	0%	0%	0,10%	3,60%	1,50%	0,60%
2	97,60%	94,40%	97,30%	97,60%	95,50%	98%	96,20%	95,0%	90,20%	92,50%	95,80%	95,40%	97,80%	97,60%
3	0,70%	4,80%	1,60%	1,80%	0,50%	0,30%	1,20%	0,30%	9,50%	7,50%	4,10%	0,70%	0,70%	1,10%
4	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0,30%	0%	0,30%	0%	0%	0%	0%	0,70%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Análise da ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Microscopia Eletrônica de Transmissão permitiu observar os basídios de *A. bisporus* em diferentes estágios de desenvolvimento. Esses consistem de células cilíndricas expandidas e clavadas (Figura 6A-B). Foram visualizados vacúolos, septo doliporo, vesículas, corpos lipídicos (Figura 7A-F). Foram observados basídios com um e dois núcleos (Figura 8A-D). Não houve diferença citológica das linhagens avaliadas, sendo encontradas em todas as seções analisadas as estruturas descritas anteriormente.

Quanto aos basidiósporos, pôde ser observado que a parede celular é formada por três camadas (Figura 9B), sendo duas mais espessas (W1 e W2), e uma mais delgada (W3) próxima ao citoplasma. Um apêndice hilar (Figura 9A) emerge na região de ligação do esterigma. Em alguns esporos foi possível visualizar estruturas correspondente a substâncias de reserva.

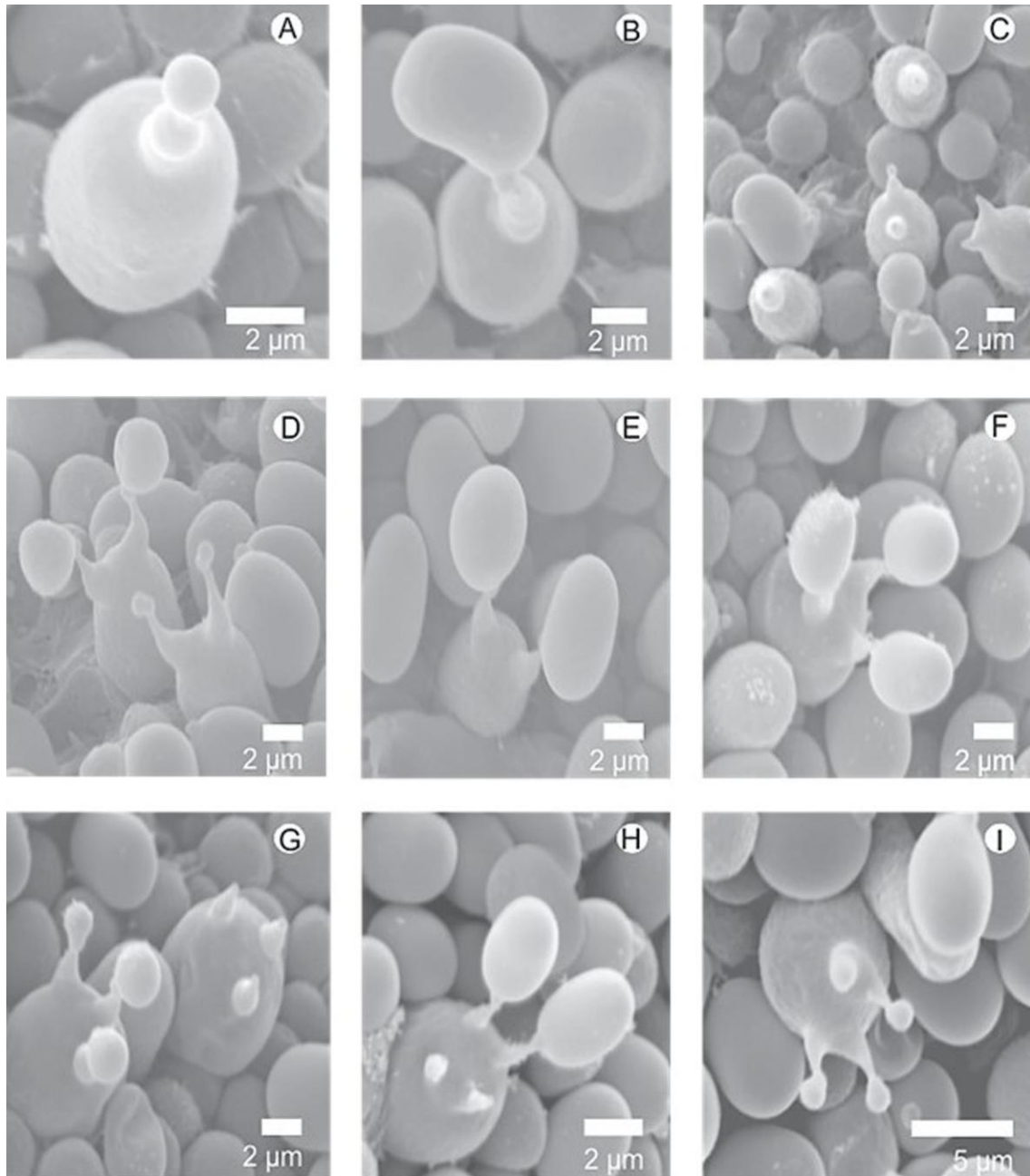


Figura 4. Eletromicrografia de varredura mostrando o desenvolvimento de basídios com diferente número de basidiósporos superfície de lamelas de *Agaricus bisporus*. Basídios com um (A, B e C), dois (C, D e E), três (G e F) e quatro (H e I) basidiósporos.

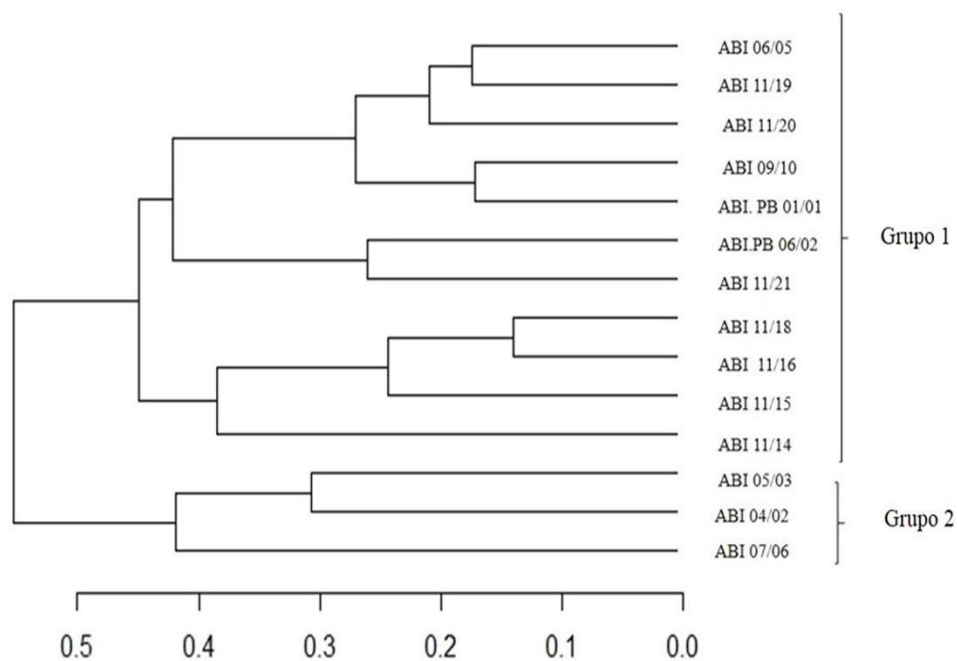


Figura 5. Dendrograma construído a partir dos resultados obtidos com teste qui-quadrado entre 14 linhagens de *Agaricus bisporus*.

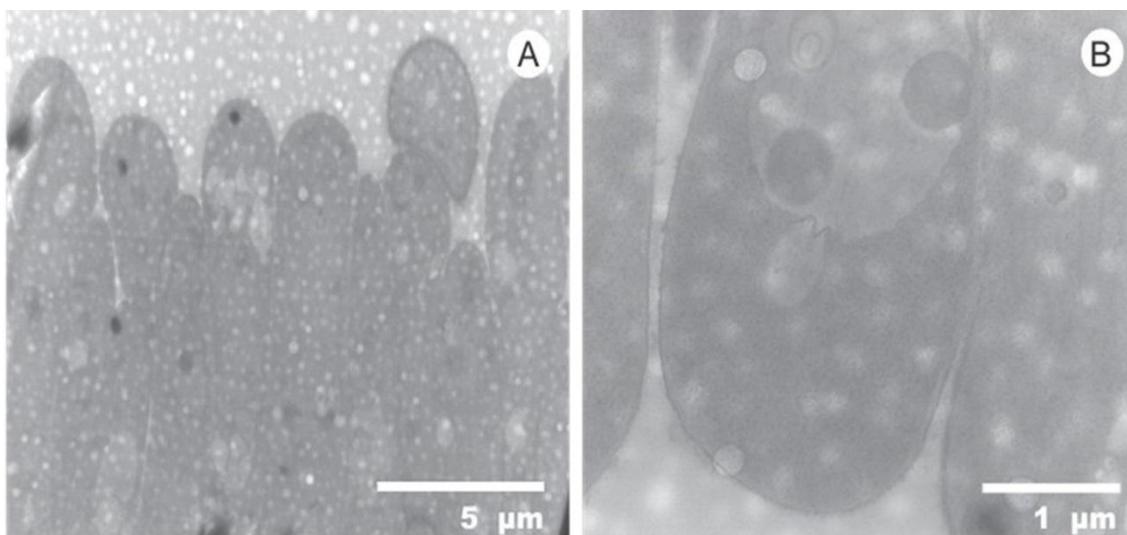


Figura 6. Eletromicrografia de transmissão de lamelas de *Agaricus bisporus* mostrando basídios em forma de cilíndrica e clavadas. A. Forma dos basídios, clavados e expandidos. B. Basídio processo inicial de formação.

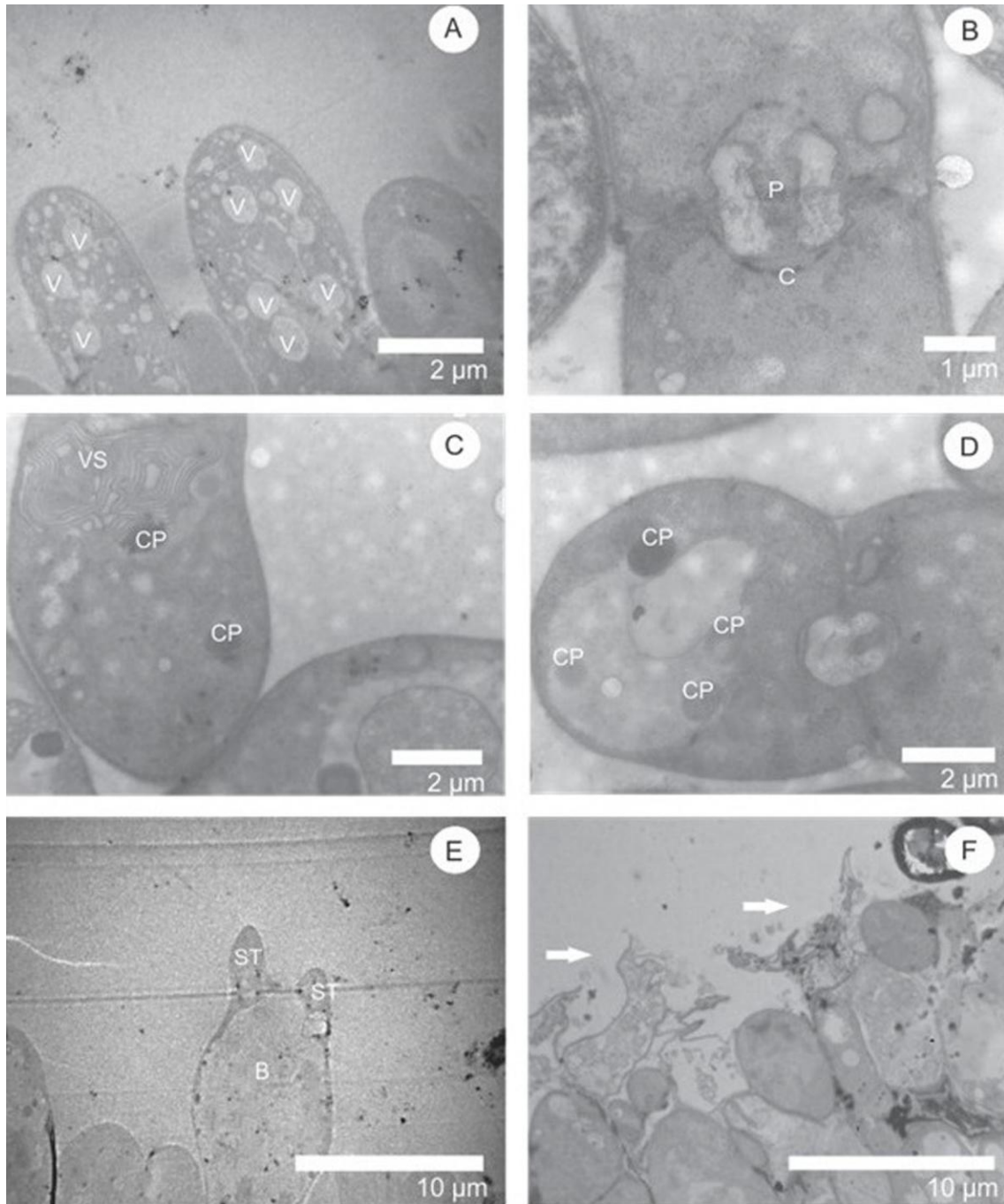


Figura 7. Eletromicrografia de transmissão de basídios de *Agaricus bisporus* mostrando em A. vacúolos (V), B Septo doliporo, formado por um poro (P) e por duas calotas (C), em C. Vesículas (VS), e corpos lipídicos (CP), D. Corpos lipídicos (CP), E. Esterigma (ST) e basídios (B) e F. Degradação dos basídios após a liberação dos esporos indicado por setas.

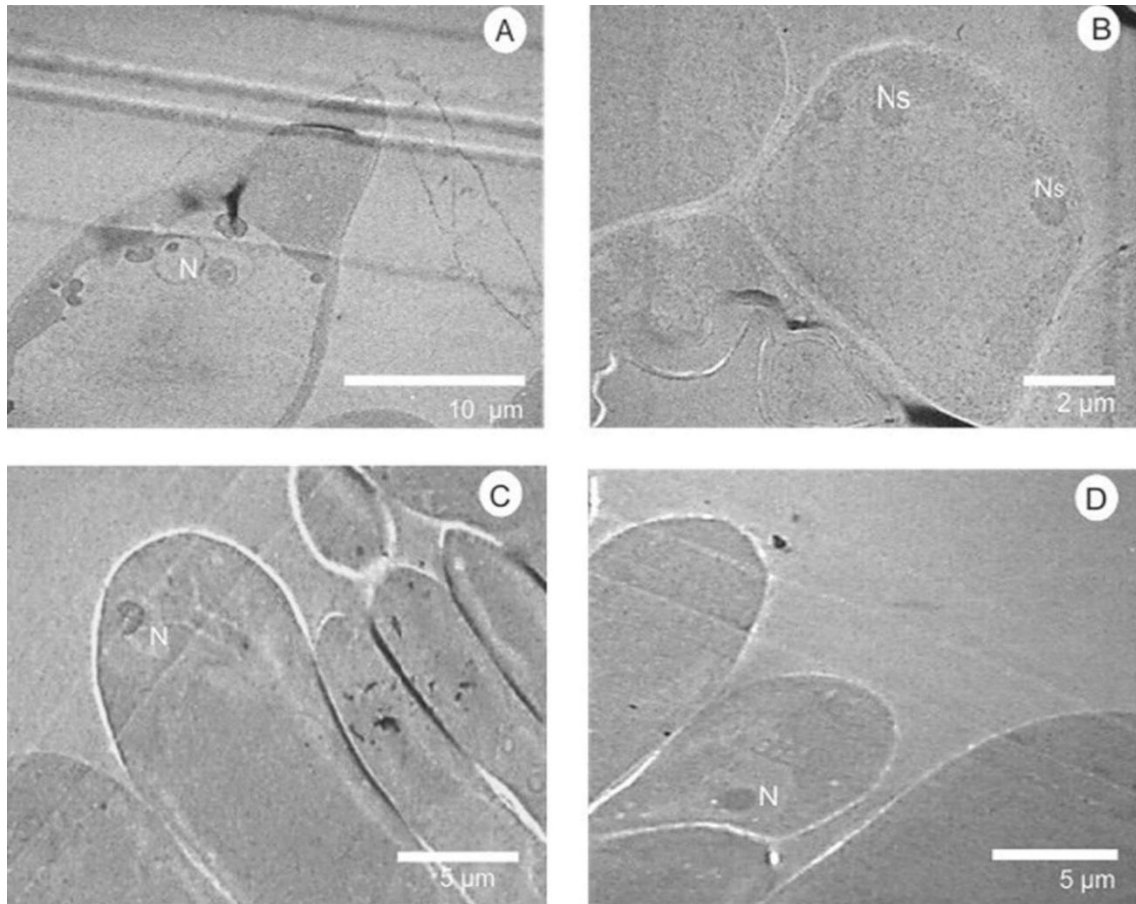


Figura 8. Eletromicrografia de transmissão de basídios de *Agaricus bisporus* mostrando um núcleo (N) em (A), (C) e (D) e dois nucléolos (Ns) em (B).

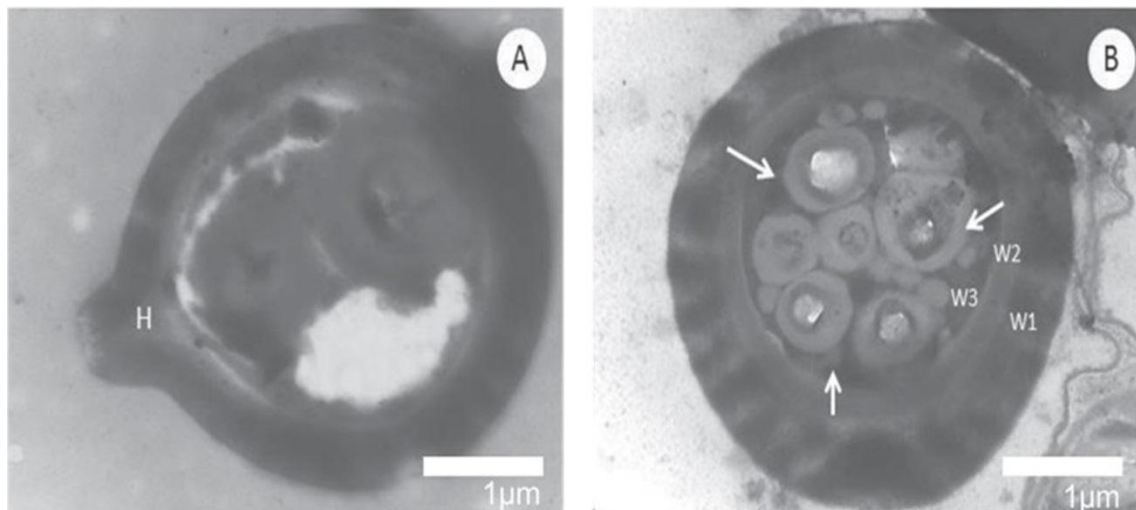


Figura 9. Eletromicrografia de transmissão de basídios de *Agaricus bisporus* mostrando em A. Apêndice Hilar (H) e B. Camadas formadoras da parede celular (W1, W2 e W3) e substâncias de reserva indicadas pela seta.

DISCUSSÃO

Caracterização genética por Rep-PCR

Não foi possível agrupar as diferentes linhagens em função da sua origem e, não houve uma distribuição de acordo com os países ou regiões de origem (Figura 9). A falta de correlação entre a diversidade genética e a origem geográfica pode ser explicada devido ao fato de que essas linhagens não foram obtidas diretamente da natureza, mas a partir de empresas ou instituições públicas. Além disso, é possível que, após muitos anos de cultivo no Brasil, essas linhagens tenham sofrido mutações ou recombinações suficientes para alterar, de forma profunda, a sua constituição genética original. A análise da diversidade genética é uma etapa importante para o planejamento de programas de melhoramento, por facilitar a seleção de possíveis parentais (Fu et al. 2010).

Análise da ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A presença de hifas de conexão podem estar relacionadas com uma possível troca de material genético. A presença de hifas de conexão foi relatada pela primeira vez por Herrera et al. (2012), em *A. brasiliensis*. Os autores sugeriram que essas estruturas poderiam permitir a transferência de núcleos entre os basídios, contribuindo para a produção de basidiósporos binucleados heterocarióticos. Entretanto, considerando que os núcleos possuem tamanho entre 0,9 μm e 1,4 μm de diâmetro, a sua transferência por meio das hifas de conexão seria inviável, considerando a extensão dessa estrutura e seu diâmetro médio de 320.37 nm, cerca de 0,32 μm . Apesar das observações, não se pode descartar a possibilidade de haver trocas material genético a partir das hifas de conexão. Análises filogenéticas de populações fúngicas têm revelado que a transferência de genes ou de cromossomos por fusão de hifas pode desempenhar um papel na geração de diversidade genoma a nível populacional em uma variedade de fungos filamentosos (Roper et al. 2011). Novos estudos envolvendo técnicas de microscopia de fluorescência podem ser explorados para melhor esclarecimento do papel desse fenômeno no desenvolvimento dos basídios e basidiósporos.

No estudo foi observada a variação entre um e quatro esporos por basídio, com predominância de dois esporos por basídio, o que demonstra que as linhagens brasileiras avaliadas são todas pertencentes à variedade *bisporus*, considerando que as

variedades *burnetti* e *eurotetrasporus* possuem predominância de basídios tetraspóricos (Callac et al. 2006). Este dado é relevante uma vez que demonstra a variedade cultivada no Brasil permitindo a futuros processos de otimização dos cultivos comerciais. Das 14 linhagens estudadas, apenas 3 apresentaram basídios tetraspóricos linhagens ABI 11/21, ABI 04/02 e ABI.PB 06/02 com frequência de 0,30%, 0,30% e 0,70% de basídios tetraspóricos, respectivamente. Saksena et al. (1975) estudando duas linhagens por microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura relatou a predominância de basídios bispóricos, com ocorrência de basídios com um e três basidiósporos. Callac et al. (1996) estudando os ciclos de vida de *A. bisporus*, observou que a baixa porcentagem (1,3% em média) de basídios tetraspóricos está relacionada a um heterotalismo limitado. Portanto, essas linhagens que apresentam basídios tetraspóricos são importantes para a obtenção de culturas monospóricas heterotáticas, as quais podem ser utilizadas como parentais para a obtenção de novos híbridos. De acordo com o teste qui-quadrado, foi observada forte relação entre quantidade de basidiósporos por basídios e as linhagens, demonstrando que ABI 04/02, ABI 07/06 e ABI 05/03 possuem maior dissimilaridade em relação as demais linhagens.

Considerando-se que todas as linhagens, do presente trabalho, foram cultivadas em câmara de cultivo, com as mesmas condições, podemos inferir também que a variação ocorreu em função das diferenças genéticas entre os isolados. Herrera et al. (2012) observaram a variação do número de basidiósporos por basídio em diferentes linhagens de *A. brasiliensis* e concluíram que as diferenças ocorreram em função das diferenças genéticas entre as linhagens, uma vez que as frutificações ocorreram em ambiente igual para todas elas. Além disso, é importante destacar que mais de 80% das linhagens utilizadas comercialmente no Brasil não produziram basídios tetraspóricos, sendo que, das que apresentaram, a frequência variou de 0,3 a 0,7%, portanto, muito inferior à média de 1,3% relatada por Callac (1996). Esses resultados indicam que, após serem trazidas para o Brasil, essas linhagens vem sofrendo sucessivas alterações genéticas, de modo que, dificilmente, apresentam as mesmas características das culturas originais.

O predomínio do número de basídios bispóricos encontrados nas linhagens analisadas no presente estudo, infere-se que os mesmos apresentem o alelo *Bsn-b/b*. O número de basidiósporos por basídio é primeiramente determinado no locus BSN no cromossomo I (Xu et al. 1993). Os alelos *Bsn-t* e *Bsn-b* conferem o fenótipo com predominância de basídios tetraspóricos e bispóricos, respectivamente. O alelo *Bsn-t* é

dominante em relação ao *Bsn-b* (Callac et al. 1998). Futuros estudos moleculares deverão ser conduzidos para se confirmar a ausência do alelo *Bsn-t* na maioria das linhagens cultivadas no Brasil.

Quando correlacionamos o dendograma gerado a partir da técnica de Rep-PCR e aquele gerado com base na frequência do número de basidiósporos por basídio, observamos que em ambos, a linhagem ABI 04/02 apresenta maior dissimilaridade em relação as outras cepas. As diferenças detectadas pela técnica de Rep-PCR referem-se a alterações sofridas em regiões de DNA repetitivo, mas que sugerem que as alterações ocorreram em todo o genoma, incluindo os genes responsáveis por número de basidiósporos por basídio e aqueles relacionados aos tratos quantitativos da espécie referentes a produção de cogumelos. A linhagem ABI 04/02 apresenta características importantes como a resistência a patógenos, demonstrando a importância de estudar mais profundamente as características dentre os representantes de cada um dos grupos formados a partir do presente estudo.

Análise de microscopia eletrônica de transmissão

A observação de dois núcleos pode indicar a ocorrência da primeira divisão meiótica. Nos basídios, ainda podem ocorrer uma segunda divisão meiótica, em que quatro núcleos são formados (Callac et al. 2006). Entretanto, no presente estudo, não foram visualizados basídios com quatro núcleos.

No interior dos basidiósporos foram visualizados somente estruturas de reserva. Essas substâncias podem ser derivadas de açúcares comuns tais como glicose (glicogênio, lipídios e trehalose) e frutose (trehalose e polióis). O manitol, derivado de frutose, pode atuar também como regulador metabólico e substância de reserva (Deacon, 1997). O glicogênio, substância de reserva mais comum, pode formar agregados de 15 a 30 nm e se associar a membranas citoplasmáticas (Moore-Landecker, 1996). A dificuldade na observação das estruturas dos esporos deve-se a parede externa mais espessa, o que dificulta o processo de fixação. Em esporos coletados antes de abertura do píleo obteve-se melhor resultado, provavelmente por esses terem a estrutura de parede menos rígida. A estrutura visualizada na parede celular dos basidióporos foi similar a demonstrada por Greuter e Rast (1975) para *A. bisporus*.

CONCLUSÕES

O Rep- Pcr permitiu avaliar a diversidade das linhagens de *A. bisporus*.

As linhagens *A. bisporus* brasileiras estudadas são pertencentes a variedade *bisporus* apresentando predominantemente basídios bispóricos.

As hifas de conexão podem permitir a troca de material genético entre os basídios.

As análises por microscopia eletrônica de transmissão não demonstraram diferenças a nível de organização celular entre as linhagens avaliadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as agências brasileiras ao apoio a pesquisa: Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico (CNPq).

REFERÊNCIAS

Bozzola JJ, Russell LD (1999) Electron microscopy. 2nd ed. Boston: Jones & Bartlett. 670 p

Callac P, Haut IJH, Imbernon M, Guinberteau J (2003) A novel homothallic variety of *Agaricus bisporus* comprises rare tetrasporic isolates from Europe. *Mycologia* 95 (2): 222-231

Callac P, Hocquart S, Imbernon M, Desmerger C, Olivier JM (1998) *Bsn-t* Alleles from French Field Strains of *Agaricus bisporus*. *Applied and environmental microbiology* 64 (6): 2105–2110

Callac P, Imbernon M, Kerrigan RW, Olivier JM (1996) The two life cycles of *Agaricus bisporus*. In: Royse DJ, ed. *Mushroom biology and mushroom product*. University Park, Pennsylvania: Proc 2nd Int Conference, pp 57–66

Callac P, Kamzolkina OV, Volkova VN, Kozlova MV, Pancheva EV, Dyakov YT, (2006) Karyological evidence for meiosis in the three different types of life cycles existing in *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 98(5):763–770

Chang ST, Miles PG (2004) Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. Boca Raton: CRC, 451p

Deacon J W (1997) Modern Mycology. 3rd ed. Blackwell Science, London, 303p

Diamantopoulou P, Philippoussis A (2001) Production attributes of *Agaricus bisporus* white and off-white strains and the effect of calcium chloride irrigation on productivity and quality. *Scientia Horticulturae* 91: 379-391

FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Accessed 20 February 2014

Fu L, Zhang H, Wu X, Li H, Wei H, Qing-Qi W, Li-An Wang (2010) Evaluation of genetic diversity in *Lentinula edodes* strains using RAPD, ISSR and SRAP markers. *World Journal Microbiol Biotechnol* 26:709–716

Gevers D, Huys G, Swings J (2001). Applicability of Rep-PCR fingerprinting for differentiation of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205:31–36

Greuter B, Rast D (1975) Ultrastructure of the dormant *Agaricus bisporus* spore. *Canadian Journal of Botany* 53:2096-2101

Gurel F, Albayrak G, Diken O, Cepni E, Tulani B (2010) Use of Rep-PCR for Genetic Diversity Analyses in *Fusarium culmorum*. *Journal of Phytopathology* 158: 387-389

Herrera KMS, Alves E, Costa MD, Dias ES (2012) Electron microscopy studies of basidiosporogenesis in *Agaricus brasiliensis*. *Mycologia* 104 (6)1272–1280

Hierro NA, Gonzalez A, Guillamo NJM (2004). New PCR-based methods for yeast identification. *Journal of Applied Microbiology* 97:792–801

Hou HH, Wu LC (1972) Nuclear Behavior of cultivated mushroom. *Botanical Bulletin-Academia Sinica Taipei* 13: 82-91

Moore-Landecker E. 1996. *Fundamentals of the Fungi*. 4th ed. Prentice Hall, New Jersey, USA, 574pp.

R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>

Roper M, Ellison C, Taylor JW, Glass NL (2011) Nuclear and Genome Dynamics in Multinucleate Ascomycete Fungi. *Current Biology* 21 (18): R786–R793.

- Royse DJ, Chalupa W (2009) Effects of spawn, supplement and phase II compost additions and time of re-casing second break compost on mushroom (*Agaricus bisporus*) yield and biological efficiency. *Bioresource Technology* 100: 5277-5282
- Saiqa S, Nawaz BH, Asif HM (2008) Studies on chemical composition and nutritive evaluation of wild edible mushrooms. *Iran Journal Chem Chem Eng* 27(3):151–154
- Saksena KN, Marino R, Haller MN, Lemke PA (1976) Study on development of *Agaricus bisporus* by Fluorescent Microscopy and Scanning Electron Microscopy. *Journal of bacteriology* 126 (1)417-428
- Tian Y, Zeng H, Xu Z, Zheng B, Lin Y, Gan C, Lo YM (2012) Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Carbohydr Polymers* 88:522–529
- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5:25–40
- Xu J, Kerrigan RW, Horgen PA, Anderson JB (1993) Localization of the mating-type gene in *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 59:3044–3049
- Zied DC, Minhoni MTA, Kopytowski Filho J, Andrade MCN (2010) Production of *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) on different casing layers and environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10: 1857-1863
- Basse CW (2010) Mitochondrial inheritance in fungi. *Current Opinion in Microbiology* 13:712–719

ARTIGO 2: Avaliação do processo de infecção por *Lecanicillium fungicola* em *Agaricus bisporus* por microscopia eletrônica de varredura

Artigo de acordo com as normas da revista *Australasian Plant Pathology*

Janaira Santana Nunes

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

Diego Cunha Zied

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Dracena, 17900-000, Dracena, SP, Brasil.

Eloisa Aparecida das Graças Leite

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

Eustáquio Souza Dias

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

Eduardo Alves (Autor correspondente)

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil. Fax:

(+55 35) 3829.1281. E-mail: eaalves@dfp.ufla.br

RESUMO: O fungo *Lecanicilium fungicola* é o agente causador da doença bolha seca no cogumelo *Agaricus bisporus*, provocando perdas econômicas e danos na produção comercial do champignon. O objetivo desse estudo foi acompanhar o processo de infecção de *L. fungicola* em três linhagens brasileiras de *A. bisporus*, tanto na fase vegetativa, como na fase de formação dos basidiocarpos, utilizando a microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raios X. As micrografias mostram que o micélio vegetativo das linhagens de *A. bisporus* brasileiras são, resistentes à infecção do parasita. Entretanto, as imagens mostram que o patógeno pode entrelaçar nas hifas do *A. bisporus* sem causar danos, o que contribui para a presença do *L. fungicola* durante a colonização do substrato, permitindo sua presença durante a formação dos primórdios de *A. bisporus*. No basidiocarpo, foi possível observar o tempo de formação dos tubos germinativos (16 horas) de *L. fungicola* e o início da penetração (18 horas), sem a formação de estruturas especializadas. Também foi possível observar o processo de colonização e reprodução com formação de fiálides, conidióforos e verticílios do *L. fungicola*. A formação de cristais de oxalato de cálcio do patógeno, também foi observada, utilizando a microanálise de raios X, tanto no ponto de encontro das hifas em placa, como na infecção dos basidiocarpos. O estudo demonstrou não só o processo de infecção de *L. fungicola* em *A. bisporus*, mas o tempo que o patógeno leva para se instalar e colonizar todo o tecido do hospedeiro.

PALAVRAS-CHAVE: Microscopia eletrônica de varredura, cogumelo, microanálise de raios X, micopatógeno.

ABSTRACT: The fungus *Lecanicilium fungicola* causes the dry bubble disease in *Agaricus bisporus* mushroom leading to economic losses and damages in commercial production of champignon. The infection seems to occur at the stage of basidiocarp formation, yet the vegetative mycelium is resistant to infection. This study aimed to monitor the infection process of *L. fungicola* in three *A. bisporus* strains, both at the vegetative stage and at the stage of basidiocarp formation using scanning electron microscopy with X-ray microanalyses. Micrographs show that the vegetative mycelium of *A. bisporus* strains are truly resistant to infection by the parasite. However, the formation of germinative tubes of *L. fungicola* and the process of penetration without the formation of specialized structures was observed in the basidiocarp. The process of colonization and reproduction with the formation of phialides, conidiophores and whorls of *L. fungicola* were observed as well. The formation of calcium oxalate crystals using X-ray microanalyses both at the matching point of the hyphae in the plate and basidiocarps infection was also observed.

Keywords: Scanning electron microscopy, mushroom, X-ray microanalyses, myco pathogen

INTRODUÇÃO

Lecanicillium fungicola (Preuss) Zare e Gams, também conhecido como *Verticillium fungicola* (Preuss) é frequentemente associado ao champignon (*Agaricus bisporus*), sendo o etiológico da doença conhecida como bolha seca (Zare & Gams, 2008). Esta doença está associada a grandes perdas e danos na produção comercial do cogumelo (Berendsen et al., 2010). Os sintomas da doença variam desde pequenas lesões necróticas no basidiocarpo, descascamento do estipe, até massas disformes e indiferenciadas do tecido do cogumelo (Largeteau e Savoie 2008). Atualmente, o controle da doença depende do uso de fungicidas como Prochloraz, mas a resistência do patógeno a este fungicida já tem sido relatada (Gea, 2005; Mehrparvar et al. 2013).

A infecção do *L. fungicola* parece ocorrer inicialmente pela adesão de hidrofobinas presentes na parede de ambos os fungos. Após a ligação inicial, o fungo pode crescer inter e intracelularmente devido ao enfraquecimento da parede celular do *A. bisporus* pela ação de enzimas líticas e por pressão mecânica do patógeno (Calonje et al. 1997). Aparentemente, a infecção só ocorre quando os cogumelos apresentam-se desenvolvidos ou em fase de colheita (Largeteau e Savoie, 2010). A observação sugere que o micélio vegetativo não é afetado. Alguns estudos microscópicos e bioquímicos foram publicados com intuito de esclarecer o processo de infecção, mas esse não está totalmente elucidado.

Alguns autores demonstraram que há variabilidade com relação a agressividade entre os grupos de *L. fungicola* (Largeteau et al. 2006). Atualmente, é reportado que duas variedades de *L. fungicola* afetam culturas de *A. bisporus*, a variedade *aleophilum*, que afeta culturas de cogumelos no Canadá e EUA (Collopy et al. 2001) e a variedade *fungicola*, responsável pela a doença na Grã-Bretanha, Holanda, Espanha, e França (Largeteau et al. 2006). No Brasil, não a relatos de qual variedade afeta a produção de *A. bisporus*.

O processo de infecção por *L. fungicola* tem sido analisado por avaliações bioquímicas e moleculares (Collopy et al. 2010; Largeteau e Savoie 2010). Entretanto, sua visualização só é possível por meio de estudos morfológicos. A microscopia eletrônica de varredura tem sido uma importante ferramenta nos estudos relacionados à interação patógeno/hospedeiro, ou seja, da adesão, germinação, penetração, colonização e reprodução do patógeno (Calonje et al. 2000). Além disso, estudos morfológicos são considerados um pré-requisito para o desenvolvimento de estratégias de controle.

O objetivo desse estudo foi acompanhar o processo de infecção do *L. fungicola* em três linhagens de *A. bisporus*, tanto na fase vegetativa, quanto na fase de formação dos basidiocarpos, por microscopia eletrônica de varredura.

MATERIAL E MÉTODOS

Interação das hifas

Para o estudo de interação na fase vegetativa foram utilizados micélios *L. fungicola* (LF.1) e de três linhagens *A. bisporus* (ABI 7, ABI 11/14 e ABI 11/21) presentes na micoteca do Laboratório de Cogumelos Comestíveis da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Discos de 0.5 cm de diâmetro foram transferidos para o meio BDA (batata-ágar-dextrose) de ambos isolados em extremidades opostas e mantidos em BOD 25 °C ± 0,5 °C. Devido à diferença da taxa de crescimento dos dois fungos, as linhagens de *A. bisporus* foram inoculadas 10 dias antes do *L. fungicola*. Após a aproximação dos micélios, 5 amostras de 1 cm² foram retiradas no ponto de encontro das colônias em 1, 3, 5 e 10 dias. O tempo de coleta foi determinado a partir de testes desenvolvidos anteriormente pelos autores.

Cultivo do *champignon* e inoculação do *L. fungicola*

Para estudos da infecção *L. fungicola* com o cogumelo foi utilizada as mesmas linhagens descritas anteriormente. Para isso, os compostos obtidos comercialmente pela empresa Sítio dos Micélios, localizada em Barbacena-MG/Brasil, foram inoculados com as linhagens de *A. bisporus* e mantidos a 25±1 °C por 20 dias, até a total colonização do substrato. Para a indução da frutificação dos basidiocarpos, foi utilizada uma camada de cobertura contendo latossolo vermelho distroférico e carvão, proporção (1:2) respectivamente, e calcário calcítico (5%). Depois da adição da camada de cobertura os compostos foram incubados a 20±1 °C e umidade 90%. Após o aparecimento dos primórdios foram inoculados 5 µL de uma suspensão de esporos (1x10⁴ mL⁻¹) em diferentes pontos da superfície do cogumelo. Cinco a mostras de 1 cm² dos cogumelos infectados foram retiradas com 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50, 70, 140 horas. O tempo de coleta foi determinado a partir de testes anteriores.

Microscopia eletrônica de varredura

Todas as amostras coletadas foram pré-fixadas em fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em fosfato 0,05 M, pH 7,2) por um período de, no mínimo, 24 horas. Algumas amostras de cogumelos infectados com o patógeno foram retiradas do pré-fixador e transferidas para glicerol 30% por 30 minutos; em seguida, imersas em nitrogênio líquido e fragmentadas com bisturi sobre placa de metal.

Após fixação, foi utilizado o protocolo padrão para microscopia eletrônica de varredura descrita por Bozzola e Russel (1999), com modificações.

As amostras foram lavadas em tampão fosfato 0,05 M por três vezes de 10 minutos cada, e desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, uma vez e 100%, por três vezes). Após a desidratação, as amostras foram levadas a um aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituição de acetona por CO₂ e complementação da secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio (*stubs*) com fita de carbono sobre uma película de papel alumínio e cobertos com ouro no evaporizador Balzers SCD 050 e em seguida, observadas no microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP.

A partir da observação de cristais presentes em algumas amostras foi possível a qualificação/quantificação da composição química destes por Espectrometria de Energia Dispersiva por Raio-X no aparelho Quantax Xflash 5010 Bruker acoplada ao microscópio eletrônico de varredura. Para isso, as novas amostras foram preparadas de acordo com a metodologia descrita acima. Entretanto, os espécimes foram levados ao aparelho evaporizador de carbono modelo Balzer CED 020 logo após montados em suportes de alumínio (*stubs*) e em seguida observados no aparelho LEO EVO 40 XVP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Interação entre hifas

As micrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura demonstram a interação entre as hifas das linhagens de *A. bisporus* e *L. fungicola* (Figura 1). Como já descrito por Calonje et al. (2000), as hifas de *L. fungicola* podem ser distintas das de *A. bisporus*, devido ao seu menor diâmetro. As imagens revelam que, após o contato com o agente patogênico, as hifas de *A. bisporus* não demonstraram nenhuma degradação da

parede da célula hospedeira, nem sinal de penetração em nenhuma das linhagens de *A. bisporus* analisadas. O mesmo foi observado por Shamsad et al. (2009) em seu estudo de interação entre o micélio vegetativo de *A. bisporus* e *L. fungicola*, em que por microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que não houve infecção do patógeno no tecido do hospedeiro. As imagens demonstram que o micélio vegetativo das linhagens brasileiras de *A. bisporus* também não é afetado por infecção de *L. fungicola*. As eletromicrografias também demonstram que, além de não ocorrer o processo de infecção por *L. fungicola*, o micélio vegetativo de *A. bisporus* não sofre alteração na estrutura morfológica, conforme agora comprovado por microscopia eletrônica de varredura.

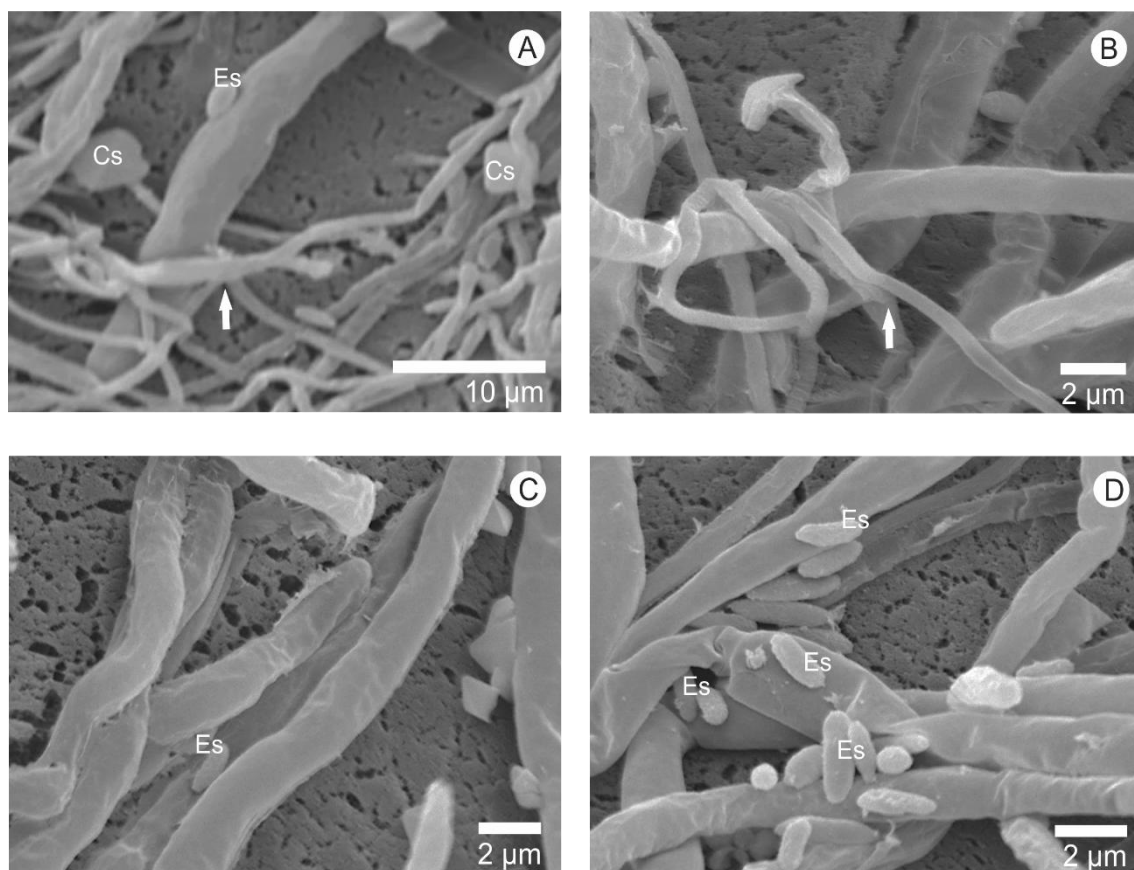


Figura 1. Eletromicrografias de varredura mostrando a interação das hifas de *A. bisporus* (fase vegetativa) e *L. fungicola* e Cristais (Cs) em (A) e (B), e a adesão dos Esporos (Es) nas hifas *A. bisporus* em (C) e (D). As setas indicam as hifas de *L. fungicola*.

Foi possível observar no presente estudo, esporos e hifas de *L. fungicola* aderidas a superfície do hospedeiro (Figura 1C-D) e hifas enroladas (Figura 1B) em torno das hifas do hospedeiro. Provavelmente este comportamento contribui para que o

patógeno possa estar presente tanto na produção do spam (material de *A. bisporus* utilizado para colonização do substrato), quanto no período de colonização do substrato pelo *A. bisporus*, permitindo que ele esteja presente no início da formação dos primórdios. Quando a infecção ocorre no início da formação do corpo de frutificação (formação do botão), o corpo de frutificação não desenvolve, causando uma massa indiferenciada do tecido do estipe e do píleo formando uma massa disforme que dá origem ao nome da doença, Bolha seca. Neste caso, a doença é ainda mais agressiva podendo causar perdas maiores de produção (Berendsen et al. 2010).

É provável que o patógeno possa aderir ao hospedeiro por meio das interações hidrofóbicas entre as camadas de hidrofobina. Em *A. bisporus* a superfície externa da hifa vegetativa está coberta por hidrofobinas tipo ABH3 (Lugones et al, 1998). No *L. fungicola* as análises da composição dos aminoácidos revelaram a presença de hidrofobinas de classe II (Calonje et al. 2002). Mesmo com a adesão aparente entre os isolados, não foi visualizado nas eletromicrografias a penetração do patógeno na hifa vegetativa das linhagens de *A. bisporus*. Portanto, ainda que não ocorra o processo de infecção, a interação mediada por hidrofobinas é importante para permitir a presença de estruturas do patógeno no momento da frutificação, quando a infecção irá se estabelecer.

Lecanicillium fungicola não parece apresentar um efeito lítico sobre a parede do micélio vegetativo do *A. bisporus*, sugerindo que o processo de infecção depende da composição química e estrutura de parede celular do hospedeiro (Calonge et al 2000). Bernardo et al. (2004) confirmaram essa hipótese. Os autores observaram que a parede celular do parasita possui glicogalactomananas que são capazes de reconhecer e se ligar a lectina presente no corpo de frutificação do hospedeiro. O micélio vegetativo de *A. bisporus* não apresenta em sua composição a lectina.

Perez Cabo e Garcia Mendoza (2008) encontraram efeitos semelhantes das glicogalactomananas de *L. fungicola* na atividade hemaglutinante em uma lectina de *Pleurotus ostreatus*. Isto implica que este mecanismo pode funcionar em outras espécies suscetíveis. Entretanto, novas evidências sobre a necessidade da lectina no processo devem ser exploradas. Os estudos confirmam a ineficácia da colonização do patógeno no micélio vegetativo das linhagens de *A. bisporus* produzidas no Brasil.

Infecção do Champignon por *L. fungicola*.

Não houve diferença no processo de infecção nas três linhagens de *A. bisporus* utilizadas. O início da germinação ocorreu somente a partir das 16 horas, quando os conídios emitiram 1, 2 ou 3 tubos germinativos, com predominância unilateral (Figura 2 A-G). O tubo germinativo foi emitido nas extremidades, havendo, entretanto, alguns que surgiram lateralmente.

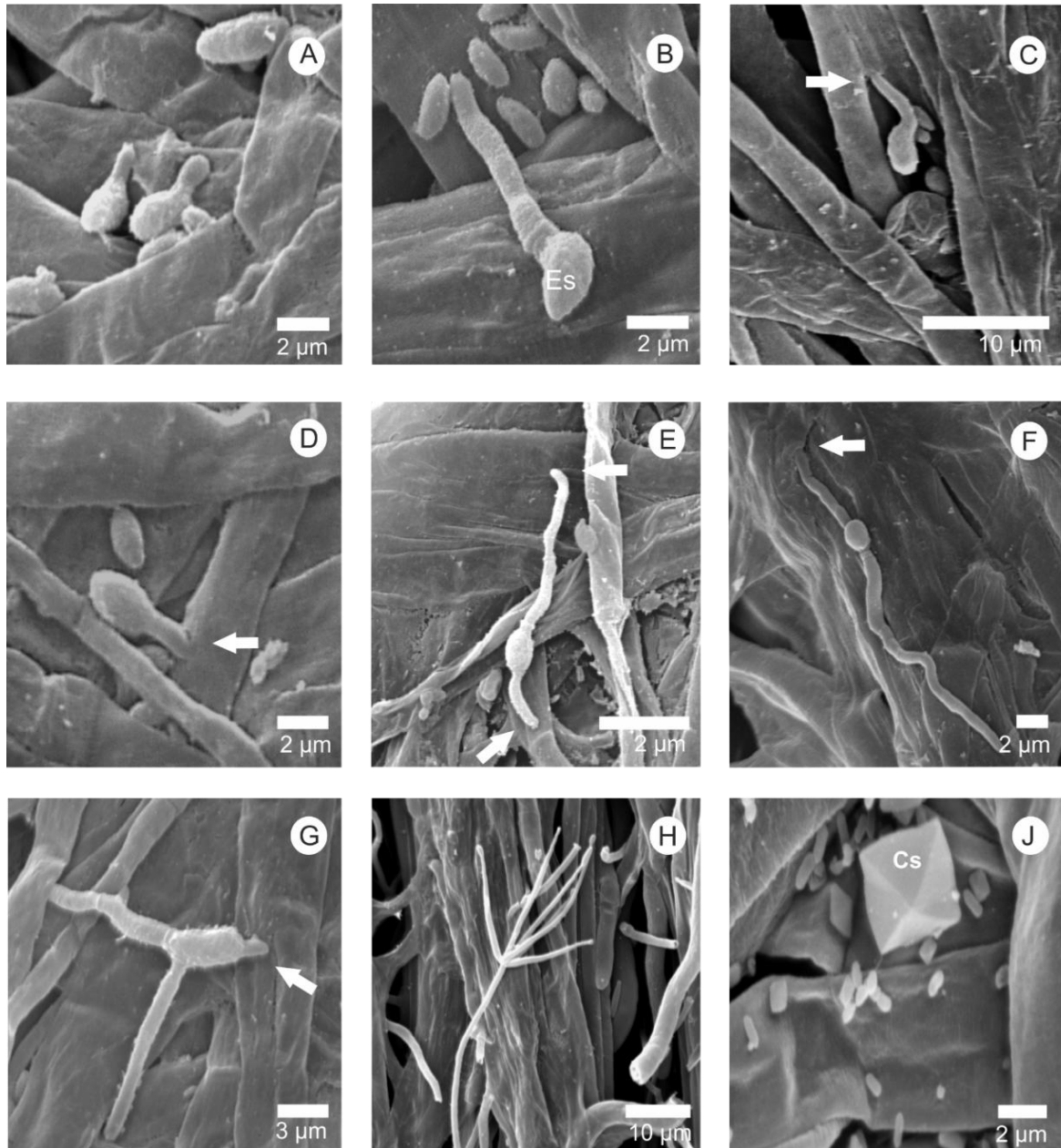


Figura 2. Eletromicrografias de varredura da superfície dos basidiocarpos de *A. bisporus* inoculados com *L. fungicola*. Germinação e infecção com a emissão de um (A-D), dois (E-F) e com três tubos germinativos (G); H. Formação dos conidióforos verticilos e fiálides; J. Cristais. As setas indicam o ponto de infecção do *L. fungicola* no tecido do *A. bisporus*.

Após 18 horas foi possível visualizar a penetração do *L. fungicola* no tecido do cogumelo (Figura 2 C-G). Não houve a formação de estruturas especializadas de penetração em nenhuma das amostras analisadas. Os dados corroboram com os estudos de North e West (1993) e Shamshad et al. (2009), que também utilizaram microscopia eletrônica de varredura para essa observação. Entretanto, Dragt et al (1996), utilizando microscopia eletrônica de transmissão, mostraram evidências de penetração direta e de formação de estruturas especializadas de uma variedade de *L. fungicola* no corpo de frutificação de *A. bisporus*. A diferença pode estar relacionada com a virulência do isolado de *L. fungicola* utilizado.

Após a penetração, o *L. fungicola* começou a colonização do tecido do cogumelo. A partir das 40 horas observou-se a formação dos conidióforos, verticílios e fiálides característicos do *L. fungicola* (Figura 2 H-I). Os conidióforos apresentaram-se eretos com cerca de 3 a 5 fiálides em espiral. Zare e Gams (2008) descrevem a estrutura dos conidióforos com cerca de 3 a 10 fiálides em espiral em *L. fungicola* var. *fungicola* e de 3 a 7 em *L. fungicola* var. *aleophilum*.

O estudo, pode-se observar alto grau de infecção a partir de 50 horas após a inoculação (Figura 3 A-B). A expressão dos sintomas (manchas escuras no tecido) foi observada a partir de 72 horas da inoculação. A tirosinase latente presente nos tecidos dos cogumelos pode ser ativada após um extravasamento celular ocasionado pela infecção. A ativação da enzima pode terminar na síntese de melanina (Soler-Rivas et al, 1997). Largeteau et al. (2007) analisaram os tecidos de *A. bisporus* com manchas escuras e demonstraram que o escurecimento não é um mecanismo de defesa eficaz, mas indicaram alto nível de infecção, levando a alteração do tecido. Baseado na literatura e nos dados, podemos inferir que as necroses ocorrem quando a biomassa do cogumelo é significativamente afetada.

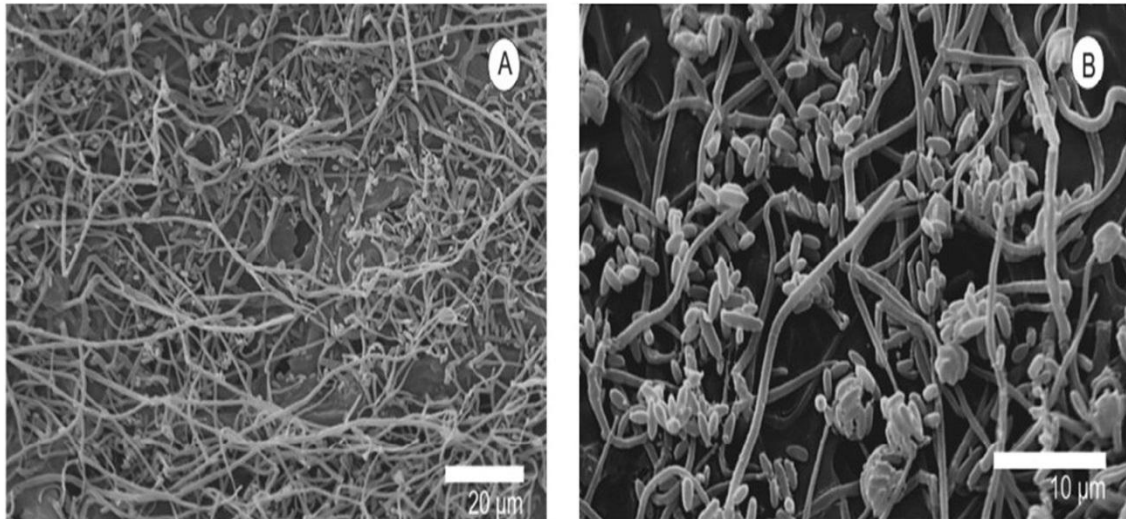


Figura 3. Eletromicrografias de varredura da superfície dos cogumelos de *Agaricus bisporus* inoculados com *Lecanicillium fungicola*, após 50 horas, em A e B, desmontando todo o tecido colonizado pelo patógeno.

A análise do corte transversal das amostras de tecido infectado permitiu observar a produção de conídios e colonização das hifas em partes mais internas do basidiocarpo (Figura 4 A-C). O agente patogênico cresce preferencialmente intercelularmente, mas também é capaz de penetrar nas paredes celulares das hifas do corpo de frutificação (Dragt et al. 1996). A observação da colonização das hifas mais internas foi mais evidente após a lesão no tecido do cogumelo. Acreditamos, com base nos dados, que as lesões facilitam a penetração no interior do basidiocarpo e, uma vez que o processo infeccioso tenha se estabelecido, o patógeno, por fim, consegue infectar o interior das hifas.

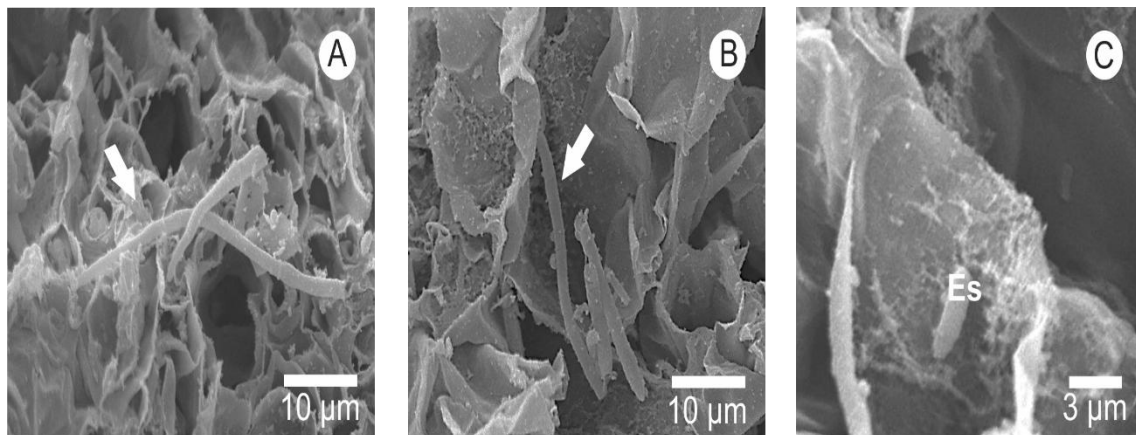


Figura 4. Eletromicrografias de varredura de cortes transversais dos cogumelos de *Agaricus bisporus* inoculados com *L. fungicola*. Em (A) e (B) o crescimento do patógeno no interior das hifas no hospedeiro (indicado pelas setas) e em (C) o esporo (Es) aderido ao interior da hifa do *A. bisporus*.

Foi observada a presença de cristais de cálcio tanto no meio de cultura onde houve a interação das hifas, quanto no tecido do cogumelo infectado (Figura 1A e 1C e 5 A). Utilizando a microanálise de Raios-X (EDS), pode-se determinar que o cristal é constituído do elemento cálcio (Figura 5B) e oxigênio (Figura 5 B e 5D), confirmando se tratar de Oxalato de Cálcio. Ao analisar a morfologia do *L. fungicola*, Zare e Gams, (2008) observaram a produção de cristais octaédricos no meio de cultura, mas os autores não investigaram a composição dos cristais. Ao cultivar os dois fungos separadamente, foi possível observar a presença de cristais somente na cultura do *L. fungicola*.

A presença de cristais de oxalato de cálcio tanto durante a interação das hifas, em que não houve a infecção, quanto após um alto nível de infecção do *L. fungicola* nos basidiocarpos nos leva a crer que os cristais são produzidos como parte do metabolismo do patógeno. Dutton e Evans (1996) observaram que a produção de oxalato pode contribuir para patogenicidade de alguns fungos por intoxicação da célula hospedeira, acidificação dos tecidos e sequestro de cálcio da parede celular hospedeira. Para alguns fungos, como *Sclerotinia sclerotiorum*, o oxalato é um elemento essencial para o fator de virulência (Godoy et al. 1990). Em *L. fungicola*, novos estudos com mutantes deficientes em biossíntese de oxalato de cálcio devem ser conduzidos com intuito de verificar o seu papel na patogenicidade.

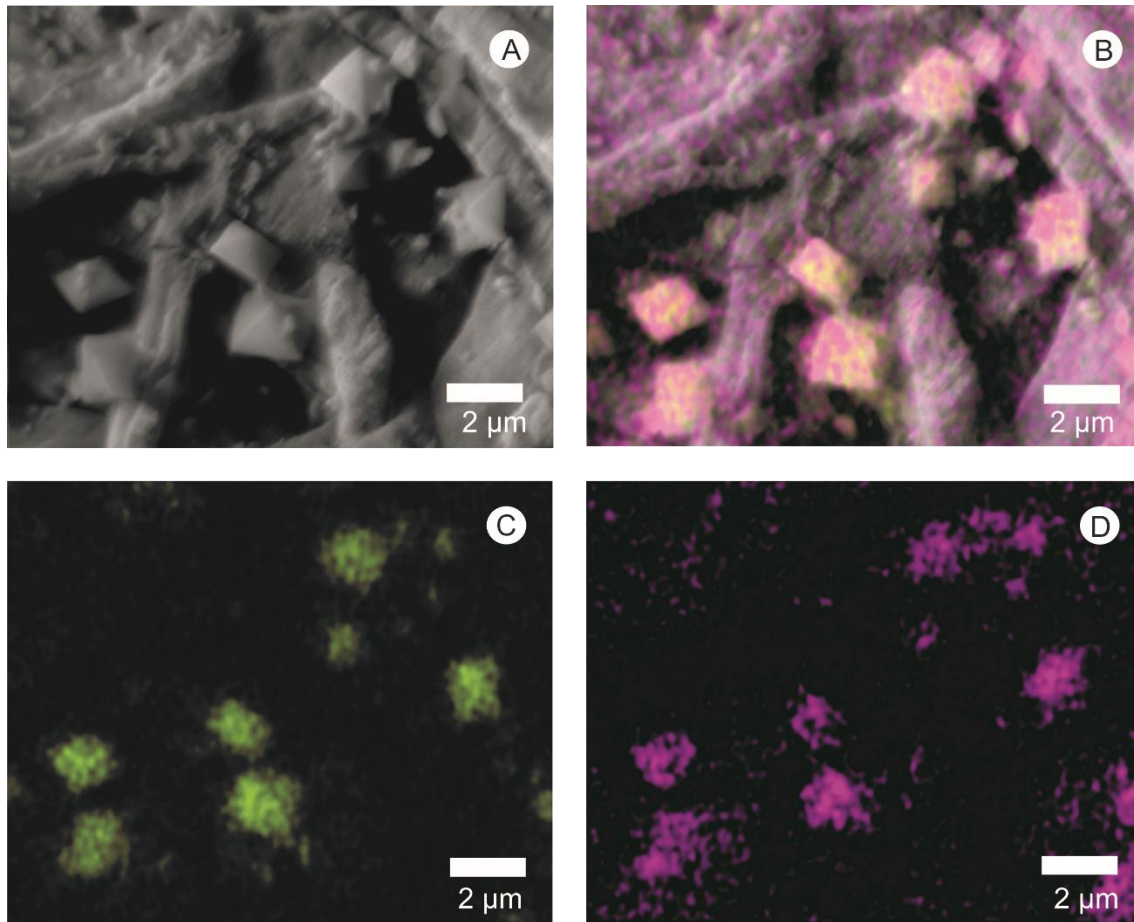


Figura 5. Eletromicrografia de varredura dos cristais encontrados na superfície do tecido do *A. bisporus* infectado com *L. fungicola* em (A). Mapeamento por Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X (EDS), (B-C) mostrando, em verde, a distribuição do elemento cálcio (Ca) e em roxo o oxigênio (B-D), formando oxalato de cálcio (CaO_x).

As observações trouxeram evidências de que o micélio vegetativo das linhagens ABI 7, ABI 11/20 e ABI 11/14 é resistente à penetração do *L. fungicola*, mas permite uma interação com as hifas do patógeno suficiente para proporcionar que o micélio do hospedeiro carregue as estruturas do patógeno durante todo o processo de colonização do substrato. Os basidiocarpos apresentaram sinais de infecção do patógeno após 16 horas de inoculação, atingindo elevados níveis de infecção após 50 horas. Quanto a formação de cristais de oxalato de cálcio, novos estudos devem ser conduzidos para elucidar a formação destes no processo de infecção.

CONCLUSÕES

O *L. fungicola* pode aderir as hifas do *A. bisporus* permitindo a presença do patógeno no momento da formação dos basidiocarpos do hospedeiro.

O estudo permitiu observar todo o processo de infecção do *L. fungicola* em *A. bisporus* desde a formação dos tubos germinativos com 16 horas, até a colonização total do tecido do hospedeiro e início da formação dos sintomas com 50 horas. Também foi observado a formação de cristais de oxalato de cálcio pelo *L. fungicola*, entretanto novos estudos devem ser conduzidos para demonstrar o real papel da formação desses cristais na patogenicidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as agências brasileiras ao apoio a pesquisa: Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Berendsen RL, Baars JP, Kalkhove SIC, Lugones LG, Wösten HAB, Bakker PAH (2010) Pathogen profile *Lecanicillium fungicola*: causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. *Molecular Plant Pathology* **11**, 585-595.
- Bernardo D, Cabo AP, Novaes-Ledieu M, Mendoza GC (2004) Verticillium disease or 'dry bubble' of cultivated mushrooms: the *Agaricus bisporus* lectin recognizes and binds the *Verticillium fungicola* cell wall glucogalactomannan. *Canadian Journal of Microbiology* **50**, 729–735. doi: 10.1139/w04-047
- Bozzola JJ, Russell LD (1998) Electron microscopy. Boston: Jones and Bartlett. 670p.
- Calonje M, Bernardo D, Novaes Ledieu M, Mendoza CG (2002) Properties of a hydrophobin isolated from the mycoparasitic fungus *Verticillium fungicola*. *Canadian Journal of Microbiology* **48**, 1030–1034.
- Calonje M, García Mendoza C, Pérez Cabo A, Bernardo D, Novaes Ledieu M (2000) Interaction between the mycoparasite *Verticillium fungicola* and the vegetative mycelial phase of *Agaricus bisporus*. *Mycology Research* **104**, 988–992.
- Calonje M, Mendoza CG, Galan B, Novaes-Ledieu M (1997) Enzymic activity of the mycoparasite *Verticillium fungicola* on *Agaricus bisporus* fruit body cell walls. *Microbiology* **143**, 2999-3006.
- Collopy PD, Amey RC, Sergeant MJ, Challen MP, Mill S PR, Foster GD, Challen MP, Mills PR, Foster GD, Bailey AM (2010) The pmk1-like MAP kinase from

Lecanicillium (Verticillium) fungicola is not required for virulence on *Agaricus bisporus*. *Microbiology*, **156**, 1439-1447.

Collopy PD, Largeteau-Mamoun M, Romaine CP, Royse DJ, (2001) Molecular phylogenetic analyses of *Verticillium fungicola* and related species causing dry bubble disease of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Phytopathology* **91**: 905–912.

Dragt JW, Geels, FP, De Bruijn WC, Van Griensven LJLD (1996) Intracellular infection of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* by the mycoparasite *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. *Mycological Research* **100**, 1082–1086.

Dutton M V, Evans CS (1996) Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology* **42**(9), 881-895.

Gea FJ, Navarro MJ, Tello JC (2005) Reduced sensitivity of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* to prochloraz-manganese, *in vitro*. *Mycology Research* **109**, 741–745.

Godoy G, Steadman JR, Dickman Mb, Dam R (1990) Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **37**, 179–191.

Largeteau ML, Baars JPP, Regnault-Roger C, Savoie JM, (2006) Molecular and physiological diversity among *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. *Mycological Research* **110**, 431–440.

Largeteau ML, Regnault-Roger C, Savoie JM (2007) *Verticillium* disease of *Agaricus bisporus*: variations in host contribution to total fungal DNA in relation to symptom heterogeneity. *European Journal Plant Pathology* **118**, 155–164.

Largeteau ML, Savoie JM (2008) Effect of the fungal pathogen *Verticillium fungicola* on fruiting initiation of its host, *Agaricus bisporus*. *Mycological research* **112**, 825-828.

Largeteau ML, Savoie JM (2010) Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*: Biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**, 63–73.

Lugones LG, Wösten HAB, Wessels JGH (1998) A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiology* **144**, 2345–2353.

Mehrpour ME, Mohammadi Goltapeh E, Safaei N (2013) Resistance of Iranian *Lecanicillium fungicola* to Benzimidazole and Ergosterol Demethylation Inhibiting Fungicides. *Journal of agricultural Science and Technology* **15**, 389-395.

North LH, Wuest P (1993) The infection process and symptom expression of *Verticillium* disease of *Agaricus bisporus*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **15**, 74-80.

Perez Cabo A, Garcia Mendoza C (2008) Common mechanism of recognition and binding of the complementary molecules, carbohydrate-lectin in the *Verticillium* disease of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* cultivated mushrooms. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* **74**, 379–386.

Shamshad A, Clifta AD, Mansfield S (2009) Host–parasite interaction between cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* hybrid strain Sylvan A15, and the mycoparasite *Verticillium fungicola*, a causal agent of dry bubble disease. *Australasian Plant Pathology* **38**, 74–78.

Soler-Rivas C, Jolivet S, Arpin N, Olivier JM, Wichers HJ (1999) Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiology Reviews* **23**, 591-614.

Zare R, Gams W (2008) A revision of the *Verticillium fungicolas* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. *Mycological Research* **112**, 811–824.