

**AVALIAÇÃO CITOLÓGICA
E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE
*Agaricus blazei***

CLÁUDIA REGINA GONTIJO LABORY

CLÁUDIA REGINA GONTIJO LABORY

**AVALIAÇÃO CITOLÓGICA
E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE *Agaricus blazei***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Doutor.”

Orientadora
Profa. Dra. Rosane Freites Schwan

MINAS GERAIS
2003

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

Labory, Cláudia Regina Gontijo

Avaliação citológica e condições de crescimento de *Agaricus blazei* / Cláudia Regina Gontijo Labory. -- Lavras : UFLA, 2003.

60 p. : il.

Orientadora: Rosane Freitas Schwan.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Cogumelo. 2. Citologia. 3. Crescimento. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD-589.222
-635.8

CLÁUDIA REGINA GONTIJO LABORY

**AVALIAÇÃO CITOLÓGICA
E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE *Agaricus blazei***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Doutor.”

APROVADA em 6 de outubro de 2003

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide	UFLA
Profa. Dra. Giovana Augusta Torres	UFLA
Profa. Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada	UEM
Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias	UFLA



Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

*A meu esposo, João Cândido de Souza,
pelas lições de vida que tem me ensinado,*

ofereço.

*A meus pais, Ney e Neném,
Que são partes da minha vida;
às minhas irmãs, Débora e Polliana,
pelo companheirismo e amizade que são eternos;
à minha sobrinha, Bárbara
pela alegria e carinho,*

dedico.

*“Comece fazendo o necessário, depois o possível. E você
acaba fazendo o impossível.” (São Francisco de Assis)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar ao nosso lado sempre.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Aos meus orientadores, Eustáquio e Rosane, pela disponibilidade de laboratórios, além do convívio e intercâmbio de conhecimentos.

À orientadora Lisete, por ter se dedicado e me auxiliado numa inesperada fase do projeto, que nos proporcionou estudos inéditos; na sua confiança e por ceder as melhores condições de trabalho no laboratório.

Aos professores Giovana, Romildo e Kátia, pelas contribuições na tese.

Ao meu querido marido, João Cândido, por toda ajuda e companheirismo, estando sempre ao meu lado e à minha grande companheira Bela.

À minha inseparável ajudante e companheira Márcia (Nipônica), que demonstrou amizade, responsabilidade, solidariedade na fase mais difícil dessa caminhada.

Aos meus amigos e companheiros Evânia, Marisa, Luana, Scheila, Ivani, Léo, Pascoal, Zoraia, que me ajudaram nas difíceis situações, nunca me desamparando.

À imensurável ajuda e solidariedade do amigo e companheiro de ideais, Renil.

Aos amigos Ara, Cris, Leidiane, Cláudia (Formiga), Claudinelli, Plínio, Alexandre, Flávio Faria, Cássia Pedrozo, Josinha, Cidinha, Val, Magda, Rosângela, Ironдина, pelos momentos únicos, que só eles poderiam me ajudar.

Ao eterno e inesquecível amigo, Vinícius "in memoriam".

Aos amigos de trilha e solidariedade nada comparável, Oneida e Anderson, Léo e Paty.

À querida amiga Leninha e ao professor Magno, pelo convívio, conselhos e amizade nesses últimos tempos.

Às amigas e companheiras Leime e Marlúcia.

Aos meus pais que, mesmo longe, sempre me ampararam.

Às minhas irmãs e sobrinha, que nunca me deixaram sozinha.

Às famílias Souza e Alvarenga, que não deixaram de ser minha família, pelo suporte durante minha estada em Lavras.

Agradecimentos especiais ao Tio João e a Nicinha, que me cederam parte da fazenda, onde iniciei meus contatos com os cogumelos.

À pessoa de invejável caráter e sabedoria, Olinda, que sempre me acolheu como filha e à sua companheira de trabalho, Lucimara.

Às queridas Zélia, Rafaela e Elaine que, no meu sufoco, me ampararam sem medir esforços.

Ao meu querido Tio João, pelos conselhos bíblicos e por compartilhar o ano de 2003.

À querida amiga Patrícia, ao Jonas e ao Felipe, pelo início da minha caminhada no mundo dos cogumelos.

À minha querida amiga Juliana, que não me deixou em momento algum, no início da jornada na fazenda Cachoeira.

Aos professores do Departamento de Ciência dos Alimentos, em especial a ex-professora Vânia Dea, por ter me aceitado como pioneira no assunto sobre cogumelos na universidade.

A todos que fizeram parte da minha vida nesse trajeto, o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1 Aspectos taxonômicos do <i>Agaricus blazei</i>	2
2.2 Características morfológicas.....	3
2.3 Condições físicas e nutricionais.....	6
2.3.1 pH.....	6
2.3.2 Temperatura.....	7
2.3.3 Umidade.....	8
2.3.4 Luz.....	8
2.3.5 Fatores nutricionais.....	9
2.3.5.1 Macroelementos essenciais.....	9
2.3.5.1.1 Carbono	10
2.3.5.1.2 Nitrogênio.....	11
2.4 Translocação.....	11
2.5 Reprodução dos basidiomicetos.....	12
2.5.1 Variação genética.....	13
2.5.2 Basídios e basidiósporos.....	14
2.5.3 Grampo de conexão.....	16
2.6 Caracterização citológica.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
CAPÍTULO 2: CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE <i>Agaricus blazei</i>	23
RESUMO	24

ABSTRACT	25
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Isolados	27
2.2 Meios de cultivo.....	27
2.2.1 Avaliação dos isolados nos meios BDA e MEC em diferentes pH.....	28
2.3 Avaliação do efeito da temperatura	29
2.4 Avaliação dos isolados em substrato para inoculante comercial	29
2.5 Avaliação dos isolados em composto de cultivo.....	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1 Meios de cultura testados	31
3.2 Meio BDA em diferentes pH	33
3.3 Meio MEC em diferentes pH	33
3.4 Efeito da temperatura	34
3.5 Velocidade de crescimento em substrato para inoculante comercial	36
3.6 Velocidade de crescimento em composto de cultivo.....	37
4 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CAPÍTULO 3: ASPECTOS CITOLÓGICOS DE <i>Agaricus blazei</i>	41
RESUMO	42
ABSTRACT	43
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Isolados.....	46
2.2 Crescimento e manutenção da cultura.....	46
2.3 Avaliação citológica de hifas.....	47
2.3.1 Preparações citológicas	47
2.3.2 Delineamento experimental	48

2.4 Avaliação citológica de basídio e basidiósporo.....	48
2.4.1 Coleta do Material	48
2.4.2 Preparações citológicas.....	49
2.4.3 Fluorescência.....	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.1 Número de núcleos por compartimento celular	51
3.2 Comprimento e largura dos compartimentos celulares das hifas secundárias.....	52
3.3 Correlação entre compartimento celular e número de núcleos	53
3.4 Formação dos basidiósporos	54
4 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

RESUMO

LABORY, Cláudia Regina Gontijo. **Avaliação citológica e condições de crescimento de *Agaricus blazei***. 2003. 60 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.*

O cogumelo *Agaricus blazei*, espécie nativa do Brasil, vem sendo consumido e comercializado cada vez mais pelos países europeus e orientais devido às suas propriedades medicinais. Com o objetivo de aprofundar os conhecimentos sobre a sua biologia e estabelecer as melhores condições de crescimento, hifas de isolados de *A. blazei* (CS₁, CS₂, CS₄, CS₅, CS₆, CS₇) foram cultivadas para avaliação das melhores condições de crescimento do micélio em diferentes meios de cultivo, como substrato para produção de inoculante comercial e em composto de cultivo. Também foram testados diferentes pH e temperaturas de crescimento em meio de cultura sintético. O material estudado foi também corado com Giemsa, para avaliar o comportamento nuclear e as dimensões celulares da espécie. O fluorocromo DAPI foi utilizado para caracterização do comportamento nuclear dos esporos e do metabasídio. Quanto aos resultados de velocidade de crescimento, não houve diferença estatística do pH em meio BDA para a maioria dos isolados estudados, porém no meio MEC, os melhores valores de pH para os isolados CS₁ e CS₇ foram: 5,0; 5,5 e 6,0. Quanto à temperatura verificou-se que o crescimento micelial só foi comprometido em temperaturas abaixo de 21°C, não havendo diferença estatística nas temperaturas de 23°C e 28°C. O meio MEC mostrou-se o mais indicado para a produção da matriz primária de *A. blazei* em função da estabilidade da cultura. Os isolados CS₁, CS₄ e CS₅ foram os mais rápidos na colonização do meio de cultura e no substrato constituído de arroz + farelo de trigo. No composto de cultivo todos os isolados apresentaram o mesmo desempenho. Nas avaliações citológicas, os isolados de *A. blazei* apresentaram células multinucleadas com média de 6 núcleos por compartimento celular. Foi caracterizada a presença de 4 núcleos no metabasídio, 4 esporos por basídia e dois núcleos por esporos, apresentando uma mitose pós-meiótica, na fase final da formação dos esporos. Estudos quanto a produtividade deverão indicar quais isolados são de fato os mais indicados para a produção de inoculante comercial.

*Comitê orientador: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Professora orientadora), Eustáquio Souza Dias - UFLA; Lisete Chamma Davide - UFLA

ABSTRACT

LABORY, Cláudia Regina Gontijo. Cytological evaluation and growing condition of *Agaricus blazei*. 2003. 60p. Thesis (Doctorate in Food Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.*

The mushroom *Agaricus blazei*, a native Brazilian species, has been consumed and traded even more by Europeans and East countries due to its medicinal properties. With the objective of increase its biology knowledge and establish the best growing condition, strains of *Agaricus blazei* (CS₁, CS₂, CS₄, CS₅, CS₆, CS₇,) were assessed to the best conditions for the mycelium development in different culture medium such substrate to spawn production and in culture compost. To assess different growing pH and temperature in synthetic culture medium. The studied strains were also dyed with Giemsa, to assess the nuclear behaviour and the nuclear compartment of this specie. The DAPI fluorochrome was utilized to characterize the spore and metabasidium nuclear behaviour. As to the growing speed results, there were not statistical difference to the pH in the BDA medium for the majority of the studied strains, but in the MEC medium, the best values to pH to the CS₁ and CS₇ strains were: 5,0; 5,5 and 6,0. It was verify that the mycelium growth was affected in temperature under 21°C, not having statistical difference in the temperature of 23°C and 28°C. The MEC medium showed to be the most indicated to the primary matrix production of *A. blazei* due to the culture stability. The strains CS₁, CS₄ and CS₅ were the fastest in the colonization of the culture medium and in the substrate made of rice plus midding wheat. In the culture compost, all the strains presented the same performance. The strains of *A. blazei* presented multinucleated cells with mean of six nucleus in the cell compartment, four spore by basidium and two nucleus by spore, presenting mitosis post meiotic in the final phase of the spore formation. Study about productivity should indicate which strains are really the most indicated to spawn production.

*Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Major Professor), Eustáquio Souza Dias - UFLA; Lisete Chamma Davide - UFLA

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O cogumelo *Agaricus blazei* é nativo do Brasil sendo encontrado naturalmente na região sudoeste do estado de São Paulo. A sua descoberta ocorreu no município de Piedade e por isso, ele recebeu o nome de cogumelo Piedade, nome pelo qual começou a ser conhecido em outros países (Uryu, 1995).

Os cogumelos, em geral, têm sido indicados como alimentos terapêuticos utilizados na prevenção de doenças, tais como hipertensão, câncer, viroses, bacterioses e outras (Bobek & Galbavy, 1999; Bobek et al., 1995).

Dentre as espécies intensivamente cultivadas com propósito comercial, o cogumelo *A. blazei* surgiu pela demanda do mercado japonês, que é o principal comprador. Este consumo foi despertado graças a estudos no Japão que permitiram a descoberta e isolamento de substâncias com atividade antitumoral (Kawagishi et al., 1988; Kawagishi et al., 1989; Osaki et al., 1994; Itoh et al., 1994; Ito et al., 1997).

Apesar de sua importância e grande perspectiva de utilização, e considerando que o cultivo de *A. blazei* é relativamente recente no Brasil, observa-se uma carência de estudos mais aprofundados a seu respeito. Com o objetivo de selecionar isolados de *A. blazei* mais estáveis e produtivos, estes foram comparados em diferentes condições físico-químicas quanto ao seu crescimento micelial. Outro objetivo abordado neste trabalho foi a compreensão do comportamento morfológico e nuclear de hifas secundárias e basidiósporos da espécie, realizando estudos iniciais sobre sua caracterização citológica utilizando Giemsa e fluorocromo DAPI.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos taxonômicos do *Agaricus blazei*

O *Agaricus blazei* pertence à divisão Basidiomycota, ordem Agaricales, família Agaricaceae. Na ordem Agaricales estão incluídos os fungos basidiomicetos que apresentam corpo de frutificação visível a olho nu, conhecido como cogumelo, tendo como característica básica o estipe central separado do píleo, lamelas livres, acinzentadas quando jovens tornando-se marrom-escuras na maturidade (Urban, 2001).

A variação morfológica, entretanto, é muito grande. A consistência pode ser membranosa a carmosa até quase coreácea, às vezes com diferentes graus de gelatinização, mas nunca lenhoso ou carbonáceo. Há basidiocarpos (também chamados de carpóforos) caracteristicamente pileados e estipelados, outros com estipe desde central até excêntrico, lateral e mesmo ausente e outros fixos pela camada cortical estéril do píleo ao substrato (Putzke & Putzke, 1998).

Um dos caracteres mais importantes para a taxonomia da ordem Agaricales é a cor dos esporos. A variação de cores dos esporos é muito grande, sendo as mais freqüentes, a branca, a marrom-escura, a amarelada, a laranja rosada, a verde e a preta. Os esporos podem ser hialinos a pigmentados ao microscópio, apresentando parede fina ou grossa, lisa ou diversamente ornamentada. Normalmente, observa-se um hilo ou apêndice hilar, o qual representa o ponto onde o esporo estava preso ao esterigma que aparece como uma pequena lança. Quando o cogumelo entra no estágio de amadurecimento dos basidiósporos, estes são desprendidos do esterigma que os sustentava a partir do basídio e lançados ao ar violentamente por meio de um sistema de

ejeção especialmente adaptado. Oposto ao hilo, em algumas famílias, ocorre a formação de poro germinativo (Putzke & Putzke, 1998).

A família Agaricaceae é uma vasta família apresentando 25 gêneros. O gênero mais comum da família é o *Agaricus* L. ex Fr (Pegler, 1983), cuja maioria das espécies é comestível (14 espécies). Dentre elas, apenas seis são cultivadas em escala comercial (Alexopoulos et al., 1996).

A família Agaricaceae tornou-se muito conhecida, principalmente devido ao cogumelo *Agaricus bisporus*, conhecido popularmente como *champignon*, o cogumelo mais produzido e consumido no mundo (Braga & Eira, 1997).

2.2 Características morfológicas

A hifa (Gr. *Hiphé* = tecido) é o filamento fúngico, simples ou ramificado, septado ou não, que constitui o micélio dos fungos (Fidalgo & Fidalgo, 1967). As hifas prolongam-se por crescimento apical, mas, muitas partes do fungo são potencialmente capazes de crescer. Um pequeno fragmento de qualquer parte do organismo é capaz de crescer e dar origem a um novo indivíduo (Alexopoulos et al., 1996).

Nos homobasidiomicetos, a hifa geradora ou generativa apresenta crescimento indefinido, é ramificada, tem paredes delgadas, é sempre septada, possui septo simples ou com grampos de conexão e dá origem ao basidiocarpo e a outros tipos de hifas (Urben et al., 2001).

O número de núcleos nas células das hifas dos basidiomicetos varia de espécie para espécie. Eles não são igualmente distribuídos no citoplasma e nem há tendência para formarem pares. Em alguns casos, eles tendem a formar grupos mantendo áreas do citoplasma sem núcleos, não se localizando necessariamente na região central da hifa. De fato, é usual encontrá-los próximo da parede da célula (Chang & Hayes, 1978).

Uma estrutura importante para a classificação genérica e específica dos Agaricales, o grampo de conexão, (Figura 1) também denominado ansa (*ansai* = asa) ou fibula (*fibula* = fivela), é um tipo de ligação do micélio dicariótico de um grande número de basidiomicetos, constituído por um pequeno canal semicircular que se dirige para baixo, encurvando-se até tocar a célula inferior da mesma hifa, à qual se une (Urban et al., 2001). Na família Agaricaceae, o grampo de conexão está presente somente em alguns gêneros. No entanto, há exemplos de famílias em que os grampos de conexão estão presentes em todos os gêneros (Pegler, 1983).

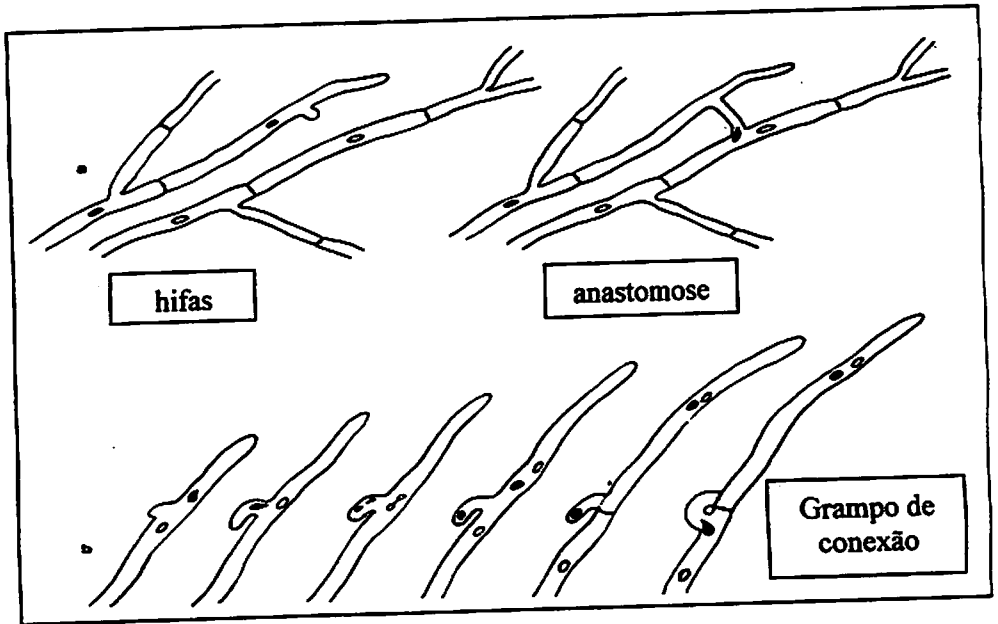


FIGURA 1 Desenho esquemático de hifas em anastomose e grampo de conexão.

Em eucariotos, vários tipos de conexão entre células podem permitir a troca de material intracelular, tanto do núcleo inteiro como de cromossomos ou fragmentos de cromossomos (Takats, 1959). As conexões permitiriam também a troca de material genético extra nuclear, como DNA mitocondrial ou plasmidial (Collins & Saville, 1990; Griffiths, 1995).

A heterocariose é conseguida em fungos filamentosos, por meio de anastomoses entre hifas que permitem a troca ou passagem do núcleo, bem como parte do citoplasma (Chang & Hayes, 1978).

A anastomose (Figura 1) aparentemente acontece para balancear o conteúdo celular do micélio, particularmente os tipos e número de núcleos ou como um evento preparatório para uma etapa do crescimento e desenvolvimento, a formação dos heterocários e dicários, assim como a formação do carpóforo (Chang & Hayes, 1978).

A translocação nuclear em fungos por meio da migração, primeiramente descrita por Buller (1931) e citada por Chang & Hayes (1978), é considerada uma das maiores descobertas do fenômeno do sistema de fator sexual dos basidiomicetos.

Chang (1969) relatou que um núcleo constricto de uma hifa vegetativa monospórica de *Volvariella volvacea*, passou por um poro septal. Em alguns casos, o ponto de migração do núcleo é pequeno e em outros é alongado na forma de filamento de cromatina.

Uma única célula possui um ou mais núcleos migratórios, apesar de algumas não possuírem nenhum. Numa dada célula, a direção de migração é sempre a mesma. Essa observação sugere que o transporte de núcleos seja passivo, por fluxo citoplasmático, apesar de os centríolos estarem envolvidos ativamente na mobilidade do núcleo fúngico (Kües, 2000). O movimento nuclear geralmente é mais ativo em células apicais e durante a alongação celular do que em células estáveis distantes do ápice (Chang & Hayes, 1978).

Em *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*, experimentos com agentes antimicrotúbulos demonstraram que a migração nuclear é mediada primeiramente pelo sistema de microtúbulos (Oakley & Morris, 1980; That et al., 1988). Durante o crescimento das hifas de fungos, tais como *A. nidulans*, *N. crassa*, *N. haematococca*, também foi observado que a distribuição e a migração nuclear são dependentes dos microtúbulos e da dinâmica citoplasmática (Xiang et al., 1994; Plamann et al., 1994; Inoue et al., 1998).

2.3 Condições físicas e nutricionais

O crescimento dos fungos é afetado por fatores ambientais, especialmente pela temperatura, grau de umidade, teor de oxigênio, grau de acidez (pH), luz e nutrientes que lhes são oferecidos (Deacon, 1997).

2.3.1 pH

O crescimento apical é um método predominante do crescimento celular em fungos que também é exibido por inúmeros tipos de células especializadas de plantas. Agora é amplamente aceito que o gradiente iônico intra e extracelular, notavelmente de H^+ e Ca^{2+} , está associado ao crescimento polarizado de células fúngicas. Gradiente de pH extracelular comumente é associado com o crescimento apical das células (Parton et al., 1997).

Todos os fungos estão em contato com soluções aquosas na natureza ou no laboratório e a concentração do íon hidrogênio (pH) nessas soluções controla o crescimento fúngico. Íons metálicos podem ser afetados pelo pH, formando complexos insolúveis em determinadas faixas. Íons fosfato e magnésio podem coexistir em pH baixo, porém, em pH elevado, eles formam um complexo insolúvel, reduzindo a disponibilidade desses íons para o fungo. O ferro torna-se insolúvel em pH neutro a alcalino. Esse efeito é similar com íons cálcio e zinco. A permeabilidade celular é alterada com a variação entre acidez e alcalinidade,

sendo o efeito particularmente notável em compostos que se ionizam. A explicação é que em pH baixo, a membrana plasmática se torna saturada com íons hidrogênio e a passagem de cátions fica limitada, enquanto em pH elevado, a membrana se torna saturada com íons hidroxila, limitando a entrada de ânions essenciais. Em geral, um ligeiro grau de acidez é favorável à germinação dos esporos e ao rápido crescimento das colônias jovens. O pH ideal varia entre as espécies. Para fungos como *Agaricus bisporus*, o pH ideal está na faixa de 5,5 a 8,0 (Landecker, 1996).

As enzimas são inativadas em faixas de pH extremos, tendo diferentes níveis ótimos para a atividade. Um pH desfavorável do meio externo pode alterar a atividade das enzimas digestivas extracelulares ou outros processos metabólicos (Zheng & Shetty, 2000). Os fungos invariavelmente alteram o pH do meio em que crescem. Comumente, o decréscimo se dá pelo acúmulo de ácidos orgânicos, como ácido glucônico, pirúvico, cítrico e succínico, formados pelo metabolismo de açúcares. Dióxido de carbono, um subproduto do metabolismo de carboidrato, combina com água para formar ácido carbônico, abaixando o pH. A utilização pelo fungo do nitrogênio dos nitratos de sódio e potássio tende a liberar bases, aumentando o pH. Com o sulfato de amônio ocorre o contrário, já que o fungo tende a liberar ácidos.

2.3.2 Temperatura

Os fungos podem ser divididos em três grupos, em termos de requerimento de temperatura: psicrófilos, suportam baixas temperaturas; mesófilos, crescem em temperaturas moderadas e termófilos, crescem em altas temperaturas. A maioria dos fungos é mesófila, crescendo numa faixa de 10°C a 35°C, com temperaturas ótimas entre 20°C e 30°C (Deacon, 1997).

O crescimento em altas temperaturas pode incapacitar o fungo de sintetizar uma vitamina requerida ou inativar a ação de enzimas,

impossibilitando até a sobrevivência micelial (Zheng & Shetty, 2000). A temperatura também é um dos fatores mais importantes para o crescimento de fungos, podendo ser diferente para o crescimento micelial e a frutificação. Um exemplo bem conhecido é o *Agaricus bisporus*, o qual requer temperatura de 25°C para o crescimento micelial e de 17°C para a formação dos corpos de frutificação.

2.3.3 Umidade

Todo fungo, como qualquer outro organismo, necessita de água para difusão de nutrientes nas células e para liberação de enzimas extra celulares. Substratos e enzimas, estão todos em solução aquosa ou suspensão coloidal, e nenhuma atividade enzimática pode ocorrer na ausência de água. O movimento de água dentro e fora das hifas, ocorre pela osmose, difusão em resposta ao gradiente de concentração através da membrana semipermeável (Griffin, 1994).

Para o crescimento ótimo do micélio do fungo no composto, o fator mais importante é o teor de água. O melhor crescimento do micélio ocorre quando o teor de água do composto está em torno de 55 a 70% (Flegg, 1987).

A umidade do ar é um fator extremamente importante para a frutificação, devendo ser mantida entre 80% e 90% para evitar a evaporação a partir do substrato e permitir o desenvolvimento do corpo de frutificação (Miles & Buswell, 1993). Os fatores físicos que atuam em conjunto com os requerimentos nutricionais para a obtenção do crescimento micelial, diferem dos usados para a frutificação.

2.3.4 Luz

A luz visível (comprimento de onda entre 380-720nm) tem relativamente pequeno efeito no crescimento somático das hifas, apesar de formar zonas de crescimento de alguns fungos em ágar na qual, essas zonas

circulares densas, muito ramificadas, crescem alternadamente com zonas menos densas. O zoneamento ocorre por que a luz inibe a extensão da ponta da hifa, no crescimento da superfície, prevalecendo ramificações densas (Deacon, 1997).

A luz influi diretamente sobre o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo dos fungos. Na primeira fase, os fungos preferem a obscuridade ou luz difusa para se desenvolverem, e, na segunda, procuram a luz para formar as frutificações. A maioria dos efeitos da luz nos fungos é mais efetiva sobre a esporulação do que sobre o crescimento micelial (Griffin, 1994). No caso da luz forte, poderá haver destruição de vitaminas e má formação de estruturas reprodutivas.

2.3.5 Fatores nutricionais

Considerando que os fatores nutricionais são muito importantes para o crescimento micelial e a produção de cogumelos, é interessante a avaliação de diferentes isolados quanto aos seus requerimentos nutricionais e crescimento em diferentes substratos. Isolados mais rústicos, que apresentam crescimento mais rápido e vigoroso, podem ser importantes num programa de seleção de linhagens para a produção de inoculantes comerciais.

2.3.5.1 Macroelementos essenciais

Moléculas orgânicas que nutrem qualquer organismo contêm grandes quantidades de carbono, hidrogênio e oxigênio, sendo consideradas macroelementos essenciais. Esses elementos são requeridos para sustentar o crescimento normal e o desenvolvimento fúngico porque fazem parte de componentes celulares e de enzimas envolvidas na sua sobrevivência. A obtenção de hidrogênio e oxigênio provém da água ou quando compostos orgânicos são metabolizados. Já o carbono provém principalmente de substratos orgânicos utilizados por fungos. Outros elementos são também requeridos pelos

fungos, como macronutrientes, entre eles o nitrogênio, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, ferro e fósforo (Griffin, 1994).

2.3.5.1.1 Carbono

Metade do peso seco de células fúngicas consiste de carbono, o que indica a importância funcional desse componente. Compostos orgânicos são usados na estrutura celular e também como fonte de energia através da sua oxidação. Os fungos podem utilizar uma ampla variedade de compostos orgânicos, que incluem carboidratos (mono, di, oligo e polissacarídeos), lipídeos, proteínas e ácidos orgânicos. No entanto, os carboidratos constituem a principal fonte de carbono (Landecker, 1996). Amido e celulose são amplamente utilizados como fontes de carbono pelos fungos (Miles & Buswell, 1993).

Tanto dissacarídeos como polissacarídeos são importantes fontes de carbono na natureza. Em reações catabólicas de respiração e fermentação, os polissacarídeos utilizados como nutrientes podem ser digeridos e seus constituintes assimilados (Kersten et al., 1999).

Os açúcares simples como a glicose e seus derivados produzem energia quando oxidados. Naffaa et al. (1998), ao trabalharem com fungos endofíticos de gramíneas, observaram que a maioria dos isolados apresentou crescimento mais rápido com altas concentrações de glicose (1% a 6%). Segundo os mesmos autores, esses monossacarídeos estão presentes no citoplasma em baixas concentrações quando comparados com outros organismos.

Os fungos produzem polissacarídeos que podem ser fonte de energia de reserva, como glicogênio e quitina, que ocorrem na maioria das paredes celulares fúngicas (Wannet et al., 2000).

2.3.5.1.2 Nitrogênio

De todos os nutrientes necessários ao desenvolvimento do fungo, o nitrogênio é requerido em grandes quantidades, podendo ser fator limitante para o crescimento do fungo em condições naturais. O nitrogênio é um elemento essencial para formação de aminoácidos, ácidos nucleicos, parede de polissacarídeos das células, fosfolípidos, vitaminas, e outros cofatores. Os fungos não fixam nitrogênio da atmosfera, como algumas bactérias, mas podem usar muitas outras formas de nitrogênio. Todos os fungos podem utilizar os aminoácidos como fonte de nitrogênio. Geralmente eles necessitam apenas de um aminoácido como o ácido glutâmico ou asparagina, a partir dos quais podem sintetizar os demais aminoácidos através da reação de transaminação (Griffin, 1994).

Muitos fungos podem utilizar a amônia como única fonte de nitrogênio, apesar de não ser considerada a fonte de nitrogênio ideal. Depois de assimilada, é combinada com ácidos orgânicos usualmente para produzir ácido glutâmico ou aspártico e os demais aminoácidos são produzidos por transaminação (Deacon, 1997).

Muitos fungos podem usar o nitrato como fonte de nitrogênio convertendo este para amônio através das enzimas nitrato redutase ou nitrito redutase. Muitos outros componentes nitrogenados são usados como fonte de nitrogênio por vários fungos (Deacon, 1997).

2.4 Translocação

Como as plantas superiores, os fungos também necessitam transportar materiais de uma parte do organismo para outras. Isto é óbvio em *A. bisporus*, em que o corpo de frutificação se desenvolve a uma certa distância do substrato. Já foi relatado o transporte de nutrientes em *Amillaria mellia* a uma distância de 90m. Os mecanismos de transporte nos fungos ainda não são bem entendidos e

vários mecanismos têm sido propostos, incluindo difusão, fluxo citoplasmático, passagem osmótica e transpiração em corpos de frutificação. Imagina-se que seja amplamente por fluxo de volume induzido por evaporação (Jennings et al., 1974, citados por Hammond & Wood, 1987).

2.5 Reprodução dos basidiomicetos

A reprodução assexuada se dá por meio da fragmentação do micélio (artrósporos) formando fragmentos de hifas, os quais sofrem divisões mitóticas alongando-se formando tramas e, conseqüentemente, um novo micélio. A reprodução sexuada (Figura 2) se inicia a partir da germinação de esporos monocarióticos formando hifas primárias não férteis (Alexopoulos et al., 1996). Essas hifas monocarióticas (micélio primário) de fatores sexuais diferentes se fundem formando hifas dicarióticas. As demais hifas subseqüentes se desenvolvem com dois núcleos por compartimento, uma de cada parental. O fungo pode então crescer por grande parte de sua vida como um micélio (emaranhado de hifas) dicariótico. Num estágio mais avançado, em resposta a condições específicas do ambiente, esse micélio se aprofunda numa complexa formação dando origem a um corpo de frutificação (basidiocarpo ou cogumelo). Neste são formadas células especiais chamadas de basídios (Figura 3), nas quais o dois núcleos se fundem (cariogamia), seguindo-se uma meiose para a produção de quatro esporos sexuais (basidiósporos). Quando os basidiósporos germinam, estes dão origem a uma hifa monocariótica novamente, formando assim um ciclo de vida (Deacon, 1997).

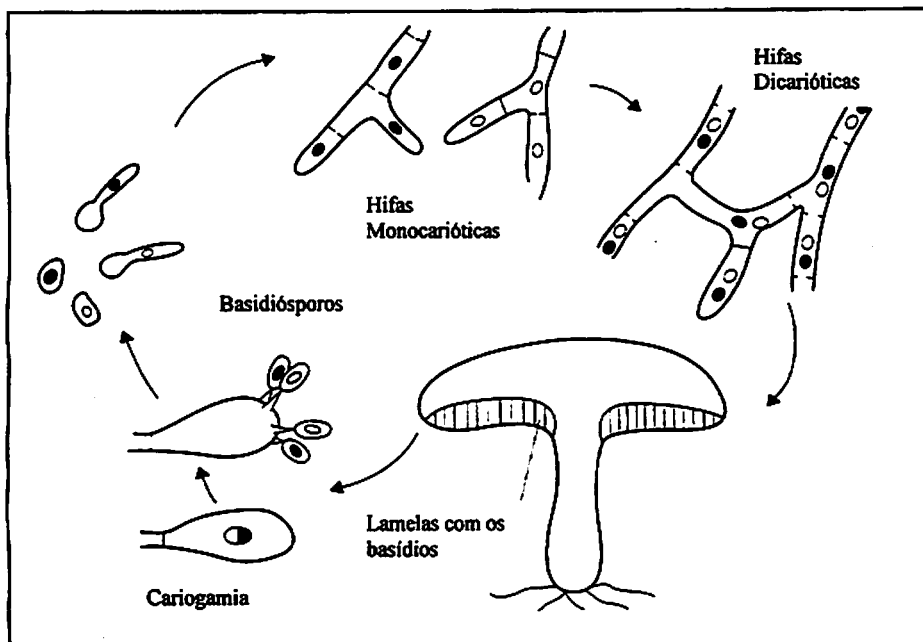


FIGURA 2 Ciclo de vida de um basidiomiceto (Deacon, 1997).

2.5.1 Variação genética

Uma forma conveniente de categorizar os sistemas de híbridos ou variação genética dos cogumelos é baseada na fertilidade do micélio derivada de esporos únicos. Nas espécies homotáticas, esporos individuais uninucleados e haplóides germinam produzindo uma hifa que é capaz de produzir corpos de frutificação (carpóforos). Portanto os esporos são autoférteis (Alexopoulos et al., 1996).

Nas espécies heterotáticas a fertilidade é controlada geneticamente, por meio de fatores sexuais. Neste caso, as hifas originárias de um único esporo haplóide uninucleado não são autoférteis. Micélio fértil é produzido entre a fusão de hifas geneticamente compatíveis. Após a fusão, os núcleos das hifas

interagidas coexistem em um citoplasma comum dando origem a um micélio dicariótico (Elliot, 1987).

Dos basidiomicetos já estudados, 90% são heterotálicos. Os 10% remanescentes compreendem as espécies homotálicas e as espécies cujo sistema de cruzamento ainda não está especificado (Raper, 1966).

2.5.2 Basídios e basidiósporos

Entre as microestruturas presentes na ordem Agaricales, encontram-se os basídios e basidiósporos (estruturas férteis) e cistídios (estruturas estéreis). Os basídios geralmente são em forma de clava, sobre os quais se formam os esporos exógenos (basidiósporos). Na ordem Agaricales, o basídio é tipicamente um holobasídio, ou seja, monocelular (Urban et al., 2001). Esta característica coloca a ordem Agaricales, segundo Alexopoulos et al. (1996), dentro da classe Basidiomycetes, na subclasse Holobasidiomycetidae II (Hymenomycetes II).

Os basídios são dicarióticos e possuem dois núcleos haplóides. O núcleo se funde formando um novo núcleo diplóide (cariogamia) que é submetido à meiose. Usualmente, quatro basidiósporos uninucleados são produzidos em cada basídio. Apesar de os basidiósporos se desenvolverem diretamente sobre a superfície do basídio, eles são produzidos sobre uma projeção alongada denominada esterigma. Cada esterigma sustenta um basidiósporo no seu ápice (Figura 3) (Kemp, 1980; Kües, 2000).

Os núcleos migram para o interior de cada basidiósporo inicial. Os microtúbulos citoplasmáticos devem ser responsáveis pela migração nuclear, bem como para migração de outras organelas. Finalmente, o citoplasma contido no basidiósporo é separado pelo esterigma (Figura 3) (Kemp, 1980, Kües, 2000).

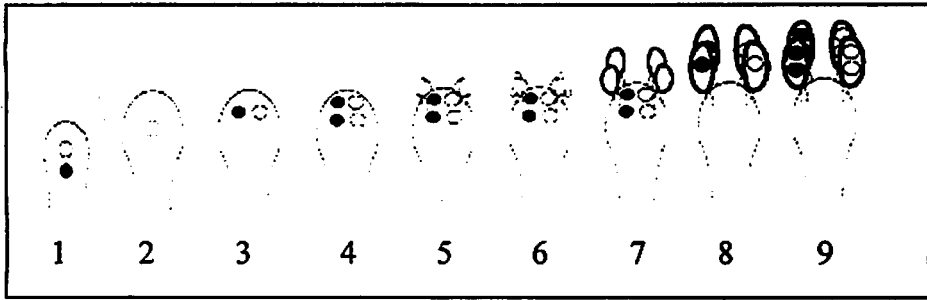


FIGURA 3 Cariogamia, meiose e formação do basidiósporo (Kües, 2000).
 1: basídio dicariótico; 2: cariogamia; 3: meiose I; 4: meiose II;
 5: formação dos esterigmas; 6 e 7: início e maturação dos esporos;
 8: migração nuclear; 9: mitose pós-meiótica.

Os basidiósporos dos Agaricales apresentam formas, tamanhos e ornamentações variados. Tais características são importantes na taxonomia dos membros da ordem, sendo um dado importante na identificação de gêneros, conforme descrito por Singer (1975). Os basidiósporos dos Agaricales têm paredes espessas, que são formadas em multicamadas, podendo ou não possuir uma região de poros germinativos definida (Urban et al., 2001).

Normalmente são encontrados quatro basidiósporos formados no ápice do basídio, sendo que cada basidiósporo recebe um único núcleo haplóide. Em algumas espécies, o núcleo pode sofrer uma divisão mitótica de modo que cada basidiósporo possa apresentar dois núcleos (Figura 3) (Kües, 2000). Na espécie *Agaricus bisporus* são formados, normalmente, dois basidiósporos apenas, os quais recebem dois núcleos ao final do processo (Chang & Hayes, 1978).

Os basidiósporos possuem usualmente um único núcleo haplóide. Quando o basidiósporo germina, inicia-se uma hifa haplóide monocariótica. O núcleo contido no interior do tubo germinativo se divide, conseqüentemente, o septo é formado separando os núcleos irmãos. Inicialmente a hifa é não

septada, mas depois torna-se septada formando células uninucleadas. Essa fase do ciclo de vida é geralmente de curta duração. Ocorre então a plasmogamia, onde há fusão de duas hifas homotáticas. Quando elas se fundem, o núcleo de uma delas flui para dentro da outra. O novo núcleo move-se até parar numa nova posição. A hifa passa a possuir núcleos geneticamente diferentes, tornando-se, assim, dicariótica. Cada célula desse dicarioto possui, dessa forma, dois núcleos haplóides. O dicarioto formado após a plasmogamia continua se desenvolvendo, mantendo a condição binucleada (Kües, 2000).

2.5.3 Grampo de conexão

Geralmente, o grampo de conexão é formado para manter a condição dicariótica e heterocariótica da hifa. Os grampos jovens são inicialmente formados como um broto na parede da hifa entre os dois núcleos diferentes. Ambos os núcleos se dividem mitoticamente. A divisão do núcleo se dirige obliquamente na direção do grampo e se completa quando um núcleo se mantém na posição anterior e o outro na parte terminal do grampo formado. O segundo núcleo da célula mãe também se divide, e um dos núcleos se estende para a parte axial da hifa e o núcleo de origem se mantém na porção terminal, ficando os dois novos núcleos próximos. O grampo se recurva e entra em contato com a célula uninucleada e a parede entre eles é dissolvida. O núcleo do grampo migra para a célula da hifa, reconstituindo a condição dicariótica. Um septo é formado separando a nova célula binucleada formada. O grampo passa a ser parte permanente da hifa e passa a ser usado como evidência morfológica de que a hifa é dicariótica (Kües, 2000).

O novo micélio dicariótico formado se aprofunda no substrato onde obtém os nutrientes. Quando as condições são favoráveis para a reprodução, alguns dos micélios dicarióticos se aprofundam numa complexa morfogênese para formar o basidioma (cogumelo visível). Todo o micélio do basidioma

(basidiocarpo) é do mesmo tipo, em contraste com alguns ascomicetos, dos quais dois tipos distintos de sistema micelial fazem parte da formação do ascoma. Dentro do basidioma, algumas das células em tecidos estéreis mantêm-se binucleadas, enquanto outras se formam multinucleadas, dependendo da espécie (Landecker, 1996).

2.6 Caracterização citológica

A visualização de fenômenos celulares, tais como a caracterização citológica e morfológica dos basídios, basidiósporos e hifas, número de núcleos, sua divisão e migração, entre outras características, podem ser muito facilitados com o uso da microscopia.

A solução de Giemsa, um corante com características específicas de reação ácido base, extensivamente usado em estudos de núcleo tanto em interfase quanto em divisão celular, é muito utilizado em microscopia de luz branca, facilitando estudos citológicos e citogenéticos para a melhor compreensão de espécies ainda pouco conhecidas. A grande vantagem da utilização da solução de Giemsa é a sua pouca especificidade, tornando possível visualizar septos e núcleos bem definidos em hifas de fungos.

A utilização de fluorocromos vitais tais como DAPI (4', 6 Diamidino, fenilindoldihidroclorídrico) permitem a análise *in vivo* dos fenômenos celulares, além de oferecerem outras vantagens, como a economia de tempo, dispensando-se fixações e pré-tratamentos (Gilroy, 1997).

O estudo do comportamento nuclear fornece uma importante definição tanto para as análises genéticas quanto para a compreensão do ciclo de vida dos fungos. Materiais citológicos podem ser preparados para observação da distribuição e divisão do núcleo, ilustrando o potencial da microscopia de luz e da fluorescência para investigação cariológica (Chang & Hayes, 1978).

A microscopia de fluorescência e o uso de fluorocromos têm vantagens sobre o microscópio de luz branca porque o uso de diferentes cores sobre um fundo preto permite uma melhor definição de algumas estruturas. Os fluorocromos vitais também permitem ver o movimento de organelas e migrações que ocorrem entre compartimentos celulares (Haugland, 1996). Normalmente, apresentam também excelente contraste para a visualização das células a serem coradas, podendo ser utilizados com sucesso em outros fungos (Galbraith, 1984; Nelson, 1994).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4.ed. New York: J. Wiley and Sons, 1996. 866p.
- BOBEK, P.; GALBAVY, S. Hypocholesterolemic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbit. *Nahrung*, v.43, n.5, p.339-342, 1999.
- BOBEK, P.; OZDYN, L.; KUNIAK, L. The effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) its ethanolic extract and extraction residues on cholesterol levels inserum lipoproteins and liver of rats. *Nahrung*, v.39, p.98-99, 1995.
- BRAGA, G.C.; EIRA, A.F. **Cultivo de cogumelo do sol**. Viçosa: CPT, 1997. 60p.
- ◊ CHANG, S.T. A citological study of spore germination of *Volvariela volvacea*. *Botanical Magazine*, v.82, p.102-109, 1969.
- CHANG, S.T.; HAYES, W.A. **The biology and cultivation of edible mushrooms** New York, Academic, 1978. 819p.
- COLLINS R.A.; SAVILLE, B.J. Independent transfer of mitochondrial chromosomes and plasmids during unstable vegetative fusion in *Neurospora*. *Nature*, London, v.345, n.6271, p. 177-179, May 1990.
- ◊ DEACON, J.W. **Modern mycology**. 3rded. Cambridge: University Cambridge, 1997, 303p.
- ELLIOT, T.J. The genetics and breeding of species of *Agaricus*. In: **The Biology and the technology of the cultivated mushroom**. Dorchester: Jonh Wiley & Sons Ltd, 1987. p. 9-22.
- FLEGG, P.B.; SPENCER, D.M.; WOOD, D.A. **The Biology and Technology of the Cultivated Mushroom** Dorchester: Jonh Wiley & Sons Ltd, 1987 347p..

FIDALGO, O.; FIDALGO, M.E.P.K. **Dicionário micológico**. São Paulo: Instituto de Botânica/Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, 1967. 235p.

GALBRAITH, D. W. Selection of somatic hybrid cells by fluorescence-activated cell sorting. In: VASIL, I. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Orlando: Academia, 1984. v.1, p.433-447.

GILROY, S. Fluorescent microscopy of living cells. **Annual Review of Plant Physiological and Plant Molecular Biology**, v.48. p.165-190, 1997.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 425 p.

GRIFFITHS, A.J.F. Natural plasmids of filamentous fungi. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, n.4, p.673-685, 1995.

HAMMOND, J.B.W.; WOOD, D.A. Metabolism, biochemistry and physiology. In: **The biology and the technology of the cultivated mushroom**. Great Britain: John Wiley & Sons Ltd, 1987. p.63-80.

HAUGLAND, R.P. **Handbook of fluorescent probes and research chemicals**. 6ed. Eugene, OR, USA: Molecular Probes, 1996.

INOUE, S. et al. Role of fungal dynein in hyphal growth, microtubule organization, spindle pole body motility and nuclear migration. **Journal Cell Science**, v.111, p.1555-1566, 1998.

ITO, H. et al. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanism in tumor-bearing mice. **Anticancer Research**, v.17, n.1A, p. 277-284, 1997.

ITOH, H. et al. Inhibitory action of a (1→6)-beta-D-glucan protein complex (F III-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murril ("Himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.66, n.2, p.265-271, 1994.

KAWAGISHI, H. et al. Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. **Carbohydrate Research**, v.183, n.1, p.150-154, 1988.

KAWAGISHI, H. et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, v.186, n.2, p.267-273, 1989.

KEMP, R.F.O. A heterothallic species of *Coprinus* related to *C.serquilinus* with clamp connexions on homokaryotic and dikaryotic mycelia. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v.74, p.411-418, 1980.

KERSTEN, M. A. S. H. et al. Transport of amino acids and ammonium in mycelium of *Agaricus bisporus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1428, n.2/3, p.260-272, Aug. 1999.

KÜES, U. Life history and Developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.2, p.316-353, June 2000.

● LANDECKER, E. M. **Fundamentals of the fungi**. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, Upper Saddle River, 1996. 574p.

MILES, P. G.; BUSWELL, J. A. **Genetics and breeding of edible mushrooms**. Hardcover: Gordon and Breach Publishing Group, 1993. 329p.

NAFFAA, W.; RAVEL, C.; GUILLAUMIN, J. J. Nutritional requirements for growth of fungal endophytes of grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.44, n.4, p.321-237, Apr. 1998.

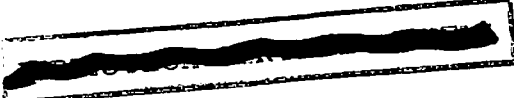
NELSON, B.D. Vital staining of fungal nuclei with the bis-benzimidazole fluorochrome Hoescht 33342. **Phytopathology**, v.84, p.1125, 1994.

OAKLEY, B.R.; MORRIS, N.R. Nuclear movement is β -tubulin dependent in *Aspergillus nidulans*. **Cell**, v.19, p.255-262, 1980.

OSAKI, Y.; KATO, T.; YAMAMOTO, K. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*, Jun-17. **Yakugaku Zasshi**, v.114, n.12, p.342-350, 1994.

PARTON, R.M.; FISCHER, S.; MALHÓ, R. et al. Pronounced cytoplasmic pH gradients are not required for tip growth in plant and fungal cells. **Journal of Cell Science** v.110, p.1187-1198, 1997.

PEGLER, D.N. **Agaric Flora of the Lesser Antilles**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1983. 668p.


PLAMANN, M. et al. Cytoplasmic dynein and actin related protein *Arp1* are required for normal nuclear distribution in filamentous fungi. **Journal Cell Biology**, v.127, p.139-149, 1994.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. Os reinos dos fungos. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998. 606p.

① RAPER J.R. Genetics of sexuality in higher fungi. New York: Ronald, 1966.

SINGER, R. The agaricales in modern taxonomy Weinheim: J. Cramer, 1975. 912p.

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

THAT, T.C. et al. Induction of multiple germ tubes in *Neurospora crassa* by antitubulin agents. **European Journal Cell Biology**, v.46, p.68-79, 1988.

URBEN, A.F. et al. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 151p.

URYU, E.N. *Agaricus blazei*: cogumelo medicinal. Sorocaba: CATI, 1995. 25p. (Apostila).

WANNET, W. J. B. et al. Trehalose and mannitol metabolism in *Agaricus bisporus*. Science and cultivation of edible fungi. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 15., 2000, Maastricht, Netherlands. Proceeding... Maastricht, Netherlands: 2000. p. 63-67.

XIANG, X.; BECKWITH, S.M.; MORRIS, N.R. Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. **Proc. Natl. Acad. Science, USA**, v.91, p.2100-2104, 1994

ZHENG, Z. X.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, Oxford, v.35, n.8, p. 825-830, Mar. 2000.

CAPÍTULO 2

CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE

Agaricus blazei

RESUMO

LABORY, Cláudia Regina Gontijo. Condições de crescimento de *Agaricus blazei*. In: ____ Avaliação citológica e condições de crescimento de *Agaricus blazei*. 2003. Cap.2, p.23-40. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.*

O cogumelo *Agaricus blazei* se tornou conhecido devido às suas propriedades medicinais. Apesar de sua grande importância, pouco se conhece a respeito de sua fisiologia de crescimento. Este trabalho objetivou estabelecer as melhores condições de crescimento dos isolados de *A. blazei* (CS₁, CS₂, CS₄, CS₅, CS₆ e CS₇) em diferentes substratos: a) constituído de arroz em casca +10% de farelo de trigo (inoculante comercial); b) constituído de bagaço de cana + capim Coast Cross (composto de cultivo) e em meios de cultura sintéticos (BDA, MMN, MBC - meio básico completo e MEC - meio extrato de composto). Para avaliação do efeito do pH, foram utilizados os meios BDA e MEC nos pH 5,0; 5,5; 6,0; 7,0 e 8,0. Para avaliação do efeito de temperatura, foi utilizado o isolado CS₆ de *Agaricus blazei* em MBC nas temperaturas de 17°C, 20°C, 23°C e 28°C e a avaliação realizada com base no crescimento micelial em mm/dia. Dos meios de cultura testados, o BDA foi o que proporcionou o maior crescimento micelial, porém, observando o aspecto da colônia, verificou-se que o meio obtido do composto de cultivo (MEC) apresentou um crescimento mais uniforme, sugerindo uma maior estabilidade fisiológica da cultura. Em meio BDA, os isolados não diferiram estatisticamente quanto aos pH testados, exceto para o isolado CS₅, no qual os pH 6,0 e 7,0 proporcionaram um maior crescimento micelial. Em meio MEC, os pH 5,0; 5,5 e 6,0 proporcionaram os melhores crescimentos para os isolados CS₁ e CS₇. Quanto à temperatura, verificou-se que o crescimento micelial só foi comprometido em temperatura abaixo de 21°C, não havendo diferença estatística nas temperaturas de 23°C e 28°C. O meio MEC mostrou-se o mais indicado para a produção da matriz primária de *A. blazei* em função da estabilidade da cultura. Os isolados CS₁, CS₄ e CS₅ foram os mais rápidos na colonização do meio de cultura e no substrato constituído de arroz + farelo de trigo. No composto de cultivo, todos os isolados apresentaram o mesmo desempenho. Estudos quanto a produtividade deverão indicar quais isolados são de fato os mais indicados para produção de inoculante comercial.

*Comitê orientador: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Professora orientadora), Eustáquio Souza Dias - UFLA; Lisete Chamma Davide - UFLA.

ABSTRACT

LABORY, Cláudia Regina Gontijo. Growing condition of *Agaricus blazei*. In : _____ **Cytological evaluation and growing condition of *Agaricus blazei***. 2003. Cap.2, p.23-40. Thesis (Doctorate in Food Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.*

The mushroom *Agaricus blazei* became known due to its medicinal properties. Despite its great importance, little is known about its physiology of growth. This work aimed to establish the best growing conditions to strains of *A. blazei* (CS₁, CS₂, CS₄, CS₅, CS₆ and CS₇) in different substrate: a) constituted of rice tight plus 10% of middling wheat (spawn); b) constituted of cane bagasse plus Coast-cross hay (cultivation compost); c) synthetic culture medium (BDA, MMN, MBC – complete basic medium and MEC – compost extrate medium). To evaluate the pH effect on fungal growth were used the BDA and MEC medium in pH 5,0; 5,5; 6,0; 7,0 and 8,0. To evaluate the temperature effect on fungal growth, it was used the CS₆ strain of *A. blazei* in MBC in temperatures of 17°C, 20°C, 23°C and 28°C and the evaluation was based in the mycelium growth in mm per day. Among the culture medium tested, BDA promoted the major mycelium growth, nevertheless, observing colonial aspects, it was observed that the medium obtained of the culture compound (MEC) presented the most steady growth, suggesting a culture with better physiologic stability. In BDA medium, the strains do not show statistical difference in the tested pH, except the CS₅, in which the pH 6,0 and 7,0 promoted the major mycelium grown. In MEC medium, the pH 5,0; 5,5; and 6,0 promoted the best mycelium growth for CS₁ and CS₇ strains. It was verified that the mycelium growth was only affected when incubated at temperature under 21°C, not having statistical difference in incubation at the temperatures of 23°C and 28°C. The MEC medium showed to be, between those evaluated, the most suitable medium for primary matrix production of *A. blazei* due culture stability while strains CS₁, CS₄ and CS₅ showed the fastest colonization of both culture compost and substrate made of rice plus middling wheat. In the culture compost, all strains presented similar performance. Further studies on productivity are required in order to identify the isolate most suitable for spawn production.

*Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Major Professor), Eustáquio Souza Dias – UFLA; Lisete Chamma Davide – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O cogumelo *Agaricus blazei*, nativo do Brasil, vem se destacando cada vez mais pelas suas propriedades nutricionais e medicinais. Apesar de sua grande importância e perspectiva de utilização, pouco se conhece a respeito de sua fisiologia de crescimento. Adaptações a partir do cultivo de cogumelos do gênero *Agaricus* vêm servindo de base para o aprendizado e estabelecimento das melhores condições para o cultivo do *A. blazei* (Braga & Eira, 1999).

O cultivo desses cogumelos é feito em substrato obtido a partir de um processo de compostagem, o qual tem o propósito de gerar características favoráveis ao crescimento micelial do cogumelo e desfavoráveis a microrganismos contaminantes (Fermor et al., 1987). Durante a compostagem algumas propriedades físico-químicas são desenvolvidas, as quais são importantes e interdependentes. O composto deve apresentar uma estrutura que favoreça a sua aeração e a manutenção da umidade sem excesso. Além de um pH adequado, o estado químico do composto deve ser tal que os nutrientes necessários para o cogumelo sejam acumulados e disponibilizados durante a colonização e depois durante a frutificação. Nesse caso, a qualidade do substrato e as condições físico-químicas do meio de crescimento são fatores determinantes para o sucesso da produção (Griffin, 1994).

Este trabalho objetivou estabelecer as melhores condições físico-químicas de cultivo dos isolados de *A. blazei* em diferentes substratos e em meios de cultura sintéticos, selecionando os isolados com potencial de utilização como inoculante comercial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados

Os isolados de *A. blazei* testados, CS₁, CS₂, CS₄, CS₅, CS₆ e CS₇, foram adquiridos de diferentes regiões do Brasil fazendo parte da coleção de fungos do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais do Setor de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras e mantidos em meio batata dextrose ágar (BDA) à temperatura ambiente.

2.2 Meios de cultivo

Os seis isolados de *A. blazei* foram testados nos seguintes meios de cultivo: meios sintéticos laboratoriais (BDA, MBC e MMN) e meio constituído pelo extrato de composto de cultivo (MEC).

O meio BDA foi preparado utilizando o extrato de 200g de batata cozida em um litro de água destilada, ao qual adicionaram-se 15g de dextrose e 13g de ágar microbiológico.

O MBC (Meio básico completo) foi preparado com 10g de glicose, 1g de peptona, 1g de extrato de levedura, 1g de KH₂PO₄, 0,5g de MgSO₄. 7H₂O, 1g de (NH₄)₂SO₄, 0,5g de CaCl₂ e 13g de ágar microbiológico.

Para o preparo do MEC (Meio extrato de composto), foi utilizado um litro de extrato do composto, 10g de dextrose e 13g de ágar microbiológico. O extrato do composto foi obtido triturando-se por 5 minutos, 200g de composto já fermentado e pasteurizado em água destilada, foi coado em gaze e descartado o resíduo. O volume foi completado para um litro, obtendo-se dessa forma o MEC pH 8,0 (pH natural do extrato). Para se obter o MEC pH 5,5 o pH do meio foi corrigido adicionando-se HCl 0,1M.

O meio MMN (Meio Melin Norkans) consistiu de: 1,32g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5g de NaCl; 10g de KH_2PO_4 ; 5g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 3g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3mL de citrato férrico (1%); 0,25 mL de tiamina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3g de extrato de malte; 10g de glicose e 13g de ágar para 1 litro de meio. A tiamina foi esterilizada por filtração em membrana milipore (0,22 μm) e adicionada depois da esterilização do meio em autoclave. O citrato férrico só foi adicionado depois de corrigido o pH para 5,5. Todos os meios de cultura testados foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

A avaliação do crescimento micelial nos meios sintéticos, em placas de Petri, foi realizada pela medição do raio das colônias. Cada placa recebeu um disco de 6mm contendo micélio obtido de placas matrizes de aproximadamente 14 dias de incubação. As placas inoculadas foram incubadas a 25°C em câmara de crescimento. O período de incubação foi determinado pelo isolado de crescimento mais rápido, até que atingisse próximo do bordo da placa e medidos com auxílio de um paquímetro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições para cada tratamento. Os dados foram transformados e avaliados em mm/dia.

2.2.1 Avaliação dos isolados nos meios BDA e MEC em diferentes pH

Com o propósito de se estabelecer o melhor pH entre os melhores meios de crescimento (BDA e MEC), foram testados cinco diferentes pH: 5,0; 5,5; 6,0; 7,0 e 8,0. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições para cada tratamento.

Para o preparo do meio MEC, foram seguidos os mesmos procedimentos do item 2.2, com exceção da concentração do extrato, no qual foram utilizados 500g de composto/L para a preparação do meio de cultura.

2.3 Avaliação do efeito da temperatura

Foram utilizados o isolado CS₆ de *A. blazei* e o isolado *Agaricus bisporus* para a avaliação do efeito de temperatura no crescimento micelial. Utilizou-se o meio MBC em placas de Petri testando quatro temperaturas: 17°C, 20°C, 23°C, 28°C além da temperatura ambiente (TA), cuja média foi de 21,5°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada tratamento.

2.4 Avaliação dos isolados em substrato para inoculante comercial

Inoculante comercial consiste no substrato utilizado para crescimento micelial do *A. blazei*, devendo possuir as melhores condições de preservação e ausência de contaminação do inóculo a ser comercializado. Geralmente este é constituído de grãos de cereais mais aditivos, para facilitar a inoculação do fungo no composto de cultivo (item 2.5).

O inoculante comercial foi constituído de arroz em casca enriquecido com 10% de farelo de trigo. O arroz em casca foi imerso por 12 horas em água e posteriormente cozido por 30 minutos, contados a partir da fervura. O farelo de trigo foi umedecido e autoclavado por uma hora e então misturado ao arroz já previamente cozido. A mistura foi autoclavada por uma hora a 121°C.

A avaliação do crescimento micelial no inoculante comercial, em frascos de vidro de 500mL, foi realizada com a medição da colonização do micélio no meio. Cada vidro recebeu 10g de inóculo matriz com aproximadamente 30 dias de incubação. Os vidros inoculados foram incubados à temperatura ambiente. O período de incubação foi determinado pelo crescimento do isolado que atingisse primeiro o fundo do vidro. O crescimento micelial foi medido com auxílio de um paquímetro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada tratamento.

2.5 Avaliação dos isolados em composto de cultivo

Para o preparo do composto de cultivo, foram utilizados 50kg de bagaço de cana triturado e 50 kg de feno de capim Coast-Cross. A pilha foi montada utilizando apenas o bagaço de cana de açúcar e o feno, com água em abundância. Na primeira revirada, após dois dias, foram acrescentados como aditivos farelo de trigo (10%), cloreto de potássio (1%), super fosfato simples (1%), calcário (2%) e gesso (2%). A compostagem durou 21 dias, com reviradas a cada dois dias para melhor homogeneidade da compostagem.

Em seguida, o composto foi colocado numa câmara de pasteurização, onde recebeu vapor fluente por 24 horas. Cada parcela consistiu de 1kg do material pasteurizado acondicionado em sacos de polipropileno, tendo sido inoculados com 10g de inoculante. Os sacos inoculados foram incubados à temperatura ambiente. O período de incubação foi determinado pelo crescimento do isolado que atingisse primeiro o fundo do saco. O crescimento micelial foi medido com auxílio de um paquímetro e os dados foram transformados em mm/dia. O delineamento experiencial foi inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada tratamento.

O crescimento micelial no composto foi realizado em sacos de polipropileno 0,13 μ m, adotando-se os mesmos critérios de inoculação e avaliação utilizados nos frascos de vidro (item 2.4).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Meios de cultura testados

De acordo com as médias de crescimento micelial mostradas na Tabela 1, o meio BDA foi superior aos demais meios de cultura testados, apresentando o maior crescimento micelial em mm/dia. Os meios MEC pH 5,5 e MBC não apresentaram diferença estatística entre si e foram superiores ao MMN.

O crescimento micelial em meio de cultura sintético utilizando placas de Petri é uma etapa importante para a manutenção de isolados de *A. blazei* e conservação das características fisiológicas e morfológicas como o vigor, o aspecto cotonoso e a velocidade de crescimento. Dos meios testados, o BDA foi o que proporcionou crescimento mais rápido, no entanto, verificou-se que o MEC possibilitou um crescimento mais uniforme da colônia. Isso pode significar que o MEC proporciona melhores condições fisiológicas para o crescimento do fungo. Sendo assim, é possível que esse meio seja mais indicado para a manutenção da cultura em placas. À princípio o MEC foi preparado utilizando-se 200g de composto para 1 litro de meio, no entanto, o crescimento micelial foi rarefeito. Por isso, passou-se a utilizar 500g de composto para um litro de meio, o qual proporcionou um crescimento micelial mais vigoroso.

O BDA é um meio clássico para o cultivo de fungos, sendo considerado um meio rico que pode apresentar a desvantagem de inibir a esporulação de algumas espécies de fungos (Smith & Onions, 1983). O *A. blazei*, como é comum nos basidiomicetos, é uma espécie que não produz esporos em meio de cultura em condições normais e também não se tem conhecimento de que a espécie possua uma reprodução assexuada. Por isso, o cultivo desse fungo em placas, visa tão somente a produção de micélio como pré-inóculo a ser utilizado em cultivos subsequentes ou como matriz primária para a produção de

inoculante. Considerando tudo isso, o BDA poderia ser um bom meio para este fim, entretanto, a melhor escolha deverá levar em conta a estabilidade fisiológica da cultura após ciclos sucessivos de cultivo. Portanto, novos estudos deverão ser conduzidos para avaliar esse parâmetro, comparando o BDA e o MEC, sendo que a maior limitação do último é a disponibilidade do composto a qualquer tempo no laboratório, ao contrário do BDA, cujos ingredientes são de fácil acesso.

O isolado CS₄ superou estatisticamente os demais isolados testados (Tabela 1) e obteve igual crescimento micelial nos meios BDA e MBC, enquanto que os isolados CS₂ e CS₆ apresentaram o pior desempenho nos meios citados. Para a produção comercial de inoculante, é interessante a utilização de um isolado que apresente rápido crescimento em meio de cultura para a multiplicação da matriz primária.

TABELA 1 Avaliação do crescimento micelial de isolados de *Agaricus blazei* (mm/dia) testados em diferentes meios de cultura.

Meios	CS ₁	CS ₂	CS ₄	CS ₅	CS ₆	CS ₇	Médias*
BDA	4,33 a	3,82 a	5,66 a	3,89 a	3,84 a	5,18 a	4,45 a
MECpH8,0	3,99 a	3,34 a	5,38 a	3,85 a	2,84 b	4,36 a	3,96 b
MECpH5,5	3,32 b	3,46 a	4,11 b	3,36 a	2,82 b	3,82 b	3,48 c
MBC	2,86 b	1,87 b	5,02 a	3,17 a	2,05 b	4,73 a	3,28 c
MMN	3,27 b	1,51 b	4,30 b	3,77 a	2,40 b	3,04 c	3,05 d
MÉDIAS*	3,55 C	2,80 D	4,89 A	3,61 C	2,79 D	4,22 B	

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam as médias nas colunas e as letras maiúsculas comparam as médias na linha.

3.2 Meio BDA em diferentes pH

Dos isolados testados apenas o CS₅ apresentou diferença estatística entre os pH, sendo que o melhor crescimento micelial ocorreu nos meios com pH 6,0 e 7,0. Para os demais isolados, o pH não influenciou significativamente o crescimento micelial (Tabela 2). De modo geral os fungos mais comuns crescem bem numa faixa de pH entre 3 e 7, apesar de alguns necessitarem de pH mais extremos (Smith & Onions, 1994).

3.3 Meio MEC com diferentes pH

No MEC observou-se um maior efeito do pH sobre o crescimento micelial dos isolados. Apenas os isolados CS₂ e CS₄ não apresentaram diferença de crescimento em função do pH. Todos os demais apresentaram pelo menos um valor de pH que foi menos favorável ao crescimento micelial. Para os isolados CS₁ e CS₇, o melhor crescimento ocorreu no pH 5 a 6, enquanto que para o isolado CS₆ o pH 5 foi o que proporcionou o menor crescimento (Tabela 3).

TABELA 2 Avaliação do crescimento micelial de isolados de *Agaricus blazei* (mm/dia) em meio BDA sob diferentes pH.

pH	CS ₁	CS ₂	CS ₄	CS ₅	CS ₆	CS ₇	Médias*
5,0	2,54 a	2,82 a	3,41 a	2,86 b	3,19 a	3,12 a	2,99 a
5,5	2,18 a	2,82 a	2,91 a	2,71 b	3,75 a	3,29 a	2,94 a
6,0	2,79 a	3,29 a	3,16 a	3,82 a	3,08 a	3,17 a	3,22 a
7,0	2,90 a	2,95 a	3,49 a	3,88 a	3,29 a	3,21 a	3,29 a
8,0	2,31 a	3,58 a	3,52 a	3,21 b	3,18 a	3,20 a	3,17 a
MÉDIAS*	2,54 B	3,09 A	3,30 A	3,29 A	3,30 A	3,20 A	

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam as médias nas colunas e as letras maiúsculas comparam as médias na linha.

TABELA 3 Avaliação do crescimento micelial de isolados de *Agaricus blazei* (mm/dia) em meio MEC sob diferentes pH.

pH	CS ₁	CS ₂	CS ₄	CS ₅	CS ₆	CS ₇	Médias*
5,0	4,04 a	3,22 a	3,65 a	3,84 a	3,21 b	3,83 a	3,65 a
5,5	4,10 a	3,17 a	3,64 a	3,88 a	3,47 a	4,04 a	3,64 a
6,0	3,97 a	3,28 a	3,68 a	3,99 a	3,45 a	3,98 a	3,68 a
7,0	3,75 b	3,09 a	3,83 a	3,92 a	3,50 a	3,58 b	3,83 a
8,0	3,59 b	3,23 a	3,59 a	3,67 b	3,40 a	3,67 b	3,59 a
MÉDIAS*	3,89 A	3,20 D	3,68 B	3,86 A	3,40 C	3,82 A	

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam as médias nas colunas e as letras maiúsculas comparam as médias na linha.

Esses resultados demonstram que os diferentes isolados respondem de forma diferente ao pH do meio à base de composto. A literatura relata que o pH do composto de cultivo para os cogumelos *Agaricus* deve ser em torno de 8. No entanto, para três dos isolados testados (CS₁, CS₅ e CS₇), o pH 8 foi o que proporcionou menor crescimento micelial. Com isso, dependendo do isolado a ser selecionado para a produção de inoculante, será interessante avaliar o efeito do pH do composto de cultivo sobre o crescimento micelial do fungo e sobre a sua frutificação.

3.4 Efeito da temperatura

De acordo com os resultados da Tabela 4, as temperaturas que proporcionaram melhor crescimento micelial para o *A. blazei* isolado CS₆ foram 23°C, 28°C e temperatura ambiente (TA), não diferindo estatisticamente entre si.

TABELA 4 Avaliação do crescimento micelial do isolado CS₆ de *Agaricus blazei* e do *Agaricus bisporus* (mm/dia) em meio MBC, submetido a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Médias (mm/dia)*	
	<i>A. blazei</i> (CS ₆)	<i>A. bisporus</i>
28	4,79 a	2,43 a
23	4,59 a	2,38 a
TA (21,5)	4,45 a	2,23 b
20	2,65 b	1,97 c
17	1,50 c	1,77 d

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Como pode ser observado, à temperatura de 28°C o *A. blazei* cresceu quase duas vezes mais que o *A. bisporus*, o mesmo ocorrendo a 23°C e à temperatura ambiente. À temperatura de 20°C o crescimento do *A. blazei* é ligeiramente superior ao do *A. bisporus*, enquanto que na temperatura de 17°C o comportamento do crescimento do *A. bisporus* foi superior ao do *A. blazei*. Esses resultados confirmam que as melhores temperaturas de crescimento para o *A. blazei* variam de 21°C a 28°C e que para o *A. bisporus*, mesmo necessitando de baixas temperaturas para frutificação, prevalecem temperaturas mais elevadas para o seu crescimento micelial. O crescimento na temperatura ambiente foi feito com o objetivo de avaliar o efeito da oscilação da temperatura sobre o crescimento micelial do fungo, considerando que durante o dia a temperatura ambiente ficou em torno de 25°C e à noite a mesma ficou normalmente abaixo de 20°C. No entanto, o crescimento micelial foi estatisticamente igual quando comparado com o obtido nas temperaturas de 23°C e 28° C.

Relatos de crescimento micelial para produção de inóculo demonstram que a temperatura ideal de crescimento do micélio é de 28°C a 30°C para *A.*

bitorquis e média de 24°C para *A. bisporus* (Raper, 1978). Os resultados deste trabalho mostraram que o *A. blazei* apresentou melhor crescimento nas temperaturas de 23°C e 28°C (Tabela 4). Esses resultados não permitem afirmar se temperaturas mais altas podem ou não ser favoráveis. Portanto, em experimentos futuros devem ser testadas temperaturas acima de 28°C para se verificar o efeito de temperaturas mais elevadas sobre o seu crescimento, principalmente porque é comum a afirmação na literatura e entre produtores de que a temperatura ótima de crescimento do *A. blazei* no composto de cultivo está entre 23°C e 28°C. A confirmação dessa informação, mesmo que em condições de cultivo “in vitro” será importante para trazer um pouco mais de conhecimento sobre a natureza desse fungo.

3.5 Velocidade de crescimento em substrato para inoculante comercial

No substrato utilizado para produção de inoculante (arroz em casca + farelo de trigo), os isolados CS₁, CS₄ e CS₅ não diferiram estatisticamente entre si, apresentando um crescimento micelial (mm/dia) superior aos demais isolados (Tabela 5). O isolado CS₇, que havia apresentado melhor crescimento micelial em meios de cultivo, no substrato arroz + farelo de trigo não apresentou a mesma eficiência, o que demonstra que a decisão de escolha de um isolado para a produção de inoculante não pode estar pautada em apenas um critério. A utilização de grãos de cereais para a produção de inoculantes de cogumelos é uma prática comum em todo o mundo, em função da disponibilidade do material, da facilidade de preparo e, principalmente, pela praticidade no momento da inoculação, proporcionada pela fácil desagregação do material, permitindo uma inoculação mais uniforme e com menos gasto de inoculante. Por outro lado, os grãos permitem uma colonização apenas superficial, ao contrário do que ocorre quando se utiliza como substrato o próprio composto de cultivo, o qual permite uma colonização interna das partículas.

TABELA 5 Avaliação do crescimento micelial de isolados de *Agaricus blazei* (mm/dia) em substrato constituído de arroz e farelo de trigo.

Isolado	Médias (mm/dia)*
CS ₄	5.27 a
CS ₅	4.71 a
CS ₁	4.24 a
CS ₂	3.63 b
CS ₇	3.43 b
CS ₆	2.87 b

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Como conseqüência, o inoculante produzido em grãos torna-se menos eficiente quando se utiliza um composto de cultivo de qualidade inferior, com níveis de amônia acima do ideal (Fritsche, 1978). Em função disso, além da velocidade de colonização, deve-se verificar se o substrato apresenta-se bem colonizado pelo fungo. Neste trabalho, não se verificou diferenças de intensidade de colonização entre os isolados, tornando possível a avaliação do crescimento em mm/dia.

3.6 Velocidade de crescimento em composto de cultivo

Ao contrário do ocorreu no substrato arroz + farelo de trigo, no composto de cultivo não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 6), indicando que os isolados em média, crescem na mesma velocidade. O isolado CS₁ apresentou tendência de crescimento superior aos demais, enquanto que o CS₄, que nos tratamentos anteriores mostrou-se mais agressivo, apresentou o menor valor de crescimento micelial, ainda que essa média não tenha diferença estatística. Esses resultados demonstram mais uma vez que os isolados

comportam-se de maneira diferente dependendo do meio ou substrato de cultivo utilizado. Além disso, pode-se inferir que isolados que apresentem crescimento micelial mais lento em meio de cultura ou no substrato arroz + farelo de trigo, não podem ser descartados do processo de seleção de linhagens para a produção de inoculantes comerciais sem antes fazer a avaliação de produtividade de todos os isolados. Apenas no caso desses isolados apresentarem produtividade igual ou inferior, além de outras características, é que os mesmos devem ser preteridos em relação aos demais.

TABELA 6 Avaliação do crescimento micelial de isolados de *Agaricus blazei* (mm/dia) em composto de cultivo.

Isolado	Médias (mm/dia)*
CS ₁	6,69 a
CS ₇	5,99 a
CS ₅	5,60 a
CS ₂	5,52 a
CS ₆	4,77 a
CS ₄	4,68 a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

4 CONCLUSÕES

O BDA é o meio que proporciona crescimento micelial mais rápido para todos os isolados de *Agaricus blazei*.

O MEC (meio extrato de composto) apresentou maior estabilidade fisiológica para o crescimento do *Agaricus blazei*, proporcionando a formação de colônias mais uniformes.

Considerando todos os experimentos, o isolado CS₁ se destacou em crescimento micelial e poderá ser uma ótima opção para a produção de inoculante do *Agaricus blazei*.

Estudos quanto à produtividade deverão indicar quais isolados são de fato os mais indicados para produção de inoculante comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAGA, G.C.; EIRA, A F. Efeitos da camada de cobertura, da massa de substrato e do ambiente de cultivo, na produtividade de *Agaricus blazei* Murril. Energia na Agricultura, v.14, p.39-51, 1999.

FERMOR, T. R.; RANDLE, P.E.; SMITH J.F. Compost as a substrate and its preparation. In: FLEGG P.B.; SPENCER, D.M.; WOOD, D.A. **The biology and technology of the cultivated mushroom.** Dorchester: Jonh Wiley & Sons Ltd,1987. p.81-110.

FRITSCHÉ G. Breeding work. In: CHANG, S.T.; HAYES W.A. **The biology and cultivation of the edible mushroom.** New York, Academic Press1978. p.239-250.

RAPER, C.A. Biological nature. In: CHANG, S.T. ; HAYES W.A. **The biology and cultivation of the edible mushroom.** 1978.p.239-250.

SMITH, D.; ONIONS A.H.S. **The preservation and maintenance of living fungi.** England: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1983. p.51.

SMITH, D.; ONIONS A.H.S. **The preservation and maintenance of living fungi.** 2nded England: Commonwealth Agricultural Bureaux International, 1994. p.121.

CAPÍTULO 3

ASPECTOS CITOLÓGICOS DE *Agaricus blazei*

RESUMO

LABORY, Cláudia Regina Gontijo. Aspectos citológicos de *Agaricus blazei*.
In: ____ Avaliação citológica e condições de crescimento de *Agaricus blazei*.
2003. Cap.3, p.41-60. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) –
Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.*

O *Agaricus blazei* tem despertado um grande interesse nos seus estudos devido às suas propriedades medicinais, principalmente antitumorais. Apesar do crescente interesse dos produtores na comercialização desse cogumelo, pouco se conhece de sua biologia, especialmente no que diz respeito a seus aspectos básicos. Este trabalho objetivou determinar o comportamento citológico de hifas dos isolados CS₁, CS₂, CS₄, CS₅, CS₆, CS₇ de *A. blazei*, utilizando a coloração Giemsa para contagem de núcleos e avaliação das dimensões dos compartimentos celulares. Foi também utilizado o fluorocromo DAPI (2µg/mL) para a caracterização do comportamento nuclear do metabasídio e esporos da espécie. Foi revelada a presença média de 6 núcleos para os isolados estudados. O comprimento das células variou de 49,2µm a 96,12µm, a largura variou de 4,38µm a 5,45µm e a área celular variou entre 215,50µm² e 514,24µm². Com o fluorocromo DAPI foi possível observar quatro núcleos no metabasídio e dois núcleos na fase final dos esporos. A presença de dois núcleos indica a ocorrência de divisões mitóticas pós-meióticas no processo de maturação dos esporos de *A. blazei*, sendo tal fenômeno peculiar para alguns basidiomicetos, entre eles *Coprinus cinereus* (Kües, 2000). Essas observações revelaram a necessidade de estudos mais detalhados visando a elucidação do ciclo sexual do *A. blazei*.

* Comitê orientador: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Professora orientadora),
Eustáquio Souza Dias - UFLA; Lisete Chamma Davide - UFLA.

ABSTRACT

LABORY, Cláudia Regina Gontijo. Cytological aspects of *Agaricus blazei*.
In: _____ Cytological evaluation and growing condition of *Agaricus blazei*.
2003. Cap.2, p.41-60. Thesis (Doctorate in Food Science) – Universidade
Federal de Lavras, Lavras – MG.*

Agaricus blazei has aroused great interest in studies due to its medicinal properties, mainly antitumoral. Despite the growing interest of producers in this mushroom trade, little is known about its biology, especially in respect to the basic aspects. This work aimed to determine the cytological behaviour of hyphas strains CS₁, CS₂, CS₄, CS₅, CS₆, CS₇ of *Agaricus blazei*, using Giemsa staining to count nuclei and evaluate the cellular compartment dimension. The fluorochrome DAPI (2µg/mL) was also used to characterize the nuclear behaviour of this metabasidium and spore. A mean of 6 nuclei were observed in each studied strain. The cells length varied from 49,2µm to 96,12µm and the width varied from 4,38µm to 5,45µm. Using the fluorochrome DAPI it was possible to observe four nuclei in the metabasidium and two nuclei in the spore final phase. The presence of two nuclei points out the occurrence of mitotic division post meiotic in the maturation process of *A. blazei* spores. This phenomenon observed is peculiar to some basidiomycota, such as *Coprinus cinereus* (Kües, 2000). The results found in this work indicated the necessity of more detailed studies aiming to elucidate the *A. blazei* sexual cycle.

*Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Major Professor),
Eustáquio Souza Dias – UFLA; Lisete Chamma Davide – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Vários fenômenos são responsáveis pela variabilidade genética em fungos. A mutação, a recombinação sexual, a heterocariose, a parassexualidade e os fatores citoplasmáticos são alguns deles. Além desses, o polimorfismo cromossômico é também considerado como fator responsável pelo aumento da variabilidade (Kistler & Miao, 1992; Zolan, 1995).

Segundo Elliot (1987), Colson e Kligman foram os primeiros a estudar a distribuição dos núcleos e mostrar a natureza multinuclear dos micélios dos cogumelos. Colson encontrou de 6 a 10 núcleos nas células das hifas do tecido de cogumelos e Kligman encontrou de 7 a 20 núcleos em células apicais. Estudos mostraram que células mais jovens possuem mais núcleos que células mais velhas (Wang and Wu, 1976).

O número de núcleos em tubos germinados de *Volvariella volvacea* varia de 1 a 15. O tubo germinativo de espécies heterotálicas, tais como *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*, são uninucleados ou binucleados e aqueles homotálicos, tais como *Agaricus bisporus* e *V. volvacea*, são multinucleados (Chang & Hayes, 1978). Em *A. bitorquis*, o micélio fértil é regularmente binucleado e esse estado é mantido na ausência de grampos de conexão. *A. macrosporus* e *A. nivescens* apresentam hifas multinucleadas com 10 a 20 e 5 a 10 núcleos por célula, respectivamente (Hou & Elliot, 1979).

Os basidiomicetos têm um comportamento típico na formação dos basídios e, posteriormente, dos basidiósporos. Estes são geralmente unicelulares e haplóides. Como já observado, basidiósporos recebem usualmente um único núcleo proveniente do metabasídio, entretanto, em algumas condições, dois núcleos podem encaminhar-se para um mesmo esporo (Alexopoulos et al., 1996).

Normalmente, quatro basidiósporos são formados no basídio. O cogumelo *Agaricus bisporus* possui geralmente apenas dois esterigmas, sendo que em cada um desenvolve-se um basidiósporo. Muitos outros, tais como *A. campestris* (variedade selvagem), *A. bitorquis* (forma cultivada), *Volvariella volvacea*, *Lentinula edodes*, *Coprinus* spp e *Pleurotus* spp, normalmente possuem quatro basidiósporos que são formados nos ápices dos esterigmas. Entretanto, já foi relatado que cada basídio de *A. bisporus* pode suportar de 1 a 7 esporos. Foi observado que os esterigmas não necessariamente estariam no ápice do basídio, mas podem desenvolver-se ao redor do basídio. Essas anormalidades são encontradas em torno de 10% dos basídios presentes num mesmo himênio (Chang & Hayes, 1978).

Apesar da predominância de esporos uninucleados originalmente, eles podem também se tornar binucleados como resultado de uma divisão mitótica dos núcleos (mitose pós-meiótica) (Alexopoulos et al., 1996). Uma vez sabendo desses comportamentos atípicos e considerando essa falta de informações sobre a espécie *Agaricus blazei*, este trabalho teve como objetivo determinar o número de núcleos e dimensões celulares de hifas e basidiósporos de diferentes isolados da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados

Foram utilizados os isolados CS₁, CS₂, CS₄, CS₅, CS₆ e CS₇ de *Agaricus blazei*, que fazem parte da coleção de fungos do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais, do Setor de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Para a padronização das metodologias, alguns testes sobre concentração de corantes, meio de cultura ideal, temperatura ideal de crescimento e estágio ideal de coloração do micélio foram feitos, utilizando o isolado CS₆ de *A. blazei*.

2.2 Crescimento e manutenção da cultura

Para o crescimento e manutenção dos isolados de *A. blazei* foi utilizado o meio básico completo (MBC) constituído de 10g de glicose, 1g de peptona, 1g de extrato de levedura, 1g de KH₂PO₄, 0,5g de MgSO₄ · 7H₂O, 1g de (NH₄)₂SO₄, 0,5g de CaCl₂ e 13g de ágar para 1L de meio.

Para a obtenção do micélio foi utilizado o método descrito por Roane (1952), que consiste no crescimento do micélio sobre papel celofane colocado sobre o meio de cultura. Esse procedimento foi necessário devido à difícil manipulação do micélio, visto que o *A. blazei* é um fungo filamentosos.

O crescimento se deu em câmara de crescimento, à temperatura de 23°C, por aproximadamente duas semanas ou até que o quadrado (1,5cm x 1,5cm) de papel celofane fosse totalmente coberto pelo micélio.

2.3 Avaliação citológica de hifas

2.3.1 Preparações citológicas

O micélio dos isolados CS₁, CS₂, CS₄, CS₅, CS₆, CS₇, desenvolvido sobre papel celofane, foi fixado em metanol por 3 minutos. Em seguida, foi realizada a hidrólise com HCl 1N a 60°C, por 10 minutos. Imediatamente após, o material foi lavado cuidadosamente em água destilada e em tampão fosfato 0,05M, pH 6,8. Após a lavagem, o micélio foi imerso no corante Giemsa diluído a 3% em tampão fosfato 0,05M pH 6,8 por pelo menos 2 horas.

Após a coloração do micélio, 10 lâminas foram montadas para cada tratamento (CS₁, CS₂, CS₄, CS₅, CS₆, CS₇) e, para cada lâmina, foram avaliados 15 campos e, em cada campo, um compartimento celular de hifa, sendo avaliadas cerca de 900 células. A avaliação consistiu em medir o comprimento do compartimento celular, sempre que fosse possível visualizar os dois septos que delimitavam o compartimento interno; medir a largura e contar o número de núcleos do respectivo compartimento de célula.

Os núcleos foram contados em um microscópio de luz Carl-Zeiss Amplival usando a objetiva de 40X e os compartimentos medidos com a ajuda de uma ocular micrometrada (OSM), adaptada ao microscópio de luz, usando objetiva de 40X.

O procedimento de medição utilizando a ocular micrometrada consistiu em determinar um fator de correção que foi multiplicado pelo valor da leitura, sendo transformado em μm . Este fator de correção é determinado para cada microscópio e para cada objetiva utilizada com o auxílio de uma lâmina com escala micrométrica. Para o microscópio Carl-Zeiss Amplival com a objetiva de 40X o fator de correção calculado foi de 24,28; assim, os valores de comprimento e largura dos compartimentos de célula foram multiplicados por este valor.

2.3.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições (lâminas) e 6 tratamentos (isolados). Dentro de cada repetição, avaliaram-se 15 compartimentos celulares. Efetuou-se a análise de variância e o teste de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade com o auxílio do Software Sisvar 4.3 desenvolvido no Departamento de Ciências Exatas da Universidade Federal de Lavras.

2.4 Avaliação citológica de basídio e basidiósporos

2.4.1 Coleta do material

Foram utilizadas amostras de basidiocarpos cultivados a partir do isolado CS₁ de *A. blazei*. Os isolados do cogumelo *A. blazei* foram inoculados em composto, crescidos em câmara de incubação apropriada para um bom desenvolvimento do micélio no composto e, posteriormente, foi colocada terra de cobertura para indução de frutificação. Uma vez emitido o corpo de frutificação, fases diferenciadas num mesmo basidiocarpo foram coletadas para visualização ao microscópio. Apesar de serem coletadas as partes completas do pileo mais himênio, apenas as lamelas foram analisadas.

Basidiósporos maduros foram coletados de basidiocarpos com pileo aberto e estes já estavam sendo liberados naturalmente. As coletas foram realizadas colocando-se pedaços do himênio lamelar em solução de tampão fosfato e agitando gentilmente até que os basidiósporos fossem liberados. Uma vez coletados, foram então colocados em tubos *ependorf* com duas vezes o volume do fluorocromo DAPI (2µg/mL de tampão fosfato 0,05M pH6,8) e mantido na ausência de luz.

2.4.2 Preparações citológicas

Para visualização dos núcleos corados com DAPI, utilizou-se um microscópio de epifluorescência Olympus BX60 (MF), com filtro de excitação ultravioleta (UG-1), espelho dicromático de 400nm e filtro de barreira de mais de 435nm. As imagens foram adquiridas com câmera digital Nikon CoolPix 950 (1600x1200 pixels no máximo de resolução).

Para a observação do metabasídio, esterigmas e a formação de basidiósporos não foram necessários o uso de corantes. A lamela foi coletada cuidadosamente do himênio, deixada sobre uma lâmina e colocada sobre ela uma gota de óleo de imersão. Após o preparo da lâmina, o material foi observado no aumento de 40X e 100X quando foi possível.

O fluorocromo 4', 6 Diamidino, 2 fenilindoldihidroclorídrico (DAPI) foi utilizado com intuito de se observar o comportamento nuclear da espécie, tanto em fase de desenvolvimento do metabasídio como na fase de formação dos basidiósporos. Estes já maduros foram corados tanto com corante de Giemsa como com fluorocromo DAPI.

2.4.3 Fluorescência

A metodologia de fluorescência dos núcleos dos basidiósporos de *A. blazei* com DAPI foi empregada de acordo com Haugland (1996) com algumas modificações. Lamelas foram coletadas do himênio dos basidiocarpos e coradas com o fluorocromo DAPI (2µg/mL tampão fosfato 0,05M pH 6,8) na ausência de luz (os fluorocromos são sensíveis à luz branca). O fluorocromo foi colocado sobre a lamela e deixado por pelo menos 5 minutos para posterior avaliação do material.

Os esporos maduros foram também corados com o corante de Giemsa, sendo utilizada a mesma técnica de coloração das hifas (Roane, 1952). Todo o processo de coloração foi realizado em tubos *ependorff*, com posterior

centrifugação para retirada do sobrenadante. Na etapa final, depois de os esporos terem sido lavado e centrifugado por três vezes em tampão fosfato, o corante de Giemsa, também diluído a 3%, foi adicionado e mantido por pelo menos 2 horas para depois ser avaliado ao microscópio ótico.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Número de núcleos por compartimento celular

Com a técnica de coloração de Giemsa foi possível observar tanto a coloração dos núcleos quanto a presença dos septos, visando a determinando do tamanho do compartimento celular, o que muitas vezes não é possível utilizando-se outras técnicas de coloração.

Nas avaliações, o número médio de núcleos por compartimento celular nos seis isolados de *A. blazei* (CS₁, CS₂, CS₄, CS₅, CS₆, CS₇) foi elevado, o que era já esperado, uma vez que alguns basidiomicetos possuem natureza multinuclear no micélio (Flegg et al., 1987).

O *A. blazei* pertence ao mesmo gênero do *A. bisporus*, espécie muito estudada e que apresenta uma variação de 7 a 20 núcleos por compartimento celular. Já a espécie *A. bitorquis* apresenta micélio binucleado em micélios férteis, sendo encontrados de 3 a 4 núcleos em micélios não férteis (Flegg et al., 1987).

O número médio de núcleos entre os isolados de *A. blazei* variou entre 5 e 6, com valores médios inferiores e superiores de 5,34 (CS₂) e 6,12 (CS₇) por célula (Tabela 1).

A análise de variância para o número de núcleos bem como o teste de médias não apresentou diferenças significativas a 5% de probabilidade. Assim, os isolados não diferiram entre si, sendo observados em média 5,8 núcleos por célula. Com base nos resultados apresentados pelos diferentes isolados, a espécie *A. blazei* apresenta em média um padrão de 5 a 6 núcleos por compartimento de célula. É importante observar que em todos os isolados foram observados compartimentos com número maior de núcleos, conforme observado na Figura 1.



FIGURA 1 Hifas do isolado CS₄ de *Agaricus blazei*. Compartimento celular com 8 núcleos corado com Giemsa.

3.2 Comprimento e largura dos compartimentos celulares das hifas secundárias

Nas avaliações do comprimento dos compartimentos celulares observou-se uma grande variação. Esta variação pode ser devido a características fisiológicas próprias de cada isolado em questão, uma vez que estas foram crescidas em ambiente controlado (23°C), em um mesmo meio de cultura e pelo mesmo período de tempo.

A análise de variância do comprimento das hifas secundárias de *A. blazei* apontou uma diferença significativa a 5% de probabilidade entre os isolados estudados. O isolado CS₆ foi o que apresentou a maior média (96,12µm), diferindo das demais, a exceção do CS₄, que apresentou uma média de 95,25µm, muito próxima à do isolado CS₆. Os demais isolados (CS₁, CS₂, CS₅, e CS₇) não diferiram estatisticamente entre si a 5% de probabilidade.

A avaliação da largura revelou que as hifas de *A. blazei* possuem uma largura média de $5\mu\text{m}$, existindo uma variação pequena entre os isolados de cerca de $0,65\mu\text{m}$. Esta pequena variação, porém, foi suficiente para diferenciar os isolados estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade.

O isolado CS₅ apresentou hifas com maior largura ($5,45\mu\text{m}$), não diferindo estatisticamente dos isolados CS₆ e CS₇, que apresentaram hifas com largura de $5,35\mu\text{m}$ e $5,33\mu\text{m}$, respectivamente. Este grupo, entretanto, apresentou diferença significativa em relação aos isolados CS₁, CS₂, e CS₄ que tiveram o valor médio da largura de suas hifas de $4,38\mu\text{m}$, $4,69\mu\text{m}$ e $4,77\mu\text{m}$, respectivamente, caracterizando assim hifas mais delgadas.

3.3 Correlação entre área celular e número de núcleos

Para uma melhor caracterização dos isolados, as dimensões celulares (comprimento celular e largura) foram associadas para se obter a área celular em μm^2 (Tabela 1). Posteriormente, associaram-se às áreas celulares obtidas para cada isolado com o seu respectivo número de núcleos.

De acordo com a Tabela 1, pode-se notar que mesmo não havendo diferenças significativas no número médio de núcleos entre os isolados, a área celular, como era esperado, variou entre $215,50\mu\text{m}^2$ e $514,24\mu\text{m}^2$. O isolado CS₂ foi o que apresentou o menor número de núcleos por célula e também as menores dimensões celulares. Observa-se também que o isolado CS₇, apesar do grande número de núcleos por célula (6,12), assim como o isolado CS₆ (6,05), o primeiro apresentou dimensões celulares bastante reduzidas ($303,60\mu\text{m}$), não acontecendo o mesmo com o isolado CS₆, o qual apresentou a maior área ($514,24\mu\text{m}$). Portanto, para os isolados de *A. blazei* estudados, não foi observada uma correlação positiva entre o número de núcleos e a área celular.

TABELA 1 Dimensões celulares médias e número médio de núcleos de seis isolados de *Agaricus blazei*.

Isolados	Núcleos	Comprimento (μm)	Largura (μm)	Área (μm^2)
CS ₄	5,93	95,25	4,69	446,72
CS ₅	5,48	60,78	5,45	331,25
CS ₇	6,12	56,96	5,33	303,60
CS ₁	5,67	68,32	4,77	325,89
CS ₂	5,34	49,20	4,38	215,50
CS ₆	6,05	96,12	5,35	514,24

3.4 Formação dos basidiósporos

Após as avaliações das diferentes fases da formação dos basidiósporos, foi observado o entumescimento do basídio (Figura 2). Em seguida, inicia-se a formação dos esterigmas, sobre os quais serão formados os basidiósporos. Numa outra fase, há o crescimento longitudinal dos basidiósporos, os quais recebem os núcleos em sua câmara. Os basidiósporos depois de algumas horas tornam-se pigmentados e são liberados quando em estágio maduro. A Figura 2 mostra um basídio com 4 esterigmas após a liberação dos basidiósporos.

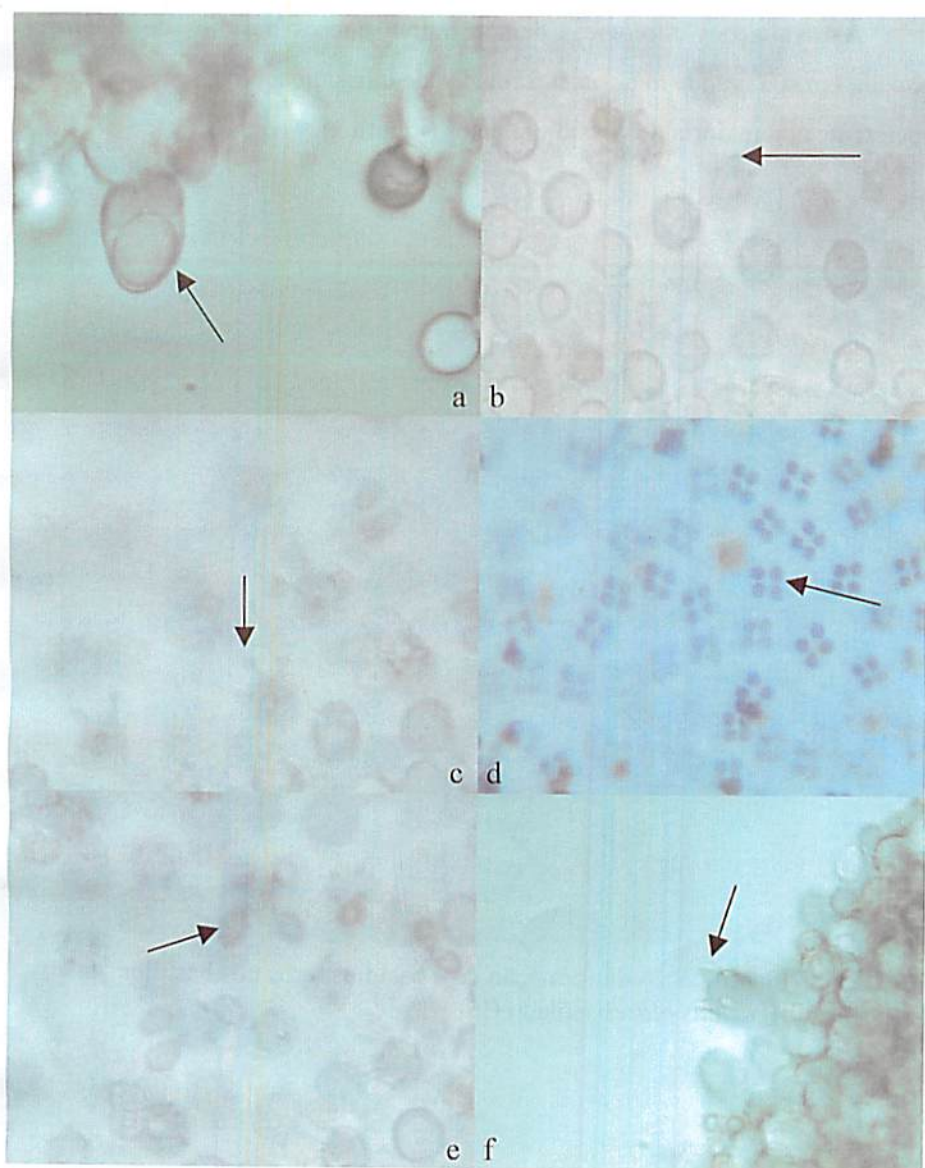


FIGURA 2 Ordem cronológica da formação e liberação dos basidiósporos em *Agaricus blazei* isolado CS₁: a) formação do basídio, b) formação dos esterigmas, c) formação dos basidiósporos, d) basidiósporos em tétrades, e) basidiósporos prontos para serem liberados, f) esterigmas após a liberação dos basidiósporos.

As avaliações citológicas demonstraram que os basídios de *A. blazei* possuem, em sua grande maioria, a formação de 4 basidiósporos, sendo esta uma característica da maioria dos basidiomicetos (Figura 3).

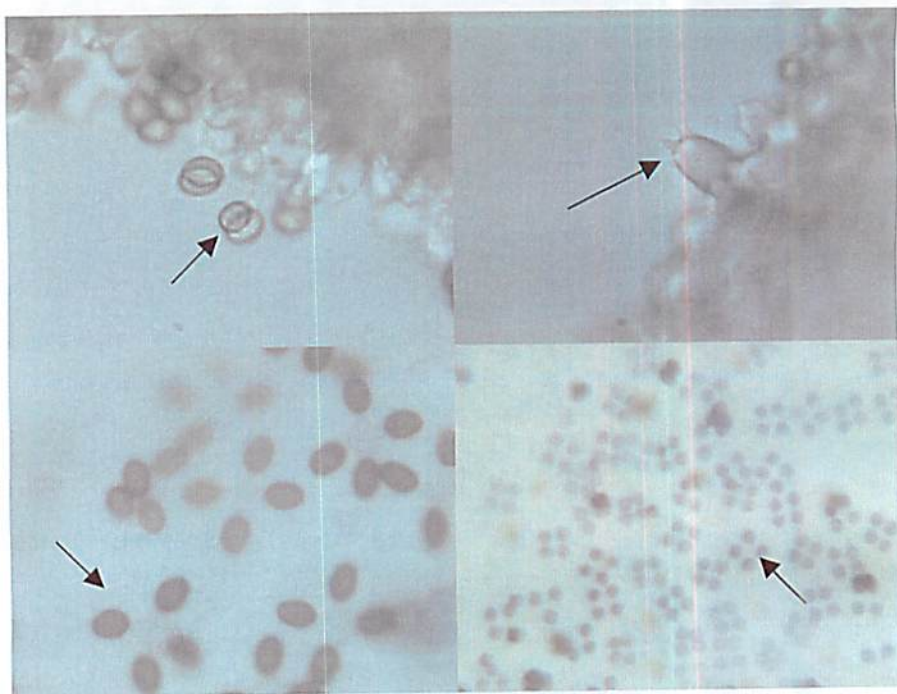


FIGURA 3 Identificação da formação de 4 basidiósporos nos basídios de *Agaricus blazei* isolado CS₁.

A coloração dos basidiósporos com o fluorocromo DAPI revelou a presença constante de esporos binucleados (Figura 4). Anteriormente foi feita uma tentativa de coloração de núcleos dos basidiósporos utilizando coloração de Giemsa. No entanto, não se observou uma coloração específica dos núcleos. Com a técnica de Giemsa, poucos basidiósporos apresentaram-se binucleados gerando-se a falsa impressão de que a maioria era uninucleada. Provavelmente devido a sua forte especificidade pelo DNA, a coloração com DAPI permitiu uma melhor distinção dos núcleos e, portanto, uma caracterização mais detalhada dos esporos. Com isso, a coloração com DAPI permitiu confirmar que os basidiósporos de *A. blazei* são binucleados na sua grande maioria (Figura 4).

Há duas hipóteses para explicar a formação dos dois núcleos no esporo. De acordo com a primeira hipótese, o núcleo se alonga e migra para o interior do esporo já formado, passando pelo esterigma. Segue então uma mitose pós-meiótica, formando, dessa maneira, o basidiósporo binucleado. De acordo com a segunda hipótese, a divisão pós-meiótica ocorre antes da formação dos basidiósporos, migrando para dentro da câmara dois núcleos já formados (Chiu & Moore, 1993; Kües, 2000).

Portanto, a presença de dois núcleos nos basidiósporos pode ser explicada pela ocorrência de divisões mitóticas pós-meióticas no processo de maturação dos esporos de *A. blazei* (Figura 4), como também ocorre em outros basidiomicetos, entre eles, *Coprinus cinereus* (Kües, 2000).

Uma melhor compreensão do ciclo sexual do *Agaricus blazei* só será possível com a obtenção de culturas monospóricas e análises dos cruzamentos entre essas culturas. Por isso, na continuidade deste trabalho, será necessário estabelecer uma metodologia para a quebra de dormência dos basidiósporos.

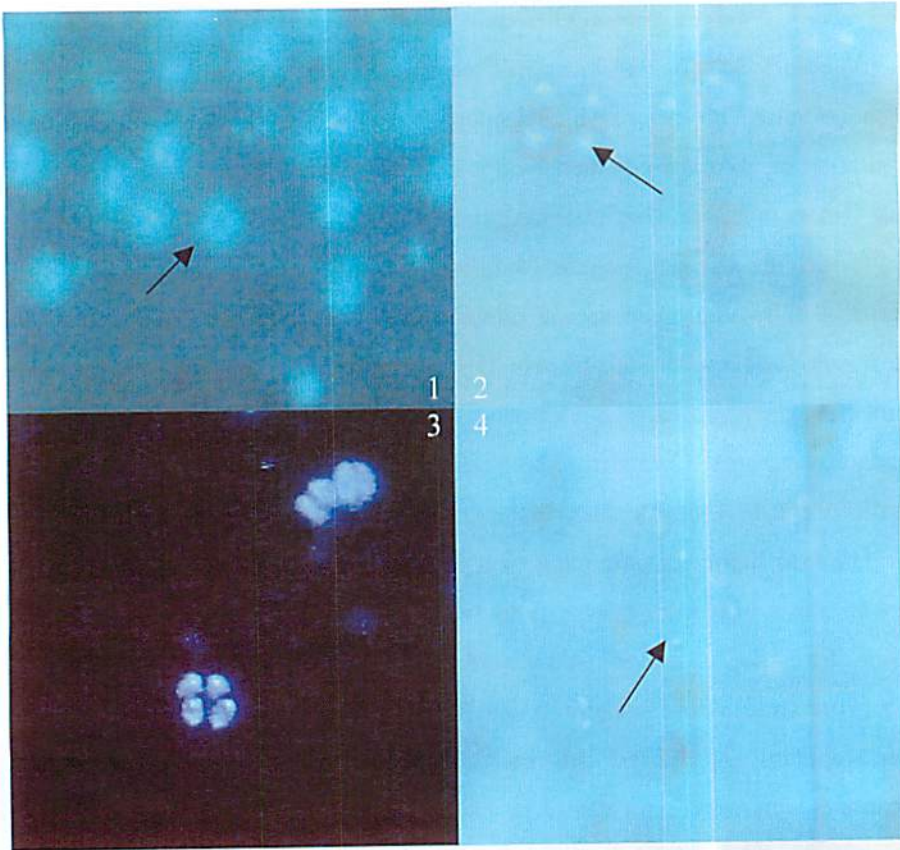


FIGURA 4 Fases da formação dos esporos binucleados no isolado CS₁ de *Agaricus blazei*. 1- metabasídio com 4 núcleos; 2- esporos imaturos uninucleados; 3- pré-formação da mitose pós-meiótica em esporos imaturos; 4- esporos maduros binucleados (término da mitose pós-meiótica).

4 CONCLUSÕES

Os compartimentos celulares de hifas dos isolados de *A. blazei* estudados apresentaram-se multinucleados, com número médio de 6 núcleos. Mesmo havendo diferenças significativas quanto à área celular entre os isolados, não houve correlação com o número de núcleos.

Em *Agaricus blazei*, a meiose resulta na formação de quatro núcleos no metabasídio e posterior formação de quatro basidiósporos. Na fase adulta, os basidiósporos tornam-se binucleados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MINS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4thed. New York, USA: J. Wiley & Sons, 1996. 869p.
- CHANG, S.T.; HAYES, W.A. **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic, 1978. 819p.
- CHIU, S.W.; MOORE, D. Cell form, function and lineage in the himeria, of *Coprinus cinereus* and *Volvariella volvacea*. **Mycology Research**, v.97, p.221-226, 1993.
- ELLIOT, T. J. The General Biology of the Mushroom. In: **The biology and technology of the cultivated mushroom**. New York: J. Willey & Sons, 1987
- FLEGG, P. B.; SPENCER, D.M.; WOOD, D.A. **The biology and technology of the cultivated mushroom**. New York: J. Willey & Sons, 1987.
- HAUGLAND, R.P. **Handbook of fluorescent probes and research chemicals**. 6thedn. Eugene, OR, USA: Molecular Probes, 1996.
- HOU, H. H. and ELLIOT, T.J. Comparative cytology in the genus *Agaricus*. **Mushroom Science**. v.8, n.2, 1979, p.51-62.
- KISTLER, H.C.; MIAO, V.P. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p.131-152, 1992.
- KÜES, U. Life history and Developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus* **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.64, n.2, p. 316-353, June, 2000.
- ROANE, C.W. A method of preparing fungi for cytological studies. **Phytopathology**, v.42, p.480, 1952.
- ZOLAN M.E. Chromosome-length polymorphism in fungi. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, n.4, p.686-698, 1995.
- WANG, H. H. and WU, J.Y-H. Nuclear distribution in hyphal system of *Agaricus bisporus*. **Mushroom Science** v.9, n.1, 1976, p. 23-29.