

LETÍCIA VANESSA GRAF

**BIOLOGIA CELULAR, INTERAÇÕES MICELIANAS
E CULTIVO DE *Lepista sordida***

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Ruth Janice Guse Schadeck
Coordenador: Marco Randi

Curitiba
2004

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Hans e Ruth pelo estímulo e enorme ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minhas irmãs Christie e Juliana pela animação e apoio.

Ao Rafael Zenni por todas as dicas referentes à parte escrita deste trabalho.

Ao Beto Rodrigues e à Ana Paula do Nascimento pelo auxílio na parte técnica de computação.

À professora Ruth Janice Schadeck, minha orientadora, quem me auxiliou e apoiou durante todo o decorrer do semestre. Por todas as horas extras que se dedicou para com a minha formação acadêmica.

Ao Ricardo Vieira pela ajuda com a parte metodológica e aprendizado sobre o tema deste trabalho. Pelas longas conversas sobre fungos, as quais me foram muito válidas.

Ao André de Meyer, consultor da Embrapa-Florestas, pelo fornecimento de dados técnicos sobre *L. sordida* e *P. pulmonarius*.

Ao Bernard Desrumaux do Instituto “Proefcentrum voor de champignonteelt”, Bélgica, pelas informações sobre o cultivo de *L. nuda*.

Ao Dr. Jorge Wright pelas bibliografias enviadas durante a primeira etapa deste trabalho.

À professora Sionara Eliasaro pela ajuda com informações e contatos que foram importantes durante o decorrer do semestre.

À Lucélia Donatti, pelo auxílio na preparação do material visualizado em microscopia eletrônica de varredura.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	viii
RESUMO	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Características gerais.....	4
2.2 <i>Habitat</i> de <i>L. sordida</i>	4
2.3 Características da esporogênese.....	5
2.4 Corpos lipídicos e vacúolos em fungos.....	5
2.5 Interações micelianas.....	7
2.6 Cultivo de basidiomicetos.....	9
2.7 Micorremediação.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Coleta dos cogumelos e de suas esporadas.....	14
4.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	14
4.3 Citoquímica para lipídios.....	14
4.4 Citoquímica para núcleo e vacúolos.....	15
4.5 Obtenção e manutenção dos isolados.....	15
4.6 Experimentos em culturas isoladas e de interação entre <i>L. sordida</i> e <i>P. pulmonarius</i>	16
4.7 Cultivo de <i>L. sordida</i>	17
4.7.1 Produção de semente-inóculo.....	17
4.7.2 Preparo do substrato.....	18
4.7.3 Grupo de experimentos.....	18
4.7.4 Introdução do substrato nas bandejas.....	18
4.7.5 Introdução do solo de cobertura.....	19
4.7.6 Cultivo selvagem experimental.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1 Morfologia das frutificações.....	21
5.2 Caracterização de lamelas e esporogênese.....	21
5.3 Morfologia do esporo.....	22
5.4 Citoquímica para lipídios em esporos.....	22
5.5 Citoquímica para núcleo e vacúolos em esporos.....	23
5.6 Morfologia da cultura e das hifas.....	23
5.7 Características citoquímicas das hifas.....	24
5.8 Crescimento isolado de <i>L. sordida</i> e <i>P. pulmonarius</i>	24
5.9 Interações micelianas.....	25
5.9.1 Experimentos controles de interação.....	25
5.9.2 Resultados gerais das interações.....	25
5.9.3 Utilização de BDA como meio de cultura.....	27

5.9.4	Utilização de MEA como meio de cultura.....	30
5.10	Cultivo de <i>L. sordida</i>	31
5.11	Legendas.....	34
6.	DISCUSSÃO.....	39
6.1	Morfologia das frutificações coletadas e das estruturas celulares.....	39
6.2	Características citológicas das estruturas celulares analisadas.....	40
6.3	Interações micelianas.....	42
6.4	Cultivo de <i>L. sordida</i>	46
7.	CONCLUSÃO.....	51
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
9.	ANEXO.....	59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Morfologia das frutificações em gramados.....	61
FIGURA 2 – Morfologia das lamelas analisadas.....	62
FIGURA 3 – Morfologia do esporo.....	63
FIGURA 4 – Corpos lipídicos em esporos nas lamelas.....	64
FIGURA 5 – Corpos lipídicos, núcleos e vacúolos em esporos soltos.....	65
FIGURA 6 – Núcleo em esporos soltos.....	65
FIGURA 7 – Morfologia da cultura e das hifas.....	66
FIGURA 8 – A. Hifas coradas com Laranja de Acridina.....	67
FIGURA 9 – A. Três hifas coradas com Vermelho Nilo.....	67
FIGURA 10 – Caracterização das culturas isoladas.....	68
FIGURA 11 – Interação de 27.11.03 em BDA.....	69
FIGURA 12 – Cordas micelianas.....	70
FIGURA 13 – Interação de 05.01.04 em BDA.....	71
FIGURA 14 – Interação de 24.11.03 em MEA.....	72

FIGURA 15 - Interação de 05.12.03 em MEA.....	73
FIGURA 16 - Interação de 05.01.04 em MEA.....	74
FIGURA 17 – Bandejas com substrato.....	75
FIGURA 18 – Cultivo selvagem experimental.....	76
FIGURA 19 – Habitat de <i>L. sordida</i>	77
FIGURA 20 – Substrato e semente-inóculo.....	77
FIGURA 21 – Frutificações de <i>P. pulmonarius</i>	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Datas das inoculações das bandejas utilizadas no cultivo de <i>L.sordida</i>	18
Tabela 2 - Taxa específica de crescimento radial (Kr) das colônias se desenvolvendo isoladamente.....	25
Tabela 3 – Taxa específica de crescimento radial (Kr) de <i>P. pulmonarius</i> e <i>L. sordida</i> em interação.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

MEV: microscopia eletrônica de varredura

BDA: batata-dextrose-ágar

MEA: extrato de malte-ágar

DIC: interferência diferencial por contraste

PVC: polivinil carbonato

m/m: massa de semente-inóculo/massa do substrato

m/v: massa/volume

RESUMO

Foram estudados os aspectos da biologia celular, interações micelianas bem como o cultivo, em *Lepista sordida*. Foram realizados: 1. experimentos de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em lamelas retiradas de basidiomas frescos e em hifas; 2. estudos citológicos com o corante vital Vermelho Nilo e Laranja de Acridina em hifas e esporos; 3. experimentos de interação miceliana entre isolados de *L. sordida* e *Pleurotus pulmonarius* em BDA e MEA 2%; 4. experimentos de cultivo utilizando-se tratamento anaeróbio do substrato. Os resultados obtidos foram: 1. caracterização morfológica das hifas em MEV, bem como de suas lamelas, que apresentaram estruturas celulares como basidiolos e basidiósporo. Neste último verificou-se a morfologia rugosa-verruculosa de sua parede celular; 2. utilizando-se o corante vital Vermelho Nilo, constatou-se em muitos dos esporos um único corpo lipídico no seu interior. Com o corante Laranja de Acridina também se observou que os basidiósporos que apresentavam uma quantidade menor de lipídio, possuíam vacúolos ácidos no seu citoplasma, com provável digestão lipídica nos seus interiores. Concomitante com o aparecimento dos vacúolos há um aumento do volume nuclear, uma vez que este se encontrava achatado pela presença de um grande corpo lipídico e, também, por apresentarem elevada taxa metabólica. As hifas também revelaram a presença destas estruturas celulares no citoplasma pelas mesmas técnicas citológicas. 3. Experimentos de interação miceliana entre isolados de *L. sordida* e *Pleurotus pulmonarius* averiguaram as estratégias de combate que estes possuem. Quando colocados para interagir em BDA, *P. pulmonarius* substituiu totalmente *L. sordida*, apresentando cordas micelianas em alguns casos. Quando inoculados em MEA 2%, houve tanto a mesma substituição quanto o impasse (ausência de substituição). Neste meio verificou-se que, quando a taxa de crescimento radial de *P. pulmonarius* era consideravelmente maior, a barreira de confronto formava-se a seu favor, resultando em substituição. Quando as taxas eram semelhantes, a barreira ocorria praticamente na região central da placa de Petri, com *L. sordida* também avançando em alguns casos sobre o antagonista. 4. Nos estudos de cultivo utilizando o tratamento anaeróbio do substrato, o desenvolvimento miceliano apresentou-se positivo. No cultivo em ambientes controlados, constatou-se que a infra-estrutura disponível não era suficiente para as frutificações ocorrerem, sendo os substratos colonizados, portanto, transferidos para seus ambientes naturais, ou seja, gramados. O micélio destes experimentos se expandiu a partir do substrato para o solo ao seu redor. Esta técnica tem como um de seus principais objetivos a micorremediação de áreas degradadas e/ou poluídas.

DESCRITORES: Basidiósporo. Corpos lipídicos. Núcleo. Vacúolos. Interação miceliana. Cultivo.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com registros fósseis, organismos eucariotos surgiram há pelo menos 1,5 bilhões de anos, estando os fungos entre os primeiros a se ramificarem, (MARTIN, 2003). Desde sua origem sofreram especializações e especiações separadamente dos outros reinos, além de inúmeras adaptações ao longo da sua história evolutiva. Os fungos invadiram o ambiente terrestre e conquistaram nichos de extrema importância para a formação deste ecossistema. De acordo com Paul Stamets, em BAKER (2003), fungos são os grandes cicladores do planeta e as espécies vanguardas em restauração de *habitats*.

Apesar dos grupos possuírem uma morfologia similar, é de se esperar que haja um metabolismo tão diverso dentro deste grupo quanto o que existe dentro dos demais reinos eucariotos. Esta diversidade está refletida na variedade de substratos que eles são capazes de metabolizar e utilizar como fonte de carbono, assim como nas suas inúmeras vias biossintéticas (LAERE, 1995).

Lepista sordida (Fr.) Singer, PEGLER (1986), está inserido no grupo dos basidiomicetos, os quais são capazes de decompor celulose, hemicelulose e lignina, principais componentes da estrutura carbônica das plantas. Os organismos pertencentes a este grupo são os principais responsáveis pela completa degradação destes biopolímeros e, conseqüentemente, pela ciclagem de nutrientes (MOORE-LANDECKER, 1996). Além disso, estudos realizados em outras espécies de *Lepista*, especialmente *Lepista nuda* (Bull. ex Fr.) Cooke, espécie descrita em ARNOLDS (1982), demonstram sua capacidade de absorção de metais pesados do meio, em PETKOVSEK (2002) e seu potencial antibacteriano e antifúngico, em DULGER (2002). Como se observa, fungos possuem ampla aplicação em diferentes áreas da atividade humana, além do conhecido uso na alimentação.

L. sordida produz frutificações comestíveis e se desenvolve no solo, mais especificamente, em gramados. Possui crescimento anelar (formando anéis de fadas) e de acordo com André de MEIJER (2003), suas frutificações desenvolvem-se entre os meses de novembro e maio, sendo atualmente conhecida em todos os continentes, portanto cosmopolita¹. Apesar de sua

¹ Comunicação pessoal do autor (2003).

importância, existe pouco conhecimento a respeito de sua biologia celular, propriedades farmacológicas, ecologia e tecnologias necessárias ao seu cultivo. Entretanto, conhecer aspectos essenciais da biologia deste fungo é vital para propor estratégias de aplicações dentro do universo de possibilidades que se apresentam.

A maioria dos trabalhos realizados com fungos se concentra em estudos com micromicetos, em especial *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, deve-se tomar muito cuidado ao extrapolar estes resultados para níveis mais elevados de classificação, pois a diversidade metabólica dos fungos é surpreendente (MARKHAM, 1995). Este fato torna ainda mais importante estudos que abordem processos celulares e comportamentais de outros fungos, que não apenas fungos inferiores. A caracterização de esporos, assim como de núcleos e reservas endógenas, são essenciais para o conhecimento de biologia celular de basidiomicetos. Estudos em espécies pouco conhecidas, como *L. sordida*, podem revelar dados importantes ainda não constatados.

Um aspecto relevante da biologia celular refere-se a reservas endógenas, como lipídios e carboidratos armazenados. Muitos fungos armazenam corpos lipídicos em seu citoplasma (WEETE, 1983). Estas reservas são fundamentais em vários processos que garantem a sobrevivência e propagação destes organismos. O conhecimento destas reservas nutricionais intracelulares, nesta espécie, fornecerá dados interessantes sobre o seu metabolismo frente a variações inerentes ao desenvolvimento do esporo.

Outro aspecto a ser investigado refere-se à interação de *L. sordida* e *Pleurotus pulmonarius* (Fries) Qué., decompositor primário cosmopolita. O estudo do seu comportamento, quando em contato com outro basidiomiceto, neste caso pertencente à mesma família, gera um modelo de estudo sobre suas estratégias de combate frente às competições existentes em ambientes naturais. Além disto, nos fornece uma maior compreensão sobre a relação destas estratégias com seu modo de vida e nicho ao qual ocupa. Estas táticas de combate delimitam os resultados das interações, acarretando, ou não, sua sobrevivência (BODDY, 2000).

L. nuda é a espécie mais conhecida do gênero e, de acordo com Bernard DESRUMAUX, suas frutificações aparecem em clareiras ou bordas de florestas². No Brasil é frequente encontrar frutificações de *L. sordida*, enquanto as de *L. nuda*, por experiência de André de MEIJER, ainda

² Comunicação pessoal do autor (2004).

não foram localizadas³. As duas espécies produzem frutificações comestíveis agradáveis ao paladar. É muito provável que a metodologia desenvolvida por DESRUMAUX (em fase de publicação), utilizada no cultivo em larga escala de *L. nuda*, ofereça bons resultados quando utilizada para *L. sordida*, pois esta ainda não está estabelecida. Além do cultivo tradicional, outras metodologias podem ser pesquisadas, como o cultivo selvagem. Esta pode também ser utilizada para outros fins, como paisagismo sustentável e recuperação de áreas degradadas (microrremediação: biorremediação por fungos). Portanto estudos sobre suas diversas técnicas de cultivo tornam-se importantes.

No Brasil, cogumelos não fazem parte da dieta da maioria das famílias, sendo, por este motivo, pouco cultivados. Entretanto este novo ramo de comércio pode trazer bons resultados, pois, mesmo que a procura interna ainda seja baixa, a exportação para locais onde seu consumo é elevado, como, por exemplo, a Europa, é uma das muitas possibilidades existentes e promissoras.

Pelo acima exposto, a investigação de diferentes aspectos da biologia de *L. sordida* contribuirá para o conhecimento sobre um fungo ainda não investigado e que apresenta potencialmente múltiplas aplicações úteis ao homem.

³ Comunicação pessoal do autor (2004).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais

Lepista sordida, de acordo com a classificação de Agaricales em LILLOA (1949), válida até hoje, está inserido na família Tricholomataceae. A ordem Agaricales está classificada de acordo com MOORE-LANDECKER (1996), dentro do reino Fungi, divisão Basidiomycota, Classe Basidiomycetes.

Existe uma grande diversidade de espécies dentro do reino Fungi. Estima-se que existam, apenas na divisão Basidiomycota, 15.000 espécies (CHANG, 1989, preface). Destas, 5.000 estão classificadas dentro da ordem Agaricales sendo, na sua maioria, saprófitas, enquanto outros são parasitas ou micorrizas (simbiontes com raízes), (MOORE-LANDECKER, 1996).

2.2 Habitat de *L. sordida*

No solo de gramados existem diversos nutrientes para serem utilizados pelos fungos saprófitos, provenientes de folhas mortas, húmus, exudatos liberados pelas raízes e células descamadas das coifas, fornecendo matéria orgânica em abundância (MOORE-LANDECKER, 1996). A camada de solo presa à raiz das plantas pela mucilagem e pêlos radiculares, é chamada rizosfera. Este ambiente fornece *habitat* a uma variedade de microrganismos, como *L. sordida* (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1992).

Fungos são mais abundantes nos primeiros dez centímetros do solo e limitados aos primeiros trinta centímetros. (MOORE-LANDECKER, 1996). A quantidade de macromoléculas maiores diminui dramaticamente nos gramados quando comparado a troncos de árvores. Entretanto mesmo esta pequena porção de celulose constitui uma fração significativa entre os componentes orgânicos contidos no solo, tornando possível o desenvolvimento de fungos saprófitos (MARKHAM, 1983).

2.3 Características da esporogênese

A grande maioria dos organismos presente na Divisão Basidiomycota produz basidioma (frutificações geralmente macroscópicas), os quais são nutridos pelo micélio que penetra no solo ou em materiais orgânicos normalmente vegetais. Dentro da ordem Agaricales a maioria possui o himênio (tecido sexual) na região inferior das lamelas das frutificações. No himênio encontram-se os basídios, que são células formadoras de esporos (basidiósporos), presentes nas terminações das hifas das lamelas (MOORE-LANDECKER, 1996). Quando os basídios ainda estão imaturos, ou seja, ainda não produzindo esporos, chamam-se basidióloos. Nas lamelas de muitos basidiomicetos também se encontram cistídios, que são células estruturais (GUERREIRO, 2003).

Para a formação dos esporos, os dois núcleos haplóides presentes dentro de cada basídio se fundem produzindo um núcleo diplóide, o qual sofre meiose e forma quatro núcleos haplóides. Estes migram para a superfície do basídio e são projetados juntamente com outras estruturas citoplasmáticas, resultando no brotamento de quatro basidiósporos uninucleados que ficam presos ao basídio pelo esterígio (MOORE-LANDECKER, 1996).

2.4 Corpos lipídicos e vacúolos em fungos

Lipídios são armazenados em esporos de inúmeros fungos, como em *Psilocybe cubensis* (RUCH & MOTTA, 1987), *Agaricus campestris* (RUCH & NORTH, 1988), *Colletotrichum graminicola* (MIMS et al., 1995), *C. gloeosporioides* (KERRIGAN & MIMS, 1993) e *C. truncatum* (VAN DYKE & MIMS, 1991). Nos últimos anos os corpos lipídicos têm sido alvo de inúmeras investigações. Ao invés de depósitos inertes de gorduras, estas partículas são estruturas altamente dinâmicas com funções essenciais no metabolismo celular (MURPHY, 2000). Uma das funções das reservas lipídicas é o suprimento energético durante o envelhecimento, quando as condições nutricionais externas tornam-se deficientes (MIMS et al., 1995). Também têm a função de suprir as necessidades metabólicas durante as primeiras etapas da germinação, fase de alta atividade e demanda energética (RUCH; BURTON; INGRAM, 1991; MAIA et al., 1994; SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1988).

A sua região central é composta principalmente por triacilgliceróis, podendo apresentar outros compostos lipídicos, dependendo da célula. Esta estrutura central é recoberta por uma

monocamada de fosfolipídeos e proteínas específicas, como por exemplo, as oleosinas em células vegetais (ZWEYTICK et al., 2000). Os triacilgliceróis, armazenados nos corpos lipídicos, são hidrolisados pela lipase intracelular, como demonstrado em *Magnaphort grisea*, produzindo glicerol e ácidos graxos (THINES et al., 2000). Os ácidos graxos são utilizados nas diferentes rotas bioquímicas da transformação de energia e na formação de substratos para atividades de síntese através do ciclo do glioxilato. Através deste ciclo são formados esqueletos de carbono que serão utilizados para síntese de aminoácidos e carboidratos suprimindo grande parte das necessidades metabólicas na ausência de nutrientes exógenos (GASPAR, 1994; WEETE, 1984; RUCH et al., 1991). Evidências experimentais sugerem que os corpos lipídicos são internalizados e digeridos em vacúolos (RUBEN & STAGHELLINI, 1978; SCHADECK et al., 1998; THINES et al., 2000). Portanto estas duas estruturas estão interligadas.

Vacúolos são compartimentos complexos e versáteis que apresentam inúmeras enzimas hidrolíticas e são essenciais no metabolismo celular (KLIONSKY; HERMAN; EMR, 1990). Estão presentes em diferentes estruturas fúngicas, como em hifas de *Colletotrichum albicans*, em MARKHAM (1995) e esporos de *Colletotrichum* sp. (KERRIGAN & MIMS, 1993; MIMS et al., 1995). A sua membrana contém próton ATPase, a semelhança de lisosomas, mantendo o seu interior ácido (KLIONSKY; HERMAN; EMR, 1990). Esta característica permite identificar os vacúolos utilizando corantes vitais que se acumulam em meio ácido, como Laranja de Acridina, que fluoresce em vermelho nesta condição (www.probes.com).

Vacúolos de fungos podem exercer várias funções, como lisosomal, de armazenamento, controle da homeostase, do pH e da concentração de íons no citosol (KLIONSKY; HERMAN; EMR, 1990; GRIFFIN, 1994). A acidificação do vacúolo é fundamental para as suas atividades, como a manutenção do potencial eletroquímico que dirige o transporte de aminoácidos e íons através da membrana (KLIONSKY; HERMAN; EMR, 1990; GRIFFIN, 1994).

Nos últimos anos alguns estudos têm abordado a organização citológica em espécies de *Colletotrichum*. Observações demonstraram que conídios jovens de *C. graminicola* apresentam numerosas pequenas vesículas, enquanto conídios velhos apresentam grandes vacúolos (LEITE, 1992). A vacuolização observada durante o envelhecimento e outros detalhes ultraestruturais foram demonstrados por MIMS et al., (1995). Os conídios jovens apresentam grande número de pequenos vacúolos e elevado número de gotículas lipídicas. Durante o envelhecimento o número

de corpos lipídicos diminuí, enquanto os vacúolos aumentam de tamanho. Conseqüentemente, o volume citoplasmático de conídios velhos é ocupado por grandes vacúolos, (MIMS et al., 1995).

A vacuolização e a diminuição dos lipídeos representam o fenômeno citológico mais proeminente que ocorre no envelhecimento de conídios do gênero *Colletotrichum* (MIMS et al., 1995). Estes dois aspectos são interligados, pois a mobilização dos corpos lipídicos acontece no interior dos vacúolos, através de processos autofágicos, em conídios não germinados de *C. graminicola* (SCHADECK et al., 1998) e de *C. acutatum* (RIBEIRO et al., 2002a; b).

2.5 Interações micelianas

Fungos são organismos modulares, pois crescem numa contínua interação de módulos, gerando um padrão de ramificações. Possuem crescimento indeterminado (até que as condições se tornem desfavoráveis), obtêm recursos por crescimento de suas partes, possuem respostas localizadas às variações ambientais e a morte pode ser apenas localizada (CARLILE, 1995).

Fungos podem ser classificados como restritos ou não a um determinado recurso, dependendo de serem ou não confinados ao recurso que estão utilizando. Fungos que formam anéis de fadas colonizam o substrato como se este fosse contínuo, não sendo restritos ao substrato. Fungos que se desenvolvem em recursos delimitados, como galhos numa floresta, encontram recursos heterogeneamente distribuídos no espaço e no tempo. Estas espécies são confinadas ao recurso por elas utilizado, desenvolvendo freqüentemente cordas micelianas ou rizomorfas para conectá-los (BODDY, 1999). Cordas micelianas são agregações de hifas predominantemente paralelas e longitudinalmente alinhadas, que formam sistemas de conexões capazes de relocar os nutrientes ao longo do micélio (BODDY, 1993). Rizomorfas são cordas micelianas que possuem um alto grau de independência, sendo, nas espécies de *Armillaria*, altamente autônomas (BODDY, 1999).

Na primeira etapa de colonização da matéria orgânica, como por exemplo, na morte de um tronco, basidiomicetos podem se desenvolver praticamente sem interferência de outros organismos. Entretanto com o tempo as interações começam a ocorrer. Mesmo havendo mutualismo ou interações onde nenhum organismo sai nem beneficiado nem prejudicado, a maioria das interações são competitivas (BODDY, 2000). A definição de competição dada por

KEDDY⁴, *apud* BODDY (2000), é aplicável a fungos: qualquer efeito negativo que um organismo exerce sobre outro, consumindo ou controlando o acesso a um recurso limitado.

Fungos modificam o meio ao seu redor eliminando metabólitos. Estes produtos podem causar antibiose, modificando quimicamente o meio e inibindo o crescimento de outros organismos. Eles podem ser compostos simples como CO₂, ou compostos específicos, chamados antibióticos, tóxicos para alguns microrganismos. Restos metabólicos, quando em altas concentrações, podem ser tóxicos mesmo para os fungos que os produzem. Entretanto, o fato de um composto inibir ou não o crescimento de outro organismo, depende da sensibilidade deste, e não apenas do composto. Antibióticos voláteis ou que se difundem no meio podem causar interações antagonísticas à distância, mesmo sem contato miceliano (MOORE-LANDECKER, 1996).

Segundo BODDY (2000), o sucesso no combate nestas interações competitivas depende dos mecanismos antagonísticos que cada espécie possui, podendo ser mediadas por substâncias voláteis ou através de contato miceliano. Estes mecanismos que envolvem contato miceliano entre espécies decompositoras podem ser de dois tipos: interferência ou parasitismo. A primeira é mediada por metabólitos não enzimáticos, que resultam em morte do compartimento que entrou em contato com a outra espécie, seguida de uma seqüência programada de destruição citoplasmática. Micoparasitismo foi descrito por RAYNER, BODDY e DOWSON (1987), como uma estratégia ecológica temporária. Neste caso não há o reconhecimento da espécie parasita pela espécie anfitriã, o crescimento daquela é contínuo, sem reações ou produção de zonas pigmentadas. A partir do momento que o parasita tem o domínio do local, ele interage agressivamente, ocorrendo substituição seletiva.

A morfologia miceliana na interferência normalmente muda durante as interações. Em culturas laboratoriais os micélios podem formar barreiras estacionárias que resistem a invasões, frentes invasivas ou cordas micelianas. Todos estes comportamentos micelianos podem às vezes aparecer em uma única interação, acompanhados de uma redistribuição miceliana. Nas regiões distantes das zonas de interações há uma redução da densidade miceliana, deixando a espécie mais suscetível a invasões se esta zona for rompida. Interações em ágar são normalmente acompanhadas de produção pigmentar inter e intracelulares. Os resultados dessas interações podem ser a substituição, onde um fungo ganha território sobre o outro, ou o impasse. Algumas

⁴ KEDDY P. *Competition*, NY. ed. Chapman and Hall, 1989.

vezes a substituição pode iniciar por uma espécie ou por ambas e, nestes dois casos, acabar em impasse (BODDY, 2000). De acordo com HOLMER, RENVALL e STENLID (1997), os sucessores naturais geralmente têm maior habilidade de combater as espécies antecessoras do que outras.

Devido às inúmeras dificuldades apresentadas durante o estudo em madeiras, interações têm sido normalmente estudadas em meio de cultura laboratoriais. O resultado das interações entre duas espécies distintas, quando se realizam inúmeras repetições, nem sempre é o mesmo, inclusive sob condições experimentais idênticas. Portanto mesmo trazendo informações valiosas, as interpretações dos resultados e conseqüente extrapolação dos mesmos para condições de campo devem ser feitas com muito cuidado, pois os resultados não são necessariamente os mesmos (BODDY, 2000).

2.6 Cultivo de basidiomicetos

O hábito de vida dos diferentes basidiomicetos interfere nas técnicas de cultivo. Diferentemente dos fungos saprófitos decompositores de madeira, como espécies dos gêneros *Pleurotus*, *Lentinula* ou *Auricularia*, ou dos decompositores de serapilheira, como *Mycena* e *Marasmius*, citados em MARKHAM (1983), *L. sordida* cresce naturalmente no solo, em campos ou gramados.

O cultivo de fungos decompositores primários de madeira possui suas características próprias. Penetram entre e dentro das células mortas dos tecidos vegetais, principalmente troncos, alguns dias ou semanas após estes estarem mortos. Portanto estes fungos são cultivados em toras, serragem de madeira ou palha de cereais, como descrito em CHANG; MILES (1989 p. 268) e até polpa de café (GUZMAN; MARTINEZ⁵, *apud* CHANG; MILES, 1989, p. 268).

Os fungos que se desenvolvem no solo, como *Agaricus bisporus*, são cultivados em materiais compostados, feitos normalmente com esterco de animais e palha de cereais, onde o material lignocelulolítico já se encontra parcialmente quebrado (CHANG; MILES; 1989, p. 83). Portanto *Lepista* sp. também pode ser cultivado em composto, como é feito atualmente na

⁵ GUZMAN G., MARTINEZ D., *Pleurotus* growing on coffee-pulp in a semi-industrial plant – A new promising mushroom cultivation technology in the subtropics of Mexico, **Mushroom Newsl. Trop.**, 6(3), 7, 1986.

Bélgica com *L. nuda*, no “Proefcentrum voor de champignonteelt”. O consumo de *L. nuda* pela comunidade europeia é alto, portanto seu cultivo torna-se importante (STIJVE, 1999).

Existem alguns passos necessários para que o cultivo possa ser realizado por completo, sem a necessidade de constante compra de micélio. Estas etapas são a manutenção do micélio que se deseja cultivar, produção da semente-inóculo (spawn), inoculação do substrato, corrida miceliana, frutificação e colheita.

A manutenção do micélio deve ser realizada para manter uma cultura pura, livre de outros microrganismos ou vírus, portanto é realizada em ambiente estéril. Esta etapa é importante para manter a estabilidade genética, morfológica e fisiológica da cultura. Se esta preservação não ocorrer, pode haver mudanças degenerativas no mesmo, por fatores como, por exemplo, a falta de nutrientes no meio ou a falta de oxigênio. Existem vários métodos utilizados para a conservação da cultura, como o seu repique periódico após completa ocupação da superfície do meio e a manutenção do mesmo a baixas temperaturas. Neste caso a cultura pode ser mantida em geladeira ou em nitrogênio líquido (CHANG; MILES, 1989, p. 147-157).

A produção da semente-inóculo é realizada para manter uma base de produção miceliana contínua a ser utilizada no cultivo. Esta etapa é realizada em ambiente estéril, com o substrato também esterilizado, podendo este ser grãos ou palhas de trigo, centeio, arroz, entre outros. É normalmente guardado dentro de frascos de vidro ou em sacos de polipropileno (CHANG; MILES, 1989, p. 267). Quando estão inteiramente colonizados pelo micélio, pequenas porções deste são introduzidas em novos frascos. Este micélio é denominado semente-inóculo, podendo também ser utilizado para a inoculação de maiores quantidades de substrato, como realizado no cultivo.

Após o substrato estar inoculado, espera-se o tempo necessário para que o micélio se desenvolva por todo o substrato, processo denominado de corrida miceliana. Esta etapa normalmente demora algumas semanas, imitando as condições naturais do desenvolvimento fúngico, a qual ocorre no escuro, dentro de troncos ou no interior do solo (CHANG; MILES, 1989, p. 56). As próximas etapas são a frutificação e a colheita. A frutificação pode necessitar ou não de intensidade luminosa, dependendo da espécie. Normalmente as frutificações aparecem em fluxos, aparecendo até três fluxos distintos, com alguns dias de intervalo entre eles (EDWARDS, 1978). O substrato gasto pode servir de alimento para ruminantes (FLACHOWSKY, 1999), entre outras utilidades.

Para a produção de cogumelos comestíveis existem alguns fatores essenciais que devem ser levados em consideração, como tolerância à CO₂, temperatura ótima, umidade relativa do ar para frutificação e intensidade luminosa. Cada espécie possui seus próprios parâmetros. As etapas de desenvolvimento miceliano e frutificação diferem nessas necessidades (CHANG; MILES, 1989, p. 267). Todas estas informações provêm do ambiente natural em que determinada espécie habita, sendo então imitadas no cultivo para que haja uma maximização da safra.

A. bisporus, assim como *L. nuda* necessita de um solo de cobertura para poderem frutificar. As boas características deste solo são: textura aberta, boa capacidade de retenção de água e livre de pestes e doenças. Um solo de cobertura muito utilizado é a turfa, ajustando-se seu pH normalmente com CaCO₃ (EDWARDS, 1978). Mais recentemente descobriu-se a importância dos microrganismos do solo de cobertura, que aparentemente auxiliam na transição da fase miceliana para a fase de frutificação (EGER⁶, *apud* HAYES, 1978).

A umidade ideal do substrato não varia muito entre as espécies cultivadas. Segundo TONOMURA (1978), para *Flammulina velutipes* a umidade ótima varia entre 60-65%, e para *Pleurotus* sp. é de 70% (CHANG; MILES, 1989, p. 268). A capacidade nutricional do substrato é verificada pela razão C:N (CHANG; MILES, 1989, p. 82). Madeiras contêm uma alta quantidade de lignina e uma baixa concentração de nitrogênio, quando comparada com substratos herbáceos, estes possuindo de 0,58 a 1,71% (folhas de bananeira). Fungos que se desenvolvem no solo necessitam uma alta concentração de nitrogênio, portanto normalmente o substrato necessita ser misturado e compostado com esterco de animais para aumentar a sua concentração. O substrato após ser compostado aumenta este valor para números que variam de 1,8 a 2,62% (CHANG; MILES, 1989, p. 180).

Técnicas de preparação do substrato, diferentes da tradicional, tiveram bons resultados, produzindo micélio e basidiocarpos de *Pleurotus* sp. com sucesso, empregando substrato fermentado (24h à 55°C) com *Streptomyces thermovulgaris* e bactérias associadas do gênero *Pseudomonas* (STANEK; RYSAVÁ⁷, *apud*, ZADRAZIL, 1978). ZADRAZIL e SCHNEIDREIT⁸, *apud* ZADRAZIL (1978), determinaram que tanto as fermentações aeróbias quanto anaeróbias são convenientes para a produção de *Pleurotus* sp. BALASUBRAMANYA e

⁶ EGER, G. *Mushroom Sci.* v. 5, p. 314, 1962.

⁷ STANEK M., RYSAVÁ J. Application of thermophilic microorganisms in the fermentation of the nutrient substrate for cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mykol. Sb.* v. 8, p. 56-60. 1971.

KATHE (1996), também tiveram resultados positivos com o tratamento anaeróbio do substrato no cultivo de *Pleurotus* sp., realizados na Índia.

Estas novas técnicas foram desenvolvidas porque o cultivo tradicional exige a pasteurização e/ou esterilização do substrato, aumentando consideravelmente o custo de produção, sendo apenas viável para o cultivo em larga escala, quando desenvolvida corretamente. Além de esta nova metodologia ter um custo inferior ao método tradicional por pasteurização, é ecologicamente harmoniosa.

2.7 Micorremediação

Os macromicetos oferecem muito mais estratégias de micorremediação em sistemas degradados e/ou poluídos do que os micromicetos, já que estes não são capazes de degradar lignina, que compõe entre 20 a 35% dos tecidos vasculares da madeira (MOORE-LANDECKER, 1996). Considerando esta característica dos macromicetos, experimentos de campo comprovam esta micorremediação (BAKER, 2003).

Estudos realizados com *L. nuda* mostram resultados positivos em relação à capacidade de absorção de metais pesados do meio, de acordo com PETKOVSEK (2002), e sua capacidade antibacteriana e antifúngica em DULGER (2002). Existe pouco conhecimento sobre *L. sordida* nesta área, entretanto esta espécie demonstra um grande potencial para aproveitamento. Uma melhor compreensão sobre sua biologia pode servir como base para futuros experimentos práticos e aplicados, onde esta espécie pode começar a ser introduzida em ecossistemas degradados e/ou poluídos.

⁸ ZADRAZIL F., SCHNEIDREIT M. Die Grundlagen für die Inkulturnahme einer bisher nicht kultivierten *Pleurotus*. **Art. Champignon**, v. 12, p. 25-32. 1972.

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo uma compreensão abrangente da biologia de *Lepista sordida* em suas inúmeras facetas:

1. Caracterização morfológica de esporos e hifas de *L. sordida* por microscopia eletrônica de varredura;
2. Identificação citoquímica das reservas lipídicas, vacúolos e núcleo, de seus esporos e hifas, através de microscopia confocal;
3. Caracterização da interação miceliana entre *L. sordida* e *P. pulmonarius* em diferentes meios de cultura;
4. Verificação da eficácia do método de tratamento anaeróbico do substrato ao cultivo de *L. sordida* e cultivo selvagem experimental.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos cogumelos e de suas esporadas

Foram coletados cogumelos frescos durante o mês de janeiro de 2004 (Fig. 1A, 1B, 1C) em gramados domésticos da região urbana de Curitiba. Suas lamelas foram retiradas inteiras logo após a colheita. Também foram coletadas algumas esporadas, colocando-se o píleo (chapéu) sobre um papel preto durante dois dias. Os esporos se soltam naturalmente, formando uma película sobre ele. Foi utilizado papel preto porque a esporada de *L. sordida* possui coloração salmão clara, como descrito em ARNOLDS (1982), contrastando melhor e tornando-se fácil manuseá-los.

4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As lamelas dos cogumelos frescos foram submetidas a MEV. O material foi fixado e mantido em Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2). A desidratação foi feita em série alcoólica crescente (70% - 90% - 95% - 100% I e 100% II) 10 minutos cada. O ponto crítico foi obtido em BAL-TEC CPD 030, com gás carbônico. Em seguida ocorreu a colagem das peças em suporte específico para metalização em ouro, que foi obtida em Balzers SCD-030. As peças foram então visualizadas.

4.3 Citoquímica para lipídios

Estas reservas endógenas foram observadas nos esporos presos às lamelas, nas esporadas, assim como nas suas hifas. A parte das lamelas utilizada foi sua região final, pois a região de encontro ao píleo exibia-se muito grossa. As hifas foram obtidas a partir do crescimento miceliano sobre as lamínulas deixadas nos meios de culturas. Os materiais foram colocados sobre lâminas separadas e submetidas ao corante vital Vermelho Nilo (Sigma[®]), que cora lipídios neutros intracelulares.

O material foi corado com Vermelho Nilo (5µg/mL) por 5 minutos. Foi então coberto com lamínula e observado em microscópio confocal Radiance 2001 (Bio-Rad®) acoplado a Eclipse E-800 (Nikon®) com lente de 60X/1.4 NA. O Vermelho Nilo foi excitado utilizando-se o laser Verde HeNe de 543nm e a figura obtida utilizando-se o filtro de emissão E600LP. A microscopia de interferência diferencial por contraste (DIC) foi realizada em todos os materiais avaliados.

4.4 Citoquímica para núcleo e vacúolos

Os esporos provenientes de esporadas e as hifas foram submetidos ao tratamento com Laranja de Acridina a fim de visualizar seus núcleos e vacúolos. As hifas, obtidas com a mesma metodologia descrita anteriormente, e os esporos foram depositados sobre uma lâmina e cobertos com 30 µl de Laranja de Acridina 15 µg/mL. Após 20 minutos foram cobertos com lamínula e observados em microscópio confocal Radiance 2001 (Bio-Rad®) acoplado a Eclipse E-800 (Nikon®). Foi utilizada objetiva com lente de imersão plana-apocromática 60X/1.4 NA e o material observado em DIC. O Laranja de Acridina foi excitado utilizando-se o laser Verde HeNe de 543nm e a figura foi obtida utilizando-se o filtro de emissão E600LP.

4.5 Obtenção e manutenção dos isolados

O isolado de *Lepista sordida* foi obtido a partir de frutificações coletadas em gramados do campus da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em 2001 e identificada por André de MEIJER. O isolado de *Pleurotus pulmonarius* foi coletado no Bosque João Paulo II, Curitiba, PR, em 20 de maio de 2001 e encontrado frutificando em tronco decíduo de *Araucaria angustifolia*. Sua identificação foi confirmada por André de MEIJER. Um exemplar desta espécie pode ser visualizado na figura 21A e 21B.

Os dois isolados foram cultivados para os experimentos em dois meios distintos: Batata-Dextrose-Agar (BDA), e Extrato de Malte-Agar (MEA), 2% m/v. As culturas foram repicadas periodicamente, após completa ocupação da superfície das placas de Petri. Os micélios se desenvolveram no escuro, à temperatura de 26°C. Os isolados foram mantidos em BDA, à 4°C, para garantir seus micélios em estoque.

4.6 Experimentos em culturas isoladas e de interação miceliana entre *L. sordida* e *P. pulmonarius*

Foram medidas as taxas de crescimento radial de *L. sordida* e *P. pulmonarius*, tanto em BDA quanto em MEA, em placas com culturas isoladas (7 dias após a inoculação) e placas com interação (4 e 5 dias após a inoculação). A média do raio das colônias em culturas isoladas foi calculada em cinco repetições no mínimo, para os dois meios de cultura. Nas placas com interação foram utilizadas entre 8 a 12 repetições para cada meio de cultura. Em cada placa foi adotado o valor médio de quatro raios perpendiculares. Uma vez que uma espécie possui uma taxa de crescimento mais acelerada, este fator poderá potencialmente interferir na sua capacidade de combate no momento do encontro.

O cálculo da taxa de crescimento radial específica foi realizado de acordo com PROSSER (1990), que a utiliza para comparar o crescimento em diferentes meios de cultura e em diferentes condições ambientais. A cinética da colônia possui um crescimento inicial exponencial no seu raio, seguida de uma fase de desaceleração e uma fase linear. Enquanto há suficiente meio de cultura disponível ao crescimento, durante a fase de crescimento linear, a colônia se expande numa taxa constante, determinada por K_r , equivalente à média de crescimento das hifas até as margens da colônia. Isto pode ser representado pelo simples modelo empírico: $r = r_0 + K_r t$.

Na fórmula utilizada para esta medição, r_0 e r significam os raios da colônia em tempo inicial e tempo t . Este modelo não leva em consideração a fase exponencial e não é aplicável para medições de biomassa.

Foi realizado o teste t , utilizado para a comparação de duas médias, a fim de visualizar se os valores das taxas de crescimento radial específico possuíam diferenças significativas entre si. Utilizou-se um nível de significância de 95%. Este teste foi realizado tanto para placas com culturas isoladas quanto para placas com interação. Entretanto não foi possível comparar estas duas situações, uma vez que o dia em que a marcação foi realizada diferiu.

A metodologia utilizada na preparação das placas com interação miceliana foi adaptada de GRIFFITH e RAYNER (1994). As culturas cresceram em placas de Petri de 9cm de diâmetro, em BDA e em MEA 2% m/v. Para cada pareamento foram utilizados inóculos de 0,9 cm de

diâmetro. Cada inóculo era retirado com um tubo de ensaio de vidro a partir das bordas das placas de suas respectivas culturas isoladas.

Dois inóculos de *L. sordida* foram colocados para interagirem entre si como controle, em ambos os meios. Cada placa com experimento de interação miceliana recebeu um inóculo de *P. pulmonarius* e um de *L. sordida*. Estes foram dispostos a uma distância de 3 cm entre si, e 2 cm da borda da placa de Petri.

4.7 Cultivo de *L. sordida*

Foram realizados experimentos que exigissem um baixo custo de produção, o qual utiliza folhas de bananeira, muito comum em nosso meio. Para o desenvolvimento deste trabalho foi realizada a manutenção do micélio, conforme descrito no item 4.5, a produção de semente-inóculo, o preparo do substrato para sua colonização e expansão miceliana, assim como tentativas de frutificação.

4.7.1 Produção de semente-inóculo

A produção da semente-inóculo utilizou como substrato pecíolos de folha de bananeira. Estes foram inoculados e mantidos no escuro, em ambiente com baixa flutuação da temperatura. As folhas secas que pendem das bananeiras foram cortadas em suas bases, retirando-se o limbo e cortando-se o pecíolo em tamanhos com média de dez centímetros cada. Estes foram deixados de molho em água fria pernoite e então torcidos manualmente.

A umidade ideal para o substrato varia de 60-70%, entretanto não foram realizados testes de verificação de umidade. Esta foi obtida por tentativas manuais, espremendo-se o substrato até não escorrer mais água do mesmo, finalizando com saturação de água equivalente à sua capacidade de suporte. Os pecíolos foram colocados dentro de frascos de conserva e sacos de polipropileno de 30 X 15 cm. Os mesmos foram esterilizados durante 40 minutos a 120° C. O micélio foi então inoculado, em ambiente estéril, para servir como nova fonte de semente-inóculo e também para ser utilizado na inoculação do substrato de frutificação.

4.7.2 Preparo do substrato

O substrato utilizado para frutificação foi folha de bananeira. Esta possui 1,71% de nitrogênio em sua composição, portanto não foi necessário acrescentar nenhum suplemento nutricional ao mesmo, o que é comum para o cultivo de basidiomicetos que se desenvolvem no solo. O método utilizado para estes experimentos foi o descrito por BALASUBRAMANYA e KATHE (1996), com adaptações para que os experimentos pudessem ser realizados nas condições existentes.

Submergem-se as folhas de bananeira em um balde de 200 L, com água proveniente de torneira. Eleva-se o pH do meio com CaCO_3 , atingindo-se um pH igual ou superior a 9,0 no momento da submersão, a fim de eliminar inicialmente os microrganismos presentes no substrato. A submersão dura em média uma semana, portanto o substrato fica praticamente em condições anaeróbias. A água é então despejada e uma nova água é introduzida no balde. Pressiona-se o substrato para cima e para baixo do balde algumas vezes para lavá-lo e retirar os microrganismos que podem ter ficado aderidos ao substrato. Despeja-se a água novamente e o substrato é torcido para retirar o excesso de umidade. A umidade ideal do substrato foi obtida com a mesma metodologia utilizada no preparo da semente-inóculo (Fig. 18B). Este processo foi realizado em ambientes não estéreis.

4.7.3 Grupos de experimentos

Os experimentos foram realizados em três etapas, em datas diferentes. Cada etapa continha duas bandejas com substrato.

Etapas	Número de bandejas	Dias de inoculação
1ª etapa	2 bandejas	18 de agosto de 2003
2ª etapa	2 bandejas	11 de novembro de 2003
3ª etapa	2 bandejas	06 de dezembro de 2003

Tabela 1: Datas das inoculações das bandejas utilizadas no cultivo de *L.sordida*.

4.7.4 Introdução do substrato nas bandejas

Como o substrato foi tratado anaerobicamente possui microrganismos, portanto foi introduzido em bandejas limpas somente com água e sabão, não necessitando sua esterilização. A

semente-inóculo foi introduzida na bandeja concomitante ao substrato e espalhada em toda a sua extensão. A porcentagem de semente-inóculo, para substrato já umedecido, foi de 15% m/m. Este procedimento foi realizado na primeira e segunda etapa em ambiente estéril e na terceira etapa em ambiente não estéril. As bandejas foram cobertas com filme de PVC e guardadas no escuro, em ambiente com baixa flutuação da temperatura. A temperatura atmosférica deste local foi medida durante 54 dias, com um termômetro de máxima e mínima.

4.7.5 Introdução do solo de cobertura

Tentativas de frutificação em ambientes controlados ocorreram apenas durante a primeira etapa dos experimentos, em função de ter sido verificado, durante os experimentos, que não era possível obter frutificações com a infra-estrutura disponível. No momento em que o micélio havia colonizado totalmente o substrato das bandejas da primeira etapa, neste caso 31 dias após a inoculação, retirou-se o PVC e introduziu-se turfa como solo de cobertura, possuindo esta uma média de 3 cm de espessura.

As bandejas foram mantidas num ambiente úmido, com pouca flutuação de temperatura e baixa luminosidade. Foi utilizado o fotoperíodo natural de 12 h. Durante os 21 dias subsequentes, a umidade relativa do ar foi medida diariamente, ficando com uma média de 82,4°, com mínima de 71° e máxima de 88°. Como esta umidade relativa do ar não era suficiente, o micélio era diariamente umedecido com um vaporizador. A temperatura média do ar foi de 24,8°C, com mínima de 21,5°C e máxima de 29°C. Foi medida também a temperatura interna do substrato colonizado, que variou de 21,5°C a 25°C.

Como as frutificações estavam demorando muito tempo para ocorrer, após 23 dias de introdução do solo de cobertura, foi optado por deixar o micélio em um lugar sombreado no jardim, portanto em condições de cultivo semi-selvagens. As duas bandejas foram cobertas com lona de plástico para proteger da chuva e sombrite para manter a temperatura razoavelmente baixa. As proteções se mantiveram cerca de 20 cm acima das bandejas para que não interferissem no desenvolvimento das frutificações, caso viessem a aparecer. Frequentemente a superfície miceliana era umidecida com um vaporizador, tomando-se o cuidado de não umidecê-la muito e precipitar gotas sobre ela. Com este método o micélio podia ser parcialmente monitorado (umidade e temperatura).

4.7.6 Cultivo selvagem experimental

Como as condições de cultivo em ambientes controlados e semi-selvagens não foram adequadas para a obtenção de frutificações, optou-se por introduzir todas as bandejas nas suas condições naturais, ou seja, em gramado. Este método tem as seguintes finalidades: micorremediação e jardinagem sustentável, além de poder ser introduzido em casas residenciais de moradores que apreciam o consumo de cogumelos comestíveis.

Uma “cama” foi preparada com folhas de bananeira tratadas anaerobicamente. Escavou-se a terra do gramado com uma profundidade de trinta centímetros, onde foi depositada primeiramente uma camada de folhas de bananeira (Fig 18C). Sobre estas foi colocado o micélio de *L. sordida* proveniente de uma bandeja, quebrando-o levemente, como descrito por FRITSCHÉ, (1978), como visualizado na figura 18D. Todo o micélio da bandeja foi colocado sobre a “cama” (Fig. 18E), a qual foi coberta com outras folhas de bananeira e, sobre estas, depositado uma camada de solo do próprio gramado (Fig. 18F), além da grama que tinha sido retirada previamente, imitando seu *habitat* natural (Fig. 18G).

5 RESULTADOS

5.1 Morfologia das frutificações

Os píleos das frutificações coletadas, como mostra as figuras 1A, 1B e 1C, apresentavam-se convexos quando jovens, se expandindo durante seu desenvolvimento e apresentando um umbro central. Esta espécie não apresenta anel e suas lamelas são adnatas e levemente decurrentes. Possuem suas margens voltadas para baixo e levemente estriadas. Quando os cogumelos foram encontrados em locais mais protegidos de radiação solar, sua coloração se apresentava violácea intensa. Sob alta intensidade luminosa sua coloração era esbranquiçada. Esta característica é definida como higrófono, pois seu píleo absorve água, adquirindo esta coloração típica. Frutificações jovens também apresentam coloração violácea mais intensa quando comparado aos completamente desenvolvidos.

Foram encontrados se desenvolvendo em anéis de fadas em todos os casos, como pode ser vista na figura 19A. Realizou-se um corte transversal da grama onde existia um anel, para visualizar a camada de matéria orgânica ao redor das suas raízes. Constatou-se que neste caso esta camada possuía aproximadamente dez centímetros e as hifas de *L. sordida* circundavam o ambiente da rizosfera (Fig. 19B). Exemplares do presente trabalho, com fotografias, foram tombados no herbário da UFPR, com a numeração UPCB 47530.

5.2 Caracterização de lamelas e esporogênese

Na figura 2 observam-se diferentes aumentos de uma lamela de *L. sordida*, em MEV. São observadas em baixas (Fig. 2A) e altas (Figs. 2B-2F) magnificações. A figura 2B mostra a região onde a lamela se encontra com o píleo. As hifas da região superior pertencem a esta junção, enquanto as células com morfologia clavada apontadas pela seta são os basidiolos.

A figura 2C mostra vários basídios produzindo basidiósporos em número de quatro, muito comum dentre a classe Basidiomycetes. Também é possível visualizar um grande número de basidiolos nesta lamela, apontados pela seta verde. O himênio não apresenta cistídios, corroborando a descrição de *Lepista sordida* realizada por ARNOLDS, (1982). A seta vermelha

mostra os quatro basidiósporos ainda ligados ao basídio pelo esterígio, conjunto visto em maior aumento na figura 2D. A seta amarela mostra um basídio que já dispersou três esporos, com seus esterígias presentes. Este fato também está representado no basídio apontado pela seta preta, onde os quatro esporos já foram dispersos. As figuras 2E e 2F mostram novamente este momento, com esporos maduros, praticamente prontos para serem dispersos, e esporos já liberados.

5.3 Morfologia do esporo

A sua morfologia é caracterizada por esporos elipsóides/oblongos, com ornamentação rugosa-verruculosa, visualizada nas figuras 3A e 3B. Na figura 3 os esporos estão representados por duas técnicas diferentes, DIC e MEV. Através de MEV verifica-se que estas ornamentações estão presentes no esporo inteiro (Fig. 3B), enquanto através de DIC (Fig. 3A) as ornamentações não são observadas nas regiões correspondentes a lipídeos (confirmados por reação citoquímica) (Fig. 4). Por esta técnica nota-se (Fig. 3A) que as ornamentações são mais evidentes nos esporos que apresentam menor conteúdo de corpos lipídicos. O esporo 3 da Fig. 3A apresenta as ornamentações ao longo de toda sua superfície, o esporo 2 apresenta pouco lipídio e algumas ornamentações, enquanto o esporo 1 apresenta muito lipídio e nenhuma ornamentação.

Foi realizada a medição de dois esporos da figura 3A. O esporo 2 apresenta 7 μm (comprimento), enquanto o esporo 4 mede 4 μm (largura). No esporo 3 é possível visualizar a região à qual o basidiósporo estava preso no esterígio, pela fina cauda na sua região inferior.

5.4 Citoquímica para lipídios em esporos

Os esporos presentes nas lamelas (Fig. 4A) apresentaram uma única gotícula de lipídio em seu interior ocupando a maior parte do compartimento celular. Esporos provenientes de esporadas (Fig. 5A), com alguns dias de idade, apresentaram em sua maioria esta mesma característica, bem como esporos com menor conteúdo lipídico. Na figura 4A (seta fina), observa-se uma grande gotícula de lipídio em cada um dos quatro basidiósporos que estão sendo liberados por apenas um basídio. A seta grossa das figuras 4A - 4D aponta para um basidiolo, que se apresenta cilíndrico pela vista lateral na Fig. 4B e granuloso na Fig. 4D, ambas em DIC. A figura 4C mostra uma

vista superficial da lamela, com as mesmas representações. Os quatro esporos superiores apresentam-se um pouco mais afastados entre si, em relação aos inferiores. Além dos esporos observa-se que outras células também apresentam reação positiva, entretanto não tão intensa.

5.5 Citoquímica para núcleo e vacúolos em esporos

As figuras 5C e 6A, mostram a coloração do Laranja de Acridina em esporos soltos. Na Fig. 5C é possível visualizar seus núcleos em verde (seta fina), assim como os vacúolos ácidos em vermelho (seta grossa). Com esta coloração também é possível distinguir a gotícula de lipídio que se apresenta escura e arredondada dentro do espora, como apontado pela seta vermelha. Nos esporos em que a gotícula encontra-se grande, ocupando uma porção considerável do citoplasma, o núcleo apresenta morfologia achatada contra a parede do espora, como observado no espora 3 da Fig. 6A. Foram realizados 17 cortes ópticos da figura 6C e se realizou a projeção em Laser Sharp, verificando que esta morfologia não é proveniente de artefato de fatiamento óptico.

Nos esporos em que o corpo lipídico apresenta-se menor, é possível visualizar o núcleo com morfologia mais esférica. No espora 1 da figura 6A, encontra-se com morfologia arredondada, enquanto no espora 2 da figura 6A observa-se uma morfologia redonda porém irregular. Nestas ocasiões também é possível visualizar vacúolos no interior do citoplasma, como mostrado pela seta grossa da Fig. 5C. Nos esporos em que a gotícula apresenta-se grande, os vacúolos não são distinguíveis.

5.6 Morfologia da cultura e das hifas

Na figura 7A observa-se uma placa de Petri com uma cultura *L. sordida* de 12 dias. É possível visualizar seu micélio algodonoso com tonalidade violácea. Nas figuras 7B e 7C, seu micélio foi submetido a MEV. É possível distinguir hifas mais finas e mais grossas (Fig. 7C). Seu micélio apresenta poucas conexões em gancho quando comparado ao micélio de *P. pulmonarius* (resultados não mostrados).

5.7 Características citoquímicas das hifas

Na figura 8 (seta) é possível visualizar em verde seus núcleos. Os dois núcleos haplóides se encontram algumas vezes próximos e outras vezes afastados entre si. Também é possível verificar nesta figura que no interior das hifas mais finas existem mais vacúolos. Na figura 9 é possível visualizar corpos lipídicos no citoplasma da hifa 1, enquanto a hifa 2, que é mais grossa, encontra-se praticamente vazia. A hifa 3 apresenta-se bem fina também com alguns corpos lipídicos, é uma hifa apical, portanto em crescimento. Na figura 9 também está representado um gancho de conexão nas figuras C e D, com várias gotículas lipídicas próximas ao septo.

5.8 Crescimento isolado de *L. sordida* e *P. pulmonarius*

A característica morfológica da cultura de *L. sordida* tanto em BDA quanto em MEA foi a mesma. O micélio apresenta coloração violácea, variando suavemente sua tonalidade entre as repetições. Possui muitas ramificações, possuindo característica algodonosa desde o momento inicial de crescimento.

Durante os primeiros dias de inoculação, forma-se um anel inicial de crescimento, com irradiações mais ou menos isodiamétricas de hifas. Nesta etapa o alongamento é mais pronunciado que a diferenciação (ramificação). A partir do terceiro dia não se formam mais anéis, o micélio cresce sem distinções de zonas concêntricas, apresentando maior diferenciação do que no estágio anterior. Este aumento na densidade populacional de hifas propicia uma tonalidade violácea mais pronunciada (Fig 10D). Alguns dias após o micélio ocupar toda a superfície do meio de cultura, o mesmo muda sua coloração gradualmente para tonalidades castanhas, mostrando envelhecimento.

Nas placas contendo BDA, seu micélio possui uma taxa de crescimento maior que nas placas contendo MEA. Retirou-se a média dos crescimentos radiais das colônias com 7 dias. Obteve-se para BDA, $K_r = 0,49$, e para MEA, $K_r = 0,41$ (Figs 10E, 10F).

A morfologia da cultura de *P. pulmonarius* apresenta um crescimento inicial pouco algodonoso, ficando crostoso com o passar dos dias. É possível visualizar vagamente os anéis de crescimento quando a cultura apresenta diâmetro maior. A sua coloração é branca e, em alguns casos, é possível visualizar macroscopicamente cordas micelianas suaves ao longo de seu micélio

(Fig. 10A). Repetiu-se a mesma metodologia de taxa de crescimento radial da colônia, obtendo-se para BDA, um $K_r = 0,47$, e para MEA $K_r = 0,52$. *P. pulmonarius* se desenvolveu discretamente mais rápido em MEA do que em BDA (Figs. 10B, 10C).

Utilizando o teste t, compararam-se as taxas de crescimento radial das duas espécies, crescendo isoladamente em BDA e das duas espécies em MEA, e verificou-se que não houve diferença significativa entre estes valores para nenhum dos meios de cultura. Quando se compararam os valores das taxas de crescimento radial de *P. pulmonarius* se desenvolvendo em BDA e em MEA, bem como de *L. sordida* também se desenvolvendo nestes dois meios, verificou-se que também não houve diferença significativa entre eles.

<i>P. pulmonarius</i>	BDA	MEA	<i>L. sordida</i>	BDA	MEA
repetição 1	0,4786	0,5143	repetição 1	0,5180	0,4780
repetição 2	0,4250	0,5536	repetição 2	0,4678	0,3464
repetição 3	0,4571	0,5000	repetição 3	0,4857	0,3536
repetição 4	0,4964	0,5300	repetição 4	0,4536	0,4250
repetição 5	0,5071	0,5178	repetição 5	0,4964	0,4536
média	0,4728	0,5231	repetição 6	0,5071	
			repetição 7	0,5143	
			média	0,4918	0,4113

Tabela 2: Taxa específica de crescimento radial (K_r) das colônias se desenvolvendo isoladamente, 7 dias após a inoculação.

5.9 Interações Micelianas

5.9.1 Experimentos controles de interação

Nas duas placas (BDA e MEA), os inóculos de *L. sordida* se desenvolveram com o mesmo vigor que os experimentos de interação miceliana. No momento em que as hifas centrais das placas se encontraram muito próximas entre si, houve uma leve repulsão entre elas, devido às suas polaridades opostas. As hifas das bordas foram as primeiras a se anastomosarem. Este resultado ocorreu tanto no BDA quanto no MEA.

5.9.2 Resultados gerais das interações

Em todas as placas onde foi utilizado BDA como meio de cultura, *P. pulmonarius* avançou agressivamente sobre *L. sordida*, enquanto nas placas contendo MEA houve diferentes

resultados. O micélio de *P. pulmonarius* avança rasteiramente, apresentando morfologia crostosa que pode exibir cordas micelianas. Ao final da interação, quando há a substituição total, os setores de interação com pigmentação castanha desapareceram, exibindo tonalidade branca. O micélio de *L. sordida*, quando avança, apresenta micélio algodonoso homogêneo, que se desenvolve por toda a extensão da placa, enquanto o de *P. pulmonarius* pode avançar tanto por toda a placa quanto localizadamente. Em todas as repetições onde se observou um avanço de *L. sordida*, formou-se um halo com baixa densidade populacional de hifas no micélio de *P. pulmonarius*.

Os resultados do teste t, aplicado entre *P. pulmonarius* e *L. sordida* se desenvolvendo em BDA, bem como as duas espécies se desenvolvendo em MEA e entre *P. pulmonarius* crescendo em BDA e em MEA, bem como *L. sordida* crescendo em BDA e em MEA, mostraram que em nenhum caso há diferença significativa entre os valores obtidos.

meio/data	placas	<i>P. pulmonarius</i>	<i>L. sordida</i>
BDA 27.11.03	A	0,5300	0,3800
	B	0,4525	0,4800
	C	0,4875	0,3725
Kr médio		0,4900	0,4200

meio/data	placas	<i>P. pulmonarius</i>	<i>L. sordida</i>
BDA 05.12.03	A	0,3830	0,4500
	B	0,4500	0,4200
	C	0,4000	0,4200
Kr médio		0,4100	0,4300

meio/data	placas	<i>P. pulmonarius</i>	<i>L. sordida</i>
BDA 05.01.04	A	0,2750	0,4800
	B	0,2650	0,5000
	C	0,3100	0,4800
Kr médio		0,2830	0,4870

meio/data	placas	<i>P. pulmonarius</i>	<i>L. sordida</i>
BDA 12.01.04	A	0,4125	0,4937
	B	0,4313	0,4313
Kr médio		0,4220	0,4625

média geral		0,4407	0,4500
--------------------	--	--------	--------

meio/data	placas	<i>P. pulmonarius</i>	<i>L. sordida</i>
MEA 24.11.03	A	0,5060	0,3500
	B	0,4700	0,2940
Kr médio		0,4880	0,3220

meio/data	placas	<i>P. pulmonarius</i>	<i>L. sordida</i>
MEA 05.12.03	A	0,4170	0,4330
	B	0,4250	0,4000
Kr médio		0,4200	0,4150

meio/data	placas	<i>P. pulmonarius</i>	<i>L. sordida</i>
MEA 05.01.04	A	0,4800	0,2750
	B	0,4850	0,3100
	C	0,4950	0,2650
Kr médio		0,4870	0,2830

meio/data	placas	<i>P. pulmonarius</i>	<i>L. sordida</i>
MEA 12.01.04	A	0,4690	0,3500
	B	0,4625	n. d.
Kr médio		0,4660	n. d.

média geral		0,4652	0,3400
-------------	--	--------	--------

Tabela 3: Taxa específica de crescimento radial (Kr) das colônias em interação, entre 4 e 5 dias após a inoculação.

* Os resultados de *P. pulmonarius* do dia 05.01.04 (BDA) não foram utilizados para a obtenção da medida da média geral de *P. pulmonarius* crescendo em BDA, pois a cultura de origem dos seus inóculos possuía um crescimento mais lento, com micélio muito fino sobre o meio apresentando-se não concêntrico. Isto levou a uma taxa de crescimento radial muito baixa destes inóculos, o que não é característico do seu crescimento.

5.9.3 Utilização de BDA como meio de cultura

Inoculação dia 27 de novembro de 2003: foram realizadas triplicatas deste experimento. As culturas de origem dos dois inóculos tinham a mesma idade, porém a de *P. pulmonarius* ficou alguns dias em geladeira, retardando seu metabolismo. Este fator pode justificar sua taxa de crescimento sensivelmente superior às demais repetições após ter sido repicado para a placa de interação. Cinco dias após a inoculação, as placas A (Fig. 11A') e C possuíam o micélio de *P. pulmonarius* com taxa de crescimento radial superior ao de *L. sordida*, enquanto na placa B

estava ocorrendo o inverso (tabela 2), como visto na figura 11B'. Houve uma contaminação na placa C, porém esta pareceu não ter interferido na competição.

Neste período a barreira de interação já estava começando a se formar na região central da placa, com pigmentação amarelada (Figs. 11A' e 11B'). Nas placas A (Fig. A) e C, *P. pulmonarius* já havia começado a lançar um micélio mais denso na região da barreira enquanto na placa B seu micélio não se apresentava tão invasivo. Nesta placa a interação estava ocorrendo com uma leve vantagem de *L. sordida*, com a barreira de interação mais próxima de *P. pulmonarius* (Fig. 11B). Das três placas, a placa C possuía seu micélio avançando mais agressivamente, com *L. sordida* desenvolvendo apenas um micélio branco, não apresentando em nenhum momento sua coloração violácea.

Onze dias após a inoculação, as placas A (Fig. 11A) e C exibiam o micélio de *P. pulmonarius* substituindo *L. sordida* através de frentes invasivas, englobando sua colônia. A placa C apresentava cordas micelianas bem visíveis nesta região (Fig. 12C e 12D). A placa A apresentava, na região deste avanço, pigmentação marrom pela vista inferior (Fig. 11A'). A placa B apresentava, neste período, cada espécie colonizando aproximadamente a metade do meio, com o micélio de *L. sordida* apresentando coloração típica intensa (Fig. 11B). Após setenta e três dias observou-se, nas três placas, substituição total de *L. sordida* por *P. pulmonarius* (Figs. 11A, 11A', 11B, 11B') As figuras 12E e 12F mostram a placa C pela vista inferior nesta data.

Inoculação dia 05 de dezembro de 2003: três placas foram inoculadas e, após três dias, a placa A apresentava *L. sordida* com uma taxa de crescimento radial superior, enquanto nas placas B e C estava ocorrendo o inverso, *P. pulmonarius* exibindo taxa de crescimento levemente superior (tabela 2). A barreira formou-se na região central da placa. Vinte e quatro dias após a inoculação, *P. pulmonarius* possuía micélio denso avançando sobre *L. sordida*, com cordas micelianas bem visíveis nas placas A (figura 12A e 12B) e C.

Em todas as placas uma fração considerável de sua biomassa miceliana estava sobre *L. sordida*, similarmente ao que ocorreu na figura 11B' (73 dias). O micélio de *L. sordida* não apresentava nenhuma coloração, seu micélio estava recuado, menos algodinoso que o seu comum, e provavelmente morto. Deste período até sessenta e cinco dias após a inoculação, a competição não mudou quase nada sua morfologia, apenas a placa B possuía o micélio de *L. sordida* levemente mais recuado.

Sessenta e cinco dias após a inoculação, para verificar se *L. sordida* ainda estava viável, foram retiradas amostras de duas regiões da placa B e repicadas em BDA. Uma amostra foi retirada do local da barreira de interação, como realizado por DOWSON, RAYNER e BODDY (1988) e outra do local entre o inóculo de *L. sordida* e a borda da placa. Também foi retirada e repicada uma amostra da cultura pura de *L. sordida*, inoculada na mesma data da interação, como controle. O repique do controle foi positivo, enquanto ambas as regiões retiradas da placa de interação desenvolveu o micélio de *P. pulmonarius*. Portanto, a substituição foi total, mostrando sua agressividade predatória sobre *L. sordida*.

Inoculação dia 05 de janeiro de 2004: nas três placas inoculadas, após sete dias, a barreira já estava formada, com a pigmentação amarelada típica (Figs. 13A' e 13B'). Na placa A esta barreira ocorreu na região central da placa, devido à falha de inoculação, inserindo um ponto extra de *P. pulmonarius*, enquanto nas outras estava a favor de *L. sordida*. Seu micélio exibia vigor e, durante toda a etapa de colonização das placas, apresentava taxa de crescimento radial superior (tabela 2).

Trinta e quatro dias após a inoculação, *P. pulmonarius* apresentava seu micélio avançando densamente e com cordas micelianas. A placa A ainda apresentava aparentemente o micélio de *L. sordida* ocupando algumas regiões próximas às bordas da placa (Fig. 13A'). Entretanto, na placa B, *P. pulmonarius* provavelmente já havia substituído totalmente *L. sordida*, este apresentando micélio totalmente branco e menos algodinoso (hifas aparentando estarem mais compactas).

Inoculação dia 12 de janeiro de 2004: este experimento foi realizado em duplicata. Na placa A, *L. sordida* se desenvolveu mais rápido, conseqüentemente a barreira de interação formou uma linha convexa a seu favor, enquanto que na placa B as taxas de crescimento radiais foram iguais e a barreira formou uma linha côncava. Vinte e sete dias após a inoculação, *P. pulmonarius* exibia micélio denso sobre *L. sordida*, que apresentou ausência de pigmentação quando observado pela vista superior. *P. pulmonarius* apresentava-se mais forte e, pela face inferior, seu micélio já havia ocupado praticamente toda a área de ambas as placas.

5.9.4 Utilização de MEA como meio de cultura

Inoculação dia 24 de novembro de 2003: este experimento foi realizado em duplicata. As placas mães dos dois inóculos tinham a mesma idade, porém a de *P. pulmonarius* ficou alguns dias em geladeira, retardando seu metabolismo. Este fator pode ter influenciado a taxa de crescimento miceliano após o repique para a placa de interação. Esta taxa foi sensivelmente superior às demais repetições (tabela 2). Após oito dias formou-se uma barreira de interação a seu favor (Figs. 14A e 14B). Pela face inferior, a barreira possuía pigmentação amarelada, com tonalidade marrom claro nos locais onde *P. pulmonarius* avançava seu micélio denso sobre *L. sordida*, começando a haver substituição (Figs. 14A' e 14B').

Trinta e cinco dias após a inoculação houve completa substituição na placa A, sendo possível visualizar uma relocação de biomassa por parte de *P. pulmonarius*, diminuindo sua densidade miceliana nos locais onde não há interação (Fig. 14A). Quando visualizada por baixo, *P. pulmonarius* exibe sua pigmentação esbranquiçada sobre *L. sordida* (Fig. 14A').

Neste período, na placa B, *L. sordida* exibia seu micélio mais denso do que antes, apresentando tonalidade violácea mais intensa. Este avançou como uma faixa homogênea de 4 mm sobre *P. pulmonarius*, com hifas aéreas e algodonosas. Formaram-se alguns halos lineares de aproximadamente 2 mm sobre *P. pulmonarius*, apresentando intervalos com baixa densidade de hifas, provavelmente por seu micélio estar morrendo naquela região. Estes halos se formaram sucessivamente em direção ao *P. pulmonarius* (Fig. 14B). Esta formação não mudou mesmo após setenta e seis dias, com *L. sordida* apresentando micélio amarelado, típico de seu envelhecimento (Fig. 14B).

Inoculação dia 05 de dezembro de 2003: três placas foram inoculadas, entretanto uma foi contaminada. As taxas de crescimento radial das duas espécies foram semelhantes nas duas placas (tabela 2). Na placa A, vinte e quatro dias após a inoculação, formou-se uma barreira inclinada, enquanto na placa B a barreira foi central. Em ambas as placas *P. pulmonarius* desenvolveu frente invasiva sobre *L. sordida*, havendo também a formação de halo sobre *P. pulmonarius*, provocado provavelmente pelo ataque de *L. sordida* (Figs. 15A e 15B). Pela vista inferior, houve pigmentação castanha nas regiões de interação de ambas as placas (Figs 15A' e 15B').

Após sessenta e cinco dias, *L. sordida* ainda apresentava pigmentação violácea na placa A, mostrando vitalidade. Na placa B seu micélio mostrava pigmentação violeta claro em alguns setores e o amarelado típico de seu envelhecimento na maior parte da colônia (Figs. 15A e 15B). Pela vista inferior é possível visualizar, na placa A, a formação de mais halos em direção à *P. pulmonarius*, e na placa B o aumento do halo mais próximo ao seu inóculo (Figs 15A' e 15B').

Inoculação de 05 de janeiro de 2004: nas três placas inoculadas, *P. pulmonarius* apresentou taxa de crescimento radial maior (tabela 2), formando, após sete dias, uma frente invasiva bem definida (Figs. 16A' e 16B'). Desenvolveu seu micélio denso em todas as placas, praticamente englobando *L. sordida* na placa A (Fig. 16A). Nesta placa, após trinta e quatro dias, *P. pulmonarius* apresentou cordas micelianas distintas em sua frente invasiva, além de relocação, diminuindo sua densidade de hifas nas regiões onde não estava havendo interação (Fig. 16A). Em todas as placas *L. sordida* foi totalmente substituído (Fig. 16A' e 16B').

Inoculação 12 de janeiro de 2004: este experimento foi realizado em duplicata, onde as duas espécies apresentaram a barreira de interação a favor de *P. pulmonarius*. Quando observadas pela face superior, vinte e sete dias após a inoculação, *L. sordida* apresentava sua pigmentação típica menos intensa. Pela vista inferior da placa A, *P. pulmonarius* já havia substituído mais da metade do micélio de *L. sordida*, enquanto na placa B seu micélio avançava com menor agressividade. *P. pulmonarius* apresenta-se mais forte que *L. sordida* nas duas placas. Após trinta e seis dias, houve substituição total por parte de *P. pulmonarius* na placa A, e na placa B esta substituição ainda se apresentava parcial.

5.10 Cultivo de *L. sordida*

A etapa de preparo da semente-inóculo teve resultados positivos. Os pecíolos de folhas de bananeira colonizados exibiram coloração esbranquiçada e, em alguns casos a pigmentação violácea (Fig 20B). Foi possível utilizá-las durante todo o experimento. A umidade ideal do substrato, tanto para a produção da semente-inóculo quanto para a produção de substrato utilizado para frutificação, foi obtida por técnicas manuais. Estes experimentos tiveram um resultado final positivo, portanto estima-se que a umidade estava próxima a 70%.

A submersão do substrato utilizado para a frutificação (o qual foi introduzido nas bandejas) durou em média uma semana, portanto o substrato ficou praticamente em condições anaeróbias. Ao final deste processo o preparado assume um odor fétido e observa-se, em alguns casos, uma camada oleosa fina sobre a água, que mostra atividade biológica no substrato (Fig. 20A).

A quantidade média de semente-inóculo utilizada foi 15% m/m, considerada alta para garantir o crescimento miceliano. O desenvolvimento do micélio foi positivo com esta quantidade. A temperatura atmosférica durante a corrida miceliana foi medida durante 54 dias, com um termômetro de máxima e mínima, obtendo-se a temperatura mínima de 21°C e a máxima de 27°C. Esta variação está dentro da faixa de temperatura ideal para esta espécie nesta etapa do cultivo.

As bandejas dos experimentos não exibiram contaminações prejudiciais durante a corrida miceliana e o micélio se desenvolveu muito bem, apresentando os seguintes resultados:

1ª etapa – As duas bandejas foram inoculadas no dia 18 de agosto de 2003. Um mês após a inoculação, o micélio apresentava-se desenvolvido tanto pela vista superior (Fig. 17-4), quanto pela inferior (Fig. 17-3). A umidade do substrato estava ideal, com algumas precipitações no interior do substrato e, por cima, o suficiente para o desenvolvimento miceliano. Trinta e um dias após a inoculação, a turfa foi introduzida sobre o substrato colonizado (Fig. 17-5). As folhas de bananeira estavam claras, da mesma tonalidade do momento da introdução às bandejas. Não houve contaminação.

2ª etapa - Esta preparação ocorreu no dia 11 de novembro de 2003. Onze dias após a inoculação já se observava o micélio se expandindo pelo substrato. Aproximadamente um mês após a introdução, observou-se que o micélio violáceo do *L. sordida* já tinha colonizado a camada superior das folhas de bananeira. Neste dia o micélio já se encontrava mais denso, sem contaminações e algumas regiões apresentavam a coloração violácea, típica de *L. sordida*. Não foi possível visualizar o micélio por dentro do substrato, pois foi utilizado apenas bandejas opacas. Após 54 dias, o micélio se apresentava muito denso (Fig. 17-2). Uma das bandejas foi contaminada neste período com pequenas larvas de insetos e fungos de esporulação verde. Entretanto esta contaminação por fungos ficou contida em apenas alguns pecíolos de bananeira, não se espalhando por todo o substrato colonizado. As larvas morreram após alguns dias.

Portanto mesmo esta contaminação não foi um problema para o desenvolvimento do micélio em questão.

3ª etapa – Duas bandejas foram inoculadas no dia 06 de dezembro de 2003. Durante as primeiras semanas não foi possível visualizar o desenvolvimento miceliano pelo substrato, pois este tinha ficado com uma umidade mais baixa do ideal (visível pelos pecíolos de bananeira superficiais). Apenas em uma das bandejas foi possível visualizar o micélio crescendo discretamente a partir da semente-inóculo. Após 29 dias da inoculação, visualizou-se que nesta bandeja o micélio estava colonizando muito bem o substrato por baixo. Constatou-se que o substrato ficou muito seco durante sua preparação e o micélio não conseguiu desenvolver-se bem sobre sua superfície, apenas através dele. A outra bandeja não apresentou nenhum desenvolvimento miceliano pelo mesmo motivo.

Das seis bandejas, cinco desenvolveram o micélio de *L. sordida* muito bem, apenas uma delas não o desenvolveu, devido à baixa umidade do substrato. Após nove dias da introdução da turfa nas bandejas da primeira etapa, já era possível visualizar o micélio de *L. sordida* se expandindo sobre a mesma, sendo possível visualizar sua coloração violácea. O micélio apresentava-se algodinoso e, dia após dia, era possível visualizar seu aumento de tonalidade devido ao seu adensamento (Fig. 17-6). Após vinte e três dias da introdução da turfa, o micélio havia criado uma película sobre a mesma, exibindo coloração violácea intensa (Fig. 17-7 e 17-8).

Foi optado por mudar as bandejas de local, introduzindo-as em um de ambiente de cultivo semi-selvagem, onde as bandejas foram mantidas sob plástico e sombrite. Esta modificação foi realizada porque se verificou que não estava sendo possível manter todos os parâmetros físicos necessários à frutificação. Entretanto a tentativa de cultivo semi-selvagem também não obteve resultados positivos com frutificações, apesar da contínua vaporização da superfície miceliana. Portanto tanto as bandejas que continham solo de cobertura quanto as outras bandejas, foram introduzidas em ambientes naturais, neste caso em gramados, em condições de cultivo selvagem.

As bandejas da primeira etapa dos experimentos continuaram sendo monitoradas nas condições de cultivo selvagem. Após vinte e quatro dias de introdução da primeira bandeja no gramado, assim como sessenta e sete dias após a introdução da segunda, verificou-se, nos dois sítios de introdução, o micélio violáceo e algodinoso de *L. sordida* se desenvolvendo muito bem, expandindo-se a partir das folhas de bananeira que serviram como inóculo para o solo ao seu redor (Fig. 18H).

5.11 Legendas

FIGURA 1 – Morfologia das frutificações em gramados. A. Vista superior do píleo. Nota-se borda mais violácea e a região central mais esbranquiçada. B. Mesmas frutificações da figura A, 24 horas mais tarde. Nesta orientação ficam evidentes as lamelas. C. Vista superior da figura B juntamente com outras frutificações. 62

FIGURA 2 – Morfologia das lamelas analisadas através de MEV. A. Lamelas (seta) em baixo aumento. Barra = 5 μm . B. Basidiolos em vista lateral (setas) e vista superficial da lamela. Barra = 5 μm . C. Vista superficial da lamela mostrando basídio com quatro (seta vermelha), um (seta amarela) e nenhum (seta preta) basidiósporo. Grande número de basidiolos são observados (seta verde). Barra = 5 μm . D. Basídio com quatro basidiósporos. Barra = 5 μm . E. Basídio com três basidiósporos. Barra = 5 μm . F. Basídio com um basidiósporo. Observam-se os esterígmias no basidiósporo ainda ligado ao basídio (seta branca) e três esterígmias após liberação (seta preta). Barra = 5 μm63

FIGURA 3 – Morfologia do esporo. A. Esporos observados através de DIC. Esporo 1: observa-se grande corpo lipídico no seu interior; esporo 2: observa-se pequeno corpo lipídico e superfície rugosa ao redor do mesmo; esporo 3: observa-se rugosidade em toda a sua extensão e corpo lipídico não evidente; esporo 4: utilizado para retirar medição. Barra = 5 μm . B. Esporos observados através de MEV recoberto por ornamentações rugosas-verruculosas (seta). Barra = 2 μm 64

FIGURA 4 – Corpos lipídicos em esporos nas lamelas. A. Quatro basidiósporos em vista lateral (seta fina), e basidiolo (seta grossa) e corados com Vermelho Nilo. Barra = 5 μm . B. Mesmas células da figura A apresentadas em DIC. Barra = 5 μm . C. Vista superior da lamela, evidenciando quatro basidiósporos (setas finas) e basidiolo (seta grossa). Barra = 5 μm . D. Mesmas células da figura C apresentadas em DIC, evidenciando basidiolo granuloso. Barra = 5 μm65

FIGURA 5 – Corpos lipídicos, núcleos e vacúolos em esporos soltos. A. Esporo corado com Vermelho Nilo. Barra = 5 μm . B. DIC respectivo da Fig. A. Barra = 5 μm . C. Esporos corados com Laranja de Acridina, apresentando núcleo (seta branca fina), vacúolos (seta branca grossa) e corpo lipídico (seta vermelha). Barra = 5 μm . D. DIC respectivo da Fig.A. Barra = 5 μm66

FIGURA 6 – Núcleo em esporos soltos. A. Coloração de Laranja de Acridina, mostrando diferentes morfologias apresentadas pelos núcleos. Esporo 1. morfologia redonda. Esporo 2. morfologia irregular. Esporo 3. morfologia achatada. Barra = 5 μm . B. DIC respectivo da figura A. Barra = 5 μm67

FIGURA 7 – Morfologia da cultura e das hifas. A. Placa de petri contendo cultura de *L. sordida*. B. Micélio observado através de MEV. Barra = 100 μm . C. Em maior magnificação observam-se hifas de maior (seta espessa) e menor (seta fina) diâmetros. Barra = 10 μm68

FIGURA 8 – A. Hifas coradas com Laranja de Acridina, visualizando-se núcleos (seta fina) e vacúolos (seta grossa). Barra = 10 μm . B. Respectivo DIC da Fig. A. Barra = 10 μm69

FIGURA 9 – A. Três hifas coradas com Vermelho Nilo. Hifa 1. com corpos lipídicos no seu interior (seta). Hifa 2. Ausência de corpos lipídicos e citoplasma vazio. Hifa 3. região apical. Barra=10 μm . B. DIC respectivo da Fig. A. Barra=10 μm . C. Corpos lipídicos na região da conexão em gancho. Barra= 5 μm . D. Respectivo DIC da Fig. C. Barra= 5 μm . E. Conexão em gancho (seta) processada no programa Adobe Fotoshop – filtro alto-relevo – evidenciando as paredes do septo. Barra= 5 μm70

FIGURA 10 – Caracterização das culturas isoladas. A. Isolados de *P. pulmonarius* se desenvolvendo em MEA. B. Mesmo isolado em BDA pela vista inferior, com marcações de crescimento de 1, 4 e 5 dias após a inoculação. C. Idem à Fig. B, porém crescendo em MEA. D. Isolado de *L. sordida* se desenvolvendo em MEA. E. *L. sordida* em BDA, com marcações de

crescimento de 1, 4 e 5 dias após a inoculação, pela vista inferior. F. Idem à Fig. E, porém crescendo em MEA. 71

FIGURA 11 – Interação de 27.11 em BDA, mostrando duas placas de Petri. A e B. Face superior das duas placas respectivamente. Imagens tiradas com 5 dias, 11 dias e 73 dias após a inoculação. *P. pulmonarius* está do lado esquerdo e *L. sordida* do lado direito da interação. A' e B'. Face inferior das duas placas, com as imagens tiradas na mesma data da face superior. *P. pulmonarius* está do lado direito e *L. sordida* do lado esquerdo da interação.72

FIGURA 12 – Cordas micelianas. A.interação inoculada dia 05.12, em BDA, com cordas micelianas (seta) na frente invasiva de *P. pulmonarius*. B. Maior magnificação da região da seta da Fig. A. C. interação inoculada dia 27.11 em BDA, com cordas micelianas (seta). D. Maior magnificação da região da seta da Fig. C. E. mesma placa da Fig. C, pela face inferior, mostrando cordas micelianas em maior aumento. F. Menor magnificação da Fig. E.....73

FIGURA 13 – Interação de 05.01.04 em BDA, mostrando duas placas de Petri. A e B. Face superior das duas placas respectivamente. Imagens tiradas com 7 dias e 34 dias após a inoculação. *P. pulmonarius* está do lado esquerdo e *L. sordida* do lado direito da interação. A' e B'. Face inferior das duas placas, com as imagens tiradas na mesma data da face superior. *P. pulmonarius* está do lado direito e *L. sordida* do lado esquerdo da interação.....74

FIGURA 14 – Interação de 24.11.03 em MEA, mostrando duas placas de Petri. A e B. Face superior das duas placas respectivamente. Imagens tiradas com 8 dias, 35 dias e 76 dias após a inoculação. *P. pulmonarius* está do lado direito e *L. sordida* do lado esquerdo da interação. A' e B'. Face inferior das duas placas, com as imagens tiradas na mesma data da face superior. *P. pulmonarius* está do lado esquerdo e *L. sordida* do lado direito da interação.....75

FIGURA 15 - Interação de 05.12.03 em MEA, mostrando duas placas de Petri. A e B. Face superior das duas placas respectivamente. Imagens tiradas com 24 dias e 65 dias após a inoculação. *P. pulmonarius* está do lado esquerdo e *L. sordida* do lado direito da interação. A' e

B'. Face inferior das duas placas, com as imagens tiradas na mesma data da face superior. *P. pulmonarius* está do lado direito e *L. sordida* do lado esquerdo da interação.....76

FIGURA 16 - Interação de 05.01.04 em MEA, mostrando duas placas de Petri. A e B. Face superior das duas placas respectivamente. Imagens tiradas com 7 dias e 34 dias após a inoculação. *P. pulmonarius* está do lado esquerdo e *L. sordida* do lado direito da interação. A' e B'. Face inferior das duas placas, com as imagens tiradas na mesma data da face superior. *P. pulmonarius* está do lado direito e *L. sordida* do lado esquerdo da interação.....77

FIGURA 17 – Bandejas com substrato. A. Micélio de *L. sordida* um mês e meio após a inoculação do substrato tratado anaerobicamente. B. Bandeja vista de baixo, com micélio levemente violeta e boa umidade. C. Bandejas da primeira etapa um mês após a inoculação. D. As mesmas bandejas com turfa como solo de cobertura. E. Nove dias após a introdução da turfa. F. Vinte dias após a introdução da turfa. G. Bandeja vista lateralmente, exibindo vigor no seu micélio. H. Vista aproximada do micélio violáceo denso sobre a turfa78

FIGURA 18 – Cultivo selvagem experimental. A. Folhas de bananeira tratadas anaerobicamente. B. Obtenção da umidade ideal do substrato por metodologia manual. C. Preparação da “cama”: escavou-se o solo e preparou-se a primeira camada com as folhas de bananeira. D. Introdução do substrato sobre estas folhas, quebrando-o parcialmente. E. Todo o substrato da bandeja é colocada dentro do buraco escavado. F. O micélio é coberto com mais folhas de bananeira e solo. G. Após o solo, a grama é reintroduzida. H. Dois meses após a introdução do micélio no gramado observa-se sua expansão pelo solo..... 79

FIGURA 19 – Habitat de *L. sordida*. A. Formação de anel de fada em gramado do Museu Oscar Niemeyer, Curitiba, PR. B. Corte de grama mostrando a camada de matéria orgânica onde *L. sordida* habita..... 80

FIGURA 20 – Substrato e semente-inóculo. A. Preparação anaeróbia do substrato para o cultivo de *L. sordida*. B. Semente-inóculo preparada em saco de polipropileno, vinte dias após sua inoculação.....81

FIGURA 21 – Frutificações de *P. pulmonarius*. A. Tufo de cogumelo produzido por técnicas tradicionais de preparo do substrato, mostrando diferentes estágios do seu desenvolvimento. B. Outro cogumelo produzido pela mesma técnica.....82

6 DISCUSSÃO

6.1 Morfologia das frutificações coletadas e das estruturas celulares

A morfologia das frutificações coletadas está de acordo com as descrições fornecidas por ARNOLDS (1982) e PEGLER (1986). De acordo com estes autores, o píleo de *L. sordida* varia de 20-58 mm de diâmetro, sendo primeiro convexo e depois se expandindo, obtendo um umbo obtuso. O píleo é higrófono, absorvendo água e obtendo coloração violácea intensa, ficando mais esbranquiçado à medida que vai secando. Possui suas margens voltadas para baixo e levemente estriadas. Suas lamelas são adnatas e levemente decurrentes. Seu estipe possui 25-60 X 3,5-7 mm. As frutificações encontradas no período deste trabalho estão de acordo com as descrições morfológicas acima.

As lamelas, quando observadas ao MEV, mostraram as estruturas características de basidiomiceto, como descritas em MOORE-LANDECKER (1996), assim como especificidades da espécie em questão, descritas em ARNOLDS (1982) e PEGLER (1986). Entre estas estruturas encontram-se os basídios, células formadoras de basidiósporos, os próprios basidiósporos, além de basidiolos e ausência de cistídios. Também ficou evidente a liberação seqüencial dos basidiósporos, constatação ainda não descrita anteriormente. Ao liberarem seus basidiósporos, parte dos esterígmas fica preso ao basídio e parte encontra-se no esporo, como também demonstrado em JONES e Mc HARDY (1984), em *Coprinus cinereus* (Fig. 2F e 3A – esporo 3).

Os esporos de *L. sordida* são descritos como esporos elipsóides/oblongos, com uma fina, mas distinta ornamentação rugosa-verruculosa (PEGLER, 1982). Esta descrição é verificada em análises de microscopia de campo claro, disponível em sites especializados (<http://www.bioimages.org.uk/HTML/P163022.HT>). Não foram encontradas imagens destes esporos em periódicos indexados. Os nossos resultados mostram, pela primeira vez, análises detalhadas destas ornamentações através de DIC e de MEV. O tamanho dos esporos concorda com as medidas descritas anteriormente, de acordo com ARNOLDS (1982), suas medidas variam de 6,2-9,1 (-11,0) X (3,5-) 3,7-4,4 (-5,0) μm e segundo PEGLER (1986), variam de 5,5-7 X 3-4,5 (6,7 +/- 0,3 X 4 +/- 0,2) μm .

Por esta técnica nota-se (Fig. 3A) que as ornamentações são mais evidentes nos esporos que apresentam menor conteúdo de corpos lipídicos. A ausência das ornamentações na região de

lipídeos de alguns esporos pode ser devida às características da formação da figura por este tipo de microscopia. Nesta técnica os raios luminosos sofrem várias alterações quando atravessam as moléculas, formando figuras em alto relevo. Como o corpo lipídico ocupa grande parte do volume celular, é possível que, ao atravessar esta imensidão lipídica, os raios que são refletidos não têm mais o potencial de formar a figura das ornamentações.

As culturas de *L. sordida*, com típica coloração violácea, quando observadas ao MEV e DIC mostraram micélio formados por hifas apresentando aspectos característicos da classe Badiomycetes, como as conexões em gancho descritas em MOORE-LANDECKER (1996).

6.2 Características citológicas das estruturas celulares analisadas

Os materiais analisados com o corante vital Vermelho Nilo (Sigma[®]) evita os artefatos comuns no estudo de corpos lipídicos em células fixadas, permitindo visualizá-los na célula viva, sendo utilizada pela primeira vez em fungos em THINES et al. (2000).

A abundância de lipídios observada nos esporos está em conformidade com a presença destes compostos em esporos e conídios de um grande número de fungos, como por exemplo, em diferentes espécies de *Colletotrichum* (MIMS et al., 1995; SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1998), em *Psilocybe cubensis* (RUCH & MOTTA, 1987) e em *Agaricus campestris* (RUCH & NORTH, 1988). Já foi observado anteriormente, em basidiósporo de *A. campestris* (RUCH & NORTH, 1988), uma morfologia e tamanho similar dos corpos lipídicos como os verificados no presente trabalho. Porém esta morfologia difere da encontrada em esporos de outros fungos, como em conídios de *Colletotrichum* sp. Nestas espécies, o citoplasma dos conídios está lotado de pequenos corpos lipídicos, os quais podem apresentar formato arredondado bastante irregular (MIMS et al., 1995; SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1998).

Está bem demonstrado que os corpos lipídicos apresentam tamanhos variados, podendo uma única gota lipídica ocupar todo o volume citoplasmático, como no caso de adipócitos, e até mesmo ter um tamanho menor que um micrômetro, como em algumas células vegetais (MURPHY, 2000; ZWEYTICK et. al., 2000). Corpos lipídicos menores também foram verificados em esporos retirados a partir de esporadas. É possível que esta variação de tamanho deva-se à idade dos mesmos, uma vez que a esporada já havia sido coletada há aproximadamente 20 dias. A diminuição do volume dos lipídios durante o envelhecimento já foi demonstrado em *C.*

graminicola, *C. gloeosporoides* e *C. acutatum* (VAN DYKE e MIMS, 1990; MIMS et al., 1995; CARNEIRO 2003). Este fato ocorre devido à sua função de suprir o gasto energético do esporo, quando este se encontra em substratos ausentes de nutrientes exógenos, determinando a diminuição de seu volume com o passar do tempo.

A presença de pequenos depósitos lipídicos em hifas, especialmente em hifas menores e em regiões de crescimento pode ser explicada em função das características do micélio. À medida que a hifa se expande, observa-se intensa atividade metabólica e demanda energética nas regiões de crescimento, enquanto as regiões mais velhas se vacuolizam ou transferem seu conteúdo para as regiões de crescimento, esvaziando-se. Não foram encontrados relatos de corpos lipídicos em hifas, no entanto estas estruturas estão demonstradas em tubo germinativo de *Uromyces phaseoli* e de *C. truncatum* (HOCH & STAPLES, 1987).

A presença de vacúolos em fungos já foi descrita em várias estruturas celulares, como hifas, demonstrado em MARKHAM (1995), esporos, em KERRIGAN & MIMS, (1993), e também em apresórios de fungos patogênicos (THINES et al., 2000). Nos últimos anos tornou-se óbvio que esta organela é altamente complexa e desempenha funções fundamentais para a fisiologia celular de fungos (MARKHAM, 1995; SCHADECK et al., 2003). Em esporos de *L. sordida*, os dados mostram o aparecimento de vacúolos concomitante com a diminuição do tamanho do corpo lipídico, permitindo especular sobre a relação entre estas duas organelas, uma vez que lipídios em fungos são hidrolisados no interior de vacúolos (SCHADECK; LEITE; BUCHI, 1998). Pode-se supor que à medida que o esporo envelhece, utiliza as reservas lipídicas via vesículas ou vacúolos, como ocorre em outros esporos, descritos em SCHADECK; LEITE; BUCHI (1998) e CARNEIRO et al. (2003).

As análises mostraram que os núcleos nos esporos apresentam morfologia variada. São aparentemente empurrados pelo corpo lipídico contra a parede celular quando este apresenta seu tamanho máximo, mostrando morfologia achatada. À medida que os corpos lipídicos dos esporos diminuem de tamanho, os núcleos tornam-se mais esféricos. Presume-se que o corpo lipídico determina a morfologia do núcleo na arquitetura intracelular devido a um efeito mecânico.

6.3 Interações Micelianas

Observou-se durante este trabalho que *P. pulmonarius* habita ambientes florestais e se desenvolve em recursos delimitados, como galhos numa floresta, portanto encontra recursos heterogeneamente distribuídos no espaço e no tempo. Como são confinados ao recurso que utilizam, podem desenvolver cordas micelianas ou rizomorfas para conectá-los, estratégia descrita por BODDY (1993) e observada nos experimentos de interação. *L. sordida*, por outro lado, forma anéis de fadas e não está confinado ao recurso que utiliza, pois este é o solo. Coloniza o substrato como se este fosse contínuo, não sendo restrito a ele. Esta estratégia também é citada por BODDY (1993) para fungos que se desenvolvem em anéis de fada.

As diferenças nas taxas de crescimento radial, em meios de cultura com diferentes valores nutritivos, podem estar relacionadas com seus diferentes modos de vida. Em MEA 2%, meio pobre que contém apenas maltose, *P. pulmonarius* exibiu uma taxa de crescimento suavemente maior do que em BDA, considerado um meio rico. Em BDA: $K_r = 0,47$ e em MEA: $K_r = 0,52$. Uma vez que vive em substratos confinados, quando se encontra em meio pobre, pode possuir como estratégia de sobrevivência o rápido crescimento miceliano à procura de novas fontes, a fim de obter energia suficiente para frutificação. *L. sordida* habita um ambiente onde o recurso não está confinado, está disperso pelo meio, colonizando o substrato como se este fosse contínuo. Portanto possivelmente seu micélio não precisará exibir uma taxa de crescimento maior em meios pobres quando comparado a meios ricos, pois no solo os nutrientes se encontram espalhados. O que ocorre é o inverso. Em BDA, $K_r = 0,49$ e em MEA, $K_r = 0,41$.

As taxas de crescimento radial, nas médias gerais das duas espécies interagindo em BDA e MEA, mantiveram uma relação similar aos valores encontrados para seus desenvolvimentos em culturas isoladas. Em culturas isoladas as taxas foram respectivamente (7 dias após inoculação), para *P. pulmonarius* e *L. sordida*: BDA: $K_r = 0,47$ e $0,49$. MEA: $K_r = 0,52$ e $0,41$. Em interação os valores das médias gerais obtidos foram (4-5 dias após a inoculação), em BDA: $K_r = 0,44$ e $0,45$. MEA: $K_r = 0,46$ e $0,34$.

Em BDA houve uma diferença muito pequena entre as taxas de crescimento de uma espécie em relação à outra, tanto em culturas isoladas quanto em placas com interação. Enquanto em MEA, a taxa de crescimento radial de *P. pulmonarius* foi maior nas duas situações. Como visto nas figuras 10C e 10F, *P. pulmonarius* se desenvolveu levemente mais rápido que *L.*

sordida em MEA. Entretanto os valores obtidos no teste t mostraram que estas diferenças não foram significativas quando utilizado um nível de significância de 95%. Nos cálculos realizados, comparando-se as duas espécies crescendo isoladamente MEA, o valor de t se aproximou muito do seu limite possível, enquanto em BDA este valor foi baixo.

Os valores numéricos das taxas em culturas isoladas foram maiores do que os valores nas placas de interação devido às datas de medições serem 7 e 4-5 dias respectivamente. É possível supor com estes cálculos, que os metabólitos voláteis liberados por cada espécie, não interferiram no desenvolvimento da espécie antagonica, como descreve MOORE-LANDECKER (1996). Isso acarretaria numa diminuição mais drástica na taxa de crescimento radial das espécies quando em interação e a formação de um halo de inibição.

Quando foram comparados os valores das taxas de crescimento radial de *P. pulmonarius*, se desenvolvendo em BDA e em MEA, bem como de *L. sordida* também se desenvolvendo nestes dois meios, utilizando o teste t, verificou-se que também não houve diferença significativa entre eles. Mesmo obtendo-se médias de *L. sordida* razoavelmente diferente entre si.

Nas placas de interação contendo BDA, *P. pulmonarius* mostrou alta capacidade de combate, possivelmente devido a uma alta fonte nutritiva. Seu micélio foi capaz de avançar em frentes invasivas intensas e formar cordas micelianas. A partir deste momento pôde ter também utilizado a biomassa morta de *L. sordida* como fonte nutritiva. Quando em MEA, provavelmente por possuir uma fonte nutritiva menor, possuiu menos capacidade de avançar sobre o antagonista. Neste caso *L. sordida* foi, em alguns casos, capaz de controlá-lo com suas capacidades antagonísticas de combate. Outro fator importante a ser considerado é o fato de *L. sordida* não ser a espécie sucessora natural de *P. pulmonarius*. Portanto não era de se esperar que tivesse tanta facilidade de combatê-la, como descrito em HOLMER, RENVALL e STENLID (1997).

Quando em BDA, *P. pulmonarius* substituiu *L. sordida* em todas as repetições, independente dos valores das taxas de crescimento. Em MEA a taxa de crescimento radial pode ter interferido nos resultados das interações, mesmo sem ter dado valores significativos de t. Nas placas onde a taxa de crescimento de *P. pulmonarius* foi consideravelmente maior, houve a substituição por parte desta espécie. Apenas na placa B, inoculada no dia 24 de novembro, sua taxa de crescimento foi maior, mas mesmo assim, *L. sordida* conseguiu barrar a tentativa de substituição por parte de *P. pulmonarius*. Nas placas inoculadas no dia 05 de dezembro de 2003, as taxas de crescimento foram muito similares e o resultado de ambas foi impasse. Resultados

que diferem dos que ocorreram em BDA. Estes resultados também podem ser devido a outros fatores desconhecidos, pois, de acordo com BODDY (2000), mesmo sob condições experimentais idênticas, os resultados nem sempre são os mesmos.

Nestes experimentos foi possível visualizar as diferentes estratégias por eles utilizadas. *P. pulmonarius* é mais invasivo, apresentando algumas vezes cordas micelianas, que aumentam sua velocidade de crescimento linear, por serem hifas paralelas e pouco ramificadas. Enquanto *L. sordida* avança apenas com micélio muito ramificado.

Nas repetições onde se formou um halo sobre *P. pulmonarius*, provavelmente seu micélio estava morrendo nestas regiões pela presença de metabólitos secundários ou enzimas líticas produzidas por parte de *L. sordida* (VERGAGEN, 1996; SIDOROVA; VELIKANOV, 2000; MAZUR, et al, 1996).

De acordo com BODDY (2000), em culturas laboratoriais os micélios podem formar barreiras estacionárias que resistem a invasões, frentes invasivas ou cordas micelianas. Todos estes comportamentos foram visualizados nos experimentos. As barreiras estacionárias ocorreram em praticamente todas as repetições, a partir do momento em que a interação começou a ocorrer. Em alguns casos a barreira permaneceu sem substituição de nenhuma espécie e em outros casos houve total substituição. Nas placas onde o crescimento de *P. pulmonarius* foi mais pronunciado, formando a barreira de interação a seu favor, *L. sordida* foi totalmente englobado, como o observado na figura 12F. As duas espécies produziram frentes invasivas em algumas placas. Por exemplo, na figura 14, placa de Petri B, logo após a barreira ter se formado (8 dias), *P. pulmonarius* invadiu *L. sordida* produzindo uma frente invasiva sobre seu micélio. Entretanto após algumas semanas foi possível visualizar *L. sordida* também se desenvolvendo sobre *P. pulmonarius*, numa frente invasiva.

Segundo BODDY (2000), nas regiões distantes das zonas de interações há uma redução da densidade miceliana devido à sua redistribuição. Isto de fato ocorreu nos experimentos. Na figura 14, placa A, é possível visualizar o micélio de *P. pulmonarius* muito denso sobre *L. sordida*. Se compararmos a figura de oito dias e de setenta e seis dias após a inoculação, é possível visualizar essa redistribuição de sua biomassa.

De acordo com BODDY (2000) interações em ágar são normalmente acompanhadas de produção pigmentar. Na Fig. 13, placas A' e B', após sete dias da inoculação, é possível visualizar esta pigmentação amarelada na região onde a barreira está se formando. Também é

possível visualizá-la com coloração muito intensa, tornando-se castanha, na Fig. 11 A' (11 dias após a inoculação).

RAYNER, BODDY e DOWSON (1987), descrevem o micoparasitismo como interações sem o reconhecimento da espécie parasita pela espécie anfitriã. Portanto as interações que ocorreram neste trabalho, entre as duas espécies estudadas, é denominada de interferência e não micoparasitismo, pois existe a formação de zonas pigmentadas e reações diversas em ambas.

Nas placas do experimento controle, com dois inóculos de *L. sordida*, houve uma leve repulsão entre as hifas dos diferentes inóculos na região central da placa, quando estas se encontraram muito próximas. Este fato deve-se provavelmente devido às suas polaridades opostas por estarem na mesma direção. As hifas das bordas, que possuem direções diferentes desde o momento do encontro, foram as primeiras a se anastomosarem. Este resultado ocorreu tanto no BDA quanto no MEA. O alongamento apical das hifas é um exemplo clássico de crescimento celular polarizado, conhecido há mais de um século (REINHARDT⁹, *apud* MARKHAM, 1995). Apesar disso os mecanismos que compreendem o crescimento polarizado são pouco compreendidos.

Através das observações ao microscópio confocal, observou-se que algumas hifas de *L. sordida* com maior diâmetro apresentavam menor conteúdo citoplasmático do que hifas mais finas e provavelmente mais novas (Fig. 9A), podendo se apresentar até vazias. Este fato demonstra um possível remanejamento do conteúdo celular ao longo do micélio, o que pode estar ocasionando as tonalidades castanhas de micélios mais velhos, ausentes de pigmentação violácea, quando vistos macroscopicamente nas placas de Petri. Esta característica de *L. sordida* pode estar relacionada com seu nicho, uma vez que se desenvolve em anéis de fadas, expandindo seu micélio continuamente dentro do solo, formando novos anéis ao longo do tempo e frutificando apenas na região do maior anel. Neste caso o micélio dos primeiros anéis poderia estar transferindo citoplasma para regiões mais novas.

A partir dos resultados de interação miceliana é possível especular sobre as potenciais estratégias que surgiram ao longo das histórias evolutivas das espécies estudadas, e que garantiram suas sobrevivências até os dias atuais.

⁹ REINHARDT, M. O. Das Wachstum der Pilzphen. Ein Beitrag zur Kenntnis des Flächenwachstums vegetalischer Zellmembranen, *Jahrbuch für Wissenschaftliche Botanik*, v. 23, p. 479-566, 1892.

6.4 Cultivo de *L. sordida*

Este presente trabalho utilizou como base a metodologia descrita por BALASUBRAMANYA; KATHE (1996), sobre o cultivo de cogumelos comestíveis utilizando tratamento anaeróbico do substrato. A safra obtida apresentou a mesma quantidade de biomassa de frutificação quando comparada à safra obtida pela metodologia tradicional, a qual utiliza pasteurização e/ou esterilização do substrato.

De acordo com BALASUBRAMANYA; KATHE (1996) o substrato é colocado dentro de sacos plásticos e introduzido em um digestor anaeróbio. Neste digestor há um consórcio, com mistura microbiana mantida em meio líquido, preparado a partir de esterco de animais. As bolsas são retiradas depois de sete dias no digestor e o substrato é colocado solto em outro balde, onde é lavado com água proveniente de torneira, mexido e decantado nesta água. Após isto o substrato é posto novamente em bolsas e inoculado da maneira tradicional para o cultivo de *Pleurotus* sp. Os microrganismos presentes no substrato após o tratamento tradicional, não estão presentes após o tratamento anaeróbio, pois são removidos pelo fluido do digestor. Os microrganismos que ficarem aderidos à superfície do substrato são removidos com a lavagem por água de torneira, ficando o seu número reduzido significativamente.

Outro resultado importante encontrado por BALASUBRAMANYA; KATHE (1996), é que durante a corrida miceliana, os contaminantes que ocorrem normalmente em substratos tratados da maneira tradicional, que são espécies de *Trichoderma*, *Penicillium*, etc., não ocorrem no tratamento anaeróbio. As bactérias encontradas são normalmente facultativas, formas gram-negativas, e os fungos encontrados são normalmente não esporulentos.

A metodologia anaeróbia foi adaptada às condições locais de trabalho nestes experimentos. Das seis bandejas, nenhuma delas apresentou qualquer contaminação por fungos de esporulação verde até total colonização do substrato pelo inóculo, que neste caso demorou um período de até um mês para ocorrer. Este valor depende da quantidade de substrato e inóculo utilizado. As bandejas da segunda etapa foram mantidas por mais tempo que o necessário com o filme de PVC (quase dois meses), para então serem introduzidas em gramados, uma vez que não foi experimentado o solo de cobertura. Em uma destas bandejas, durante o período que decorreu do primeiro para o segundo mês, ocorreram contaminações por fungos e por larvas. Entretanto esta contaminação permaneceu localizada e não foi um problema para o micélio em questão. Isso

demonstra que imediatamente após a colonização do substrato, a camada de cobertura deve ser introduzida ou este material deve ser transferido diretamente para o cultivo selvagem.

A introdução do substrato às bandejas e a inoculação da semente-inóculo ocorreu em um ambiente estéril para a primeira e para a segunda etapa dos experimentos. Para a terceira, esta ocorreu em um ambiente não estéril. A última etapa teve um crescimento miceliano positivo, sendo um resultado importante, pois mostra que o método pode ser desenvolvido em locais onde não existe infra-estrutura laboratorial.

Conclui-se que o tratamento anaeróbico do substrato é efetivo e mais experimentos utilizando esta técnica, tanto para *L. sordida* quanto para outros fungos cultivados comercialmente, são importantes. O custo financeiro e energético de produção, com esta técnica, é extremamente menor quando comparado com o custo da pasteurização, além de ser ambientalmente harmonioso.

O consumo de *L. nuda* pela comunidade européia é alto, portanto seu cultivo torna-se importante (STIJVE, 1999). Atualmente obtêm-se frutificações de *L. nuda* com sucesso na Bélgica, no Instituto "Proefcentrum voor de champignonteelt". Segundo DESRUMAUX (em fase de elaboração), seu cultivo utiliza a técnica tradicional de cultivo de *A. bisporus*, ou seja, compostagem do substrato. Esta metodologia exige um custo elevado, seja com compostagem, com a pasteurização e/ou esterilização do substrato e/ou com equipamentos que auxiliam o cultivo. Portanto é apenas viável para o cultivo em larga escala, sendo inviável de ser utilizada no desenvolvimento deste trabalho.

A produção da semente-inóculo no presente trabalho foi realizada em pecíolo de folha de bananeira, diferentemente do tradicional, que seria em grãos ou palha de cereais, devido à facilidade de obtenção e ausência de custos, pois é muito comum em nosso meio. Os experimentos de cultivo realizados também utilizaram folhas de bananeira. Esta escolha, além de ser útil para os experimentos, tem a vantagem de poder ser aplicada em diferentes regiões onde metodologias que requerem custos elevados não podem ser desenvolvidas. Situação freqüente em nosso país.

Durante o período de tentativas de frutificação, foram realizados contatos com o Instituto "Proefcentrum voor de champignonteelt". Concluiu-se em conjunto que os parâmetros por eles utilizados no cultivo, também podem ser utilizados para o cultivo em folhas de bananeira tratadas anaerobicamente, uma vez que o micélio se desenvolveu muito bem neste substrato, bem

como sobre a turfa. A turfa utilizada neste trabalho apresentava um pH entre 6,5 e 8,0, pois já estava preparada para o cultivo de *A. bisporus*. Este valor condiz com o da turfa utilizada pelo Instituto belga, a qual possui pH igual a 7. De acordo com DESRUMAUX (em fase de elaboração), foi constatado que a taxa de 5% de semente-inóculo (feita em grãos) a ser introduzida no substrato (pH igual a 7-7,5), é a que produz maior vantagens em relação ao custo da produção da semente-inóculo em relação à quantidade total de cogumelos frescos produzidos. Portanto experimentos que utilizem uma porcentagem menor do que a utilizada neste presente trabalho (15%), são importantes, pois a relação custo/benefício é três vezes maior.

Segundo a metodologia por eles utilizada, o substrato inoculado fica coberto com um plástico com micro-perfurações, como o PVC, num ambiente onde a temperatura é de 25 a 28°C, com alta concentração de CO₂ e alta umidade relativa do ar (95%). Depois de aproximadamente 23 dias de colonização, introduz-se o solo de cobertura. Este solo é colocado sobre o substrato já colonizado, com a espessura entre 2,5 a 4,5 cm, dependendo da cepa utilizada. Nessa etapa há então a aeração, e após a colonização do solo de cobertura, a frutificação é estimulada diminuindo-se a concentração de CO₂ do ar, ficando esta entre 700-800 ppm (0,07 a 0,08%). A umidade relativa do ar nesta etapa se mantém alta e a temperatura atmosférica diminui para 14-15°C, com uma queda da temperatura inicial (25-28°C) abrupta.

DESRUMAUX também comprovou que as frutificações não mostram diferença de tamanho ou coloração se o substrato for mantido no escuro ou se for mantido num regime de fotoperíodo de 12 horas. As frutificações com este procedimento começam a aparecer 60-70 dias após a introdução do solo de cobertura, um tempo muito mais longo que as frutificações de *A. bisporus*. A irrigação do solo de cobertura após a primeira frutificação parece ser um fator importante para o tamanho da safra. Com 100 kg composto/m², obtêm-se, com esta metodologia, em oito semanas, 7-9kg cogumelos frescos /m².

O ambiente onde foram colocadas as bandejas do experimento ficou com uma média de umidade relativa do ar de 82,4%, entretanto de acordo com DESRUMAUX, se a mesma estiver abaixo de 90%, sua frutificação é inibida. Apesar da vaporização diária do solo de cobertura na tentativa de melhorar sua umidade, uma vez que mesmo com 82,4% da umidade relativa do ar, a turfa ainda se encontra seca, acreditou-se que as condições ideais de umidade para sua frutificação não foram atingidas. Além disso, desconhecia-se o fato de que a vaporização sobre o solo de cobertura, que acarreta gotas de água sobre a sua superfície retarda a frutificação de *L.*

nuda, provavelmente também retardando de *L. sordida*. O fotoperíodo utilizado foi o natural, de 12h, com luminosidade baixa, que é ideal para a frutificação de *L. nuda*.

A temperatura do ambiente nos experimentos ficou muito próxima do ideal para *L. nuda*. Ao invés de 25-28°C, ficou com uma média de 24,8°C. A concentração de CO₂ do ar não pôde ser medida com precisão, porém o ambiente apresentava uma baixa ventilação com circulação de ar constante. Devido à infra-estrutura não ideal para a frutificação desta espécie, não foram obtidas maneiras de manter o micélio de *L. sordida*, após a introdução do solo de cobertura, em baixas temperaturas (14-15°C), com alta umidade (95%) e com uma maior ventilação. Uma maior ventilação, quando utilizada para diminuir a concentração de CO₂ do ar e a temperatura do ambiente, retirava a umidade relativa do ar. Portanto não foi possível manter todos os parâmetros necessários para que houvesse frutificação.

O contato com o Instituto “Proefcentrum voor de champignonteelt” ocorreu apenas no mês de novembro, portanto como as frutificações da primeira etapa dos experimentos estavam demorando muito tempo para ocorrer, após 23 dias de introdução do solo de cobertura, foi optado por deixar o micélio em um lugar sombreado no jardim, pois o micélio já estava perdendo sua qualidade. Neste momento desconhecia-se o fato de que as frutificações de *L. nuda* demoram de 60-70 dias para ocorrer. Portanto a partir das informações obtidas com o Instituto belga, concluiu-se que a infra-estrutura utilizada para os experimentos deveria ser otimizada para obter-se sucesso com as frutificações. Esta introdução em ambientes naturais teve neste projeto o propósito de aumentar a biodiversidade local, adicionar um cogumelo comestível em jardins de pessoas que apreciam sua degustação e realizar uma pesquisa de base para futuros projetos de micorremediação.

O resultado positivo da introdução do micélio de *L. sordida* em gramados (Fig. 18H), cultivado com uma metodologia que exige um custo baixíssimo, complementa a lista de basidiomicetos possíveis de serem utilizados em processos de micorremediação. Pois além de seu micélio ser facilmente expandido, estudos comprovam a capacidade que espécies de basidiomicetos possuem de absorção de metais pesados do meio e concentração dos mesmos, por translocação, em seus corpos de frutificação (PETKOVSEK, 2002). *L. sordida* demonstra, portanto, um grande potencial para aproveitamento nesta área, podendo começar a ser introduzida em ecossistemas degradados e/ou poluídos, uma vez que tornou-se claro que a obtenção miceliana em larga escala de *L. sordida* com este método é simples e barata.

A etapa da decomposição orgânica e portanto da incorporação de nutrientes ao solo, ciclando os nutrientes, raramente é desenvolvida em projetos de recuperação de áreas degradadas. É um tópico que, além de muito interessante, pode otimizar o desenvolvimento de plantas, conseqüentemente acelerando todo o processo biológico no local, recriando ecossistemas que foram destruídos às custas das ações do homem. Mais estudos relacionados aos itens expostos neste presente trabalho são importantes, pois o conhecimento em cada uma das áreas complementa a outra, otimizando a compreensão do funcionamento biológico em suas inúmeras facetas.

7 CONCLUSÃO

Este presente trabalho cumpriu as metas traçadas, obtendo-se uma compreensão abrangente da biologia de *Lepista sordida*. Foram feitas investigações microscópicas, estudos de comportamento miceliano, além de trabalhos relacionados com a expansão de seu micélio, que possui inúmeras finalidades.

1. A morfologia de esporos e hifas de *L. sordida* foi caracterizada por MEV. Os esporos apresentam parede celular rugosa-verruculosa e suas hifas apresentam diferentes diâmetros, além das famosas conexões em gancho.
2. As identificações citoquímicas das reservas lipídicas, vacúolos e núcleos foram realizadas em esporos e hifas, utilizando-se os corantes: Vermelho Nilo e Laranja de Acridina. Observou-se que o tamanho dos corpos lipídicos influi na morfologia nuclear. Em inúmeros esporos, demonstrou-se a presença de grandes corpos lipídicos no citoplasma e sua relação de volume inversa com os vacúolos de cada célula. Quanto menor a quantidade de lipídio, mais e maiores vacúolos ácidos são visualizados, sugerindo digestão lipídica no seu interior. As mesmas estruturas celulares foram caracterizadas nas suas hifas.
3. Experimentos de interação miceliana entre *L. sordida* e *P. pulmonarius* demonstraram suas versatilidades de estratégias de combate. Nas placas com BDA como meio de cultura, *P. pulmonarius* substituiu totalmente *L. sordida*, enquanto nas placas contendo MEA 2%, houve tanto esta mesma substituição quanto o impasse.
4. A verificação do método de tratamento anaeróbico do substrato, quando utilizado para a espécie em questão, obteve um resultado positivo. Os substratos colonizados foram introduzidos em seus ambientes naturais (gramados) e observou-se expansão miceliana a partir deste para o solo ao seu redor. Portanto também se obteve um resultado positivo com esta técnica, denominada de cultivo selvagem, o qual possui inúmeras finalidades, uma delas, extremamente necessária atualmente, é a micorremediação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLDS E. Ecology and coenology of macrofungi in grasslands and moist heathlands in Drenthe, the Netherlands, Part II. Autecology. Part III. Taxonomy. **Biblioth. Mycol.** v. 90, 501 p., 1982.

BALASUBRAMANYA R. H.; KATHE A. A. Short Communication: An Inexpensive Pretreatment of Cellulosic Materials for Growing Edible Oyster Mushrooms. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 303-305. 1996.

BAKER L. The Real Magic of Mushrooms. **ODE**. p. 53-55, 2003.

BEIGUELMAN B. **Curso prático de bioestatística**. Ribeirão Preto. ed. SBG, 1996.

BODDY L. Saprotrophic cord-forming fungi: warfare strategies and other ecological aspects. **Mycological Research**. v. 97(6), p. 641-655, 1993.

BODDY L. Saprotrophic cord-forming fungi: the challenge of heterogeneous environments. **Mycologia**, v. 91(1), p. 13-32, 1999.

BODDY L. MiniReview: Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. **FEMS Microbiology Ecology**, Europe, v. 31, issue 3, p. 185-194. 2000.

CARNEIRO M. S. et al. *Colletotrichum acutatum*. **Conidia Aging**. p. 177, 2003.

CARLILE M. J. The success of the hypha and mycelium. In: GOW N. A. R.; GADD G. M. **The Growing Fungus**. ed. Chapman & Hall, 1995. p 1-20.

CHANG, S.; MILES P. G. **Edible Mushrooms and their Cultivation**. ed. CRC Press, 1989.

DESRUMAUX B., et al. Growing *Lepista nuda*: a survey of 3 years of research and experiences [2004?]. Em fase de elaboração.

DOWSON C. G., RAYNER A. D. M. BODDY L. The form and outcome of mycelial interactions involving cord-forming decomposer basidiomycetes in homogeneous and heterogeneous environments. **New Phytology**. v. 109, p. 423-432, 1988.

DULGER B., ERGUL C., GUCIN F. Antimicrobial activity of the macrofungus *Lepista nuda*. **Fitoterapia**, v. 73:7-8, p. 695-697. 2002.

EDWARDS R. L. Part II Cultivated fungi in Agaricales, section A. *Agaricus bisporus*, Cultivation in Western Countries: Growing in Houses. In: CHANG; HAYES. **The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms**. ed. Academic Press, Inc., 1978. p. 300-336.

FLACHOWSKY G.; KAMRA D. N.; ZADRAZIL F. Cereal straws as animal feed: Possibilities and limitations. **Journal of Applied Animal Research**. v. 16, n. 2, p. 105-118. 1999.

FRITSCHÉ G. Part II Cultivated fungi in Agaricales, section A. *Agaricus bisporus*, Breeding work. In: CHANG; HAYES. **The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms**. ed. Academic Press, Inc., 1978. p. 239-250.

GASPAR, M. L.; POLLERO, R. J.; CABELLO, M. N. Triacylglycerol consumption during spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **JAOCs**. v. 71, p. 449-452, 1994.

GOW, N. A. R. Tip growth polarity. In: GOW N. A. R.; GADD G. M. **The Growing Fungus**. ed. Chapman & Hall, 1995, p. 277-295.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**, John Wiley; Sons, Inc., Publication, p. 76-80, 375-378. 1994.

GRIFFITH G. S.; RAYNER A. D. M. Interspecific interactions and mycelial morphogenesis of *Hypholoma fasciculare* (Agaricaceae). **Nova Hedwigia**. v. 59 (1-2), p. 47-75, 1994.

GUERREIRO, R. T.; SILVEIRA R. M. B. 2. **Glossário Ilustrado de fungos**. ed. UFRGS Editora, 2003.

GUZMAN G.; MARTINEZ D. *Pleurotus* growing on coffee-pulp in a semi-industrial plant – A new promising mushroom cultivation technology in the subtropics of Mexico. ed. **Mushroom Newsletter Tropical**. v, 6(3), p. 7. 1986.

HAYES W. A. Part II Cultivated fungi in Agaricales, section A. *Agaricus bisporus*, Nutrition, Substrates, and Principles of Disease control. In: CHANG; HAYES. **The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms**. ed. Academic Press, Inc., 1978. p. 229.

HOCH, H. C.; STAPLES, R. C. Structural; chemical changes among the rust fungi during appressorium development. **Ann. Rev. Phytopathology**. v. 25, p. 231-24, 1987.

HOLMER L.; RENVALL P.; STENLID J. Selective replacement between species of wood-rotting basidiomycetes, a laboratory study. **Mycological Research**, Great Britain, v. 101(6), p. 714-720, 1997.

JEFFRIES P. Mycoparasitism. In: **The Mycota IV**. Environmental and Microbial Relationships (Wicklow D. T. and Söderström B., Eds.), Springer, Berlin, p. 149-164, 1997.

JONES D.; Mc HARDY W.J. Scanning electron microscopy of cryofixed and critical point dried *Coprinus cinereus*. **Micron and Microscopica acta**. Great Britain. v. 16, n. 2, p.115-123, 1985.

KERRIGAN, J.; MIMS, C. W. Ultrastructural cytochemical investigations of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, causal organism of pecan anthracnose. **The BEAM Newsletter of the Southeastern Electron Microscopy Society**., v. 9, p. 21-25, 1993.

KLIONSKY, D. J.; HERMAN, P.K.; EMR, S. D. The fungal vacuole: composition, function and biogenesis. **Microbiology Review**, v. 54, p. 266-292, 1990.

LAERE V. A., Intermediary metabolism. In: GOW N.; GADD G. **The Growing Fungus**. ed. Chapman & Hall, 1995. p. 211.

LEITE, B.; NICHOLSON, R. L.. Mycosporine-alanine, a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Experimental Mycology**. v. 16, p. 76-86, 1992.

LILLOA. The Agaricales (Mushrooms) in Modern Taxonomy. Tucuman, República Argentina: v. 22, 1949. 833 p.

MAIA, L. C.; KIMBROUGH, J. W.; BENNY, G. L. Ultrastructure of spore germination in *Gigaspora albida* (Glomales). **Mycologia**. v. 86, p. 343-349, 1994.

MARKHAM P. Organelles of filamentous fungi. In: GOW N. A. R.; GADD G. M. **The Growing Fungus**. ed. Chapman & Hall, 1995, p. 81-82, 1995.

MARKHAM P.; BAZIN M. J. Decomposition of Cellulose by Fungi. In: ARORA, D. **Handbook of Applied Mycology**. Delhi: ed. CRC Press, 1983. p. 393-424.

MARTIN W., et al.. Early cell evolution, eukaryotes, anoxia, sulfide, oxygen, fungi first (?), and a tree of genomes revisited. **Life**. v. 55, p. 193-204, 2003.

MAZUR X, et al. Two new bioactive diterpenes from *Lepista sordida*. **Phytochemistry**. Set. v. 43 (2), p. 405-407, 1996.

MIMS C. W., et al. Ultrastructure of conidia and the conidium aging process in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. **Internal Journal of Plant Science**. v. 156, p. 9-18. 1995.

MOORE-LANDECKER E. **Fundamentals of the Fungi**. 4. ed. Prentice-Hall Inc., 1996. p. 371-403.

MURPHY D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**. v. 40(5), p. 325-438, Sept. 2001.

PEGLER, D. N. Agaric Flora of Sri Lanka. **Kew Bull. Addit. Ser.** v. 12, p.1-520.

PETKOVSEK S., et al. Cd, Pb, Hg and As in fruiting bodies of higher fungi from the forest landscape of the Salek Valley. **Zbornik-Gozdarstva-in-Lesarstva**. v. 67, p. 5-46. 2002.

PROSSER J. I. Mathematical modeling of vegetative growth of filamentous fungi. In: Arora, D. **Handbook of Applied Mycology**. Delhi: ed. CRC Press, 1983. p. 591-623.

RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN S. E. **Biologia Vegetal**. 5. ed. Guanabara Koogan, 1992. p. 436-453.

RAYNER A. D. M.; BODDY L.; DOWSON C. G. Temporary parasitism of *Coriolus spp.* by *Lenzites betulina*: a strategy for domain capture in wood decay fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, Great Britain, v. 45, p. 53-58, 1987.

RIBEIRO. J. B.; WAGNER, M. A.; SCHADECK, R. J.G. 2002. Estudos sobre autofagia no fungo *Colletotrichum acutatum*; Anais do XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, 16-19/07 de 2002a, Porto Alegre, RS, p. 189.

RIBEIRO, J. B.; WAGNER, M. A.; GRAF, L.; EIRAS- STOFELLA, D. R.; TOMAZ, R. AND SCHADECK, R. J. G. 2002b. Vacuoles in *Colletotrichum acutatum* conidia: characteristics and function in lipid bodies mobilization. Trabalho submetido à Canadian Journal of Microbiology.

RUBEN, D. M.; STAGHELLINI, E. Ultrastructure of oospore germination in *Rhizium aphanidermatum*. **American Journal of Botany**. v. 65, p. 491-501, 1978.

RUCH, D., G., BURTON, K. W., INGRAM, L. An occurrence of the glyoxylate cycle in basidiospores of homobasidiomycetes. **Mycologia**. v. 83, p. 821-825. 1991.

RUCH, D. G.; MOTTA, J. J. Ultrastructure and cytochemistry of dormant basidiospores of *Psilocybe cubensis*. **Mycologia**. v. 79, p. 387-398, 1987.

RUCH, D. G., NORTH, M. C. Ultrastructure of dormant basidiospores of *Agaricus campestris*. **Canadian Journal of Botany**. v. 66, p.583-587. 1988.

SCHADECK, R. J. G.; LEITE, B. BUCHI; D. F. Lipid mobilization and acid phosphatase activity in lytic compartments during conidium dormancy and appressorium formation. **Cellular Structure and Function**. v. 23 p. 333-340, 1998.

SCHADECK J. G.; RANDI M. A. F. R.; BUCHI D. F.; LEITE B. Vacuolar System of Ungerminated *Colletotrichum Graminicola* Conidia: Convergence Of Autophagic and Endocytic Pathways. **FEMS Microbiology Letters**. 10782: 1-7, 2002.

SIDOROVA I.I.; VELIKANOV L.L. Bioactive substances of agaricoid basidiomycetes and their possible role in regulation of myco-and microbiota structure in soils of forest ecosystems. II. Antibiotic activity in cultures of litter saprotrophic mushroom *Lepista nuda*. **Mycology and phytopatology**. v. 34 (4), p.10-16, 2000.

STIJVE, T. New cultivated fungi on the Swiss market. **AMK-Mededelingen**, v. 3, p. 74-77. 1999.

THINES, E.; WEBER, R. W. S.; TALBOT, N. J. MAP kinase and protein kinase A – Dependent mobilization during of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnapothe grisea* . **The Plant Cell**, v. 12, p. 1703-1718, 2000.

TONOMURA H., 1978. Part II Cultivated fungi in Agaricales, section c., other genera: *Flammulina velutipes*. In: CHANG; HAYES. **The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms**, 1978, 410-420.

VAN DYKE, C. G.; MIMS, C. W. Ultrastructure of conidia, conidium germination and appressorium development in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum truncatum*. **Canadian Journal of Botany**. v. 69, p. 2455-2467. 1991.

VERGAGEN F. J. M. et al. The ubiquity of natural adsorbable organic halogen production among basidiomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 45 (5), p. 710-718, 1996.

ZADRAZIL F. Part II Cultivated fungi in Agaricales, section C. other genera, Cultivation of *Pleurotus*. In: CHANG; HAYES. **The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms**. ed. Academic Press, Inc., p.530, 1978.

ZWEYTICK D.; ATHENSTAEDT K.; DAUM G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, v. 1469 (2), p. 101-120, Sept. 2000.

WEETE, J. D. Spore lipid surface wax composition; metabolism during germination In: **Infection process of fungi** March. p. 21-25. 1983.

WONNACOTT T., WONNACOTT R. **Introdução à Estatística**. RJ. ed. LTC, 1980.

9 ANEXO

- Parâmetros de cultivo para duas espécies cultivadas em larga escala

Foram colhidos dados sobre a diferença de necessidades entre espécies de *Pleurotus* e *Agaricus bisporus*. Foram utilizadas estas duas espécies, pois elas possuem duas técnicas de cultivo bem diferentes, que são as mais utilizadas mundialmente. Foi escolhido *A. bisporus*, pois *L. sordida* possui o mesmo *habitat*, conseqüentemente estes dois gêneros podem utilizar a mesma metodologia de cultivo, com leves modificações.

Fungos decompositores de madeira crescem em ambientes com alta concentração de CO₂, enquanto os que se desenvolvem no solo crescem com concentração de CO₂ mais baixa. Experimentos comparando diferentes espécies de *Pleurotus* e *Agaricus bisporus* demonstram que a alta concentração de CO₂ no ar estimula o crescimento de *Pleurotus* e inibe o de *Agaricus bisporus*.

Diferentes linhagens de *Pleurotus* diferem no limite de estimulação, variando de 22 a 28% a concentração máxima de CO₂ que estimula o seu crescimento miceliano. Entretanto, se durante a frutificação de *Pleurotus* a concentração do ar estiver acima de 600ppm (0,06%), o estipe se alonga e o desenvolvimento do píleo pode ser inibido (ZADRIZIL, 1978). Para *A. bisporus* a concentração de CO₂ que permite seu desenvolvimento miceliano não pode ser superior a 4%. Para sua frutificação também é necessária uma concentração menor do que enquanto seu micélio está se desenvolvendo, esta variando entre 0,06 a 0,1% (EDWARDS, 1978).

A temperatura atmosférica ótima também varia. *Pleurotus* desenvolve bem seu micélio com temperaturas entre 25 e 28°C e suas frutificações, dependendo da linhagem, podem frutificar com temperaturas entre 10 e 28°C (CHANG; MILES, 1989, p. 267). Para que *A. bisporus* possa desenvolver seu micélio, a temperatura do substrato deve ser de 25°C, se estiver 20°C seu desenvolvimento é mais lento (EDWARDS, 1978). Se a temperatura do substrato estiver acima de 32°C após a introdução da semente-inóculo, o micélio pode degenerar (CHANG; MILES, 1989, p. 183). Segundo EDWARDS (1978), para sua frutificação, a temperatura atmosférica deve estar entre 15 e 16°C, se estiver acima de 23°C os primórdios amarelam e morrem (CHANG; MILES, 1989, p. 183).

O pH ideal também varia, *Pleurotus* desenvolve seu micélio com variação de pH entre 5 e 6,5 (ZADRIZIL, 1978), enquanto *A. bisporus* necessita de um solo de cobertura com pH de 6,5 a 8,0 para poder frutificar (EDWARDS, 1978).

A umidade relativa do ar também varia dependendo da espécie cultivada. Para *Flammulina velutipes*, por exemplo, deve estar entre 80-85% durante o início da frutificação e entre 75-80% quando o estipe tem 2cm de comprimento (TONOMURA, 1978). Durante a etapa de frutificação de *A. bisporus* a umidade relativa do ar deve ser acima de 80% quando o movimento do ar sobre o micélio é lento e 90% quando o movimento é mais vigoroso. Ao mesmo tempo o solo de cobertura deve ser mantido úmido (EDWARDS, 1978).

Durante o desenvolvimento miceliano de *Pleurotus*, este não necessita de luz, crescendo melhor no escuro do que no claro. Entretanto, durante a formação de primórdios, uma intensidade luminosa de 200 lux é ideal, e durante o desenvolvimento do cogumelo esta pode variar de 50 a 500 lux (CHANG; MILES, 1989, p. 267). Outro exemplo é dado com *Flammulina velutipes*, onde a indução de formação de primórdios não necessita de luz, entretanto a luz é essencial pra a maturação dos cogumelos (TONOMURA, 1978).

Um fator importante a ser considerado é que decompositores primários conseguem se desenvolver em ambientes onde a razão C:N varia de 350 a 500:1 (CHANG; MILES, 1989, p. 82). A maioria dos fungos apresenta a máxima atividade de degradação de celulose em razões C:N significativamente menores do que aquela encontrada no interior de troncos. A capacidade de degradação de celulose diminui consideravelmente em razões acima de 200:1. Portanto, para a produção comercial de cogumelos, um suplemento adicional nitrogenado é introduzido no substrato para facilitar o desenvolvimento miceliano e torná-lo mais rápido (MARKHAM, 1983).

FIGURA 1: Frutificações em gramados



FIGURA 2: Morfologia das lamelas

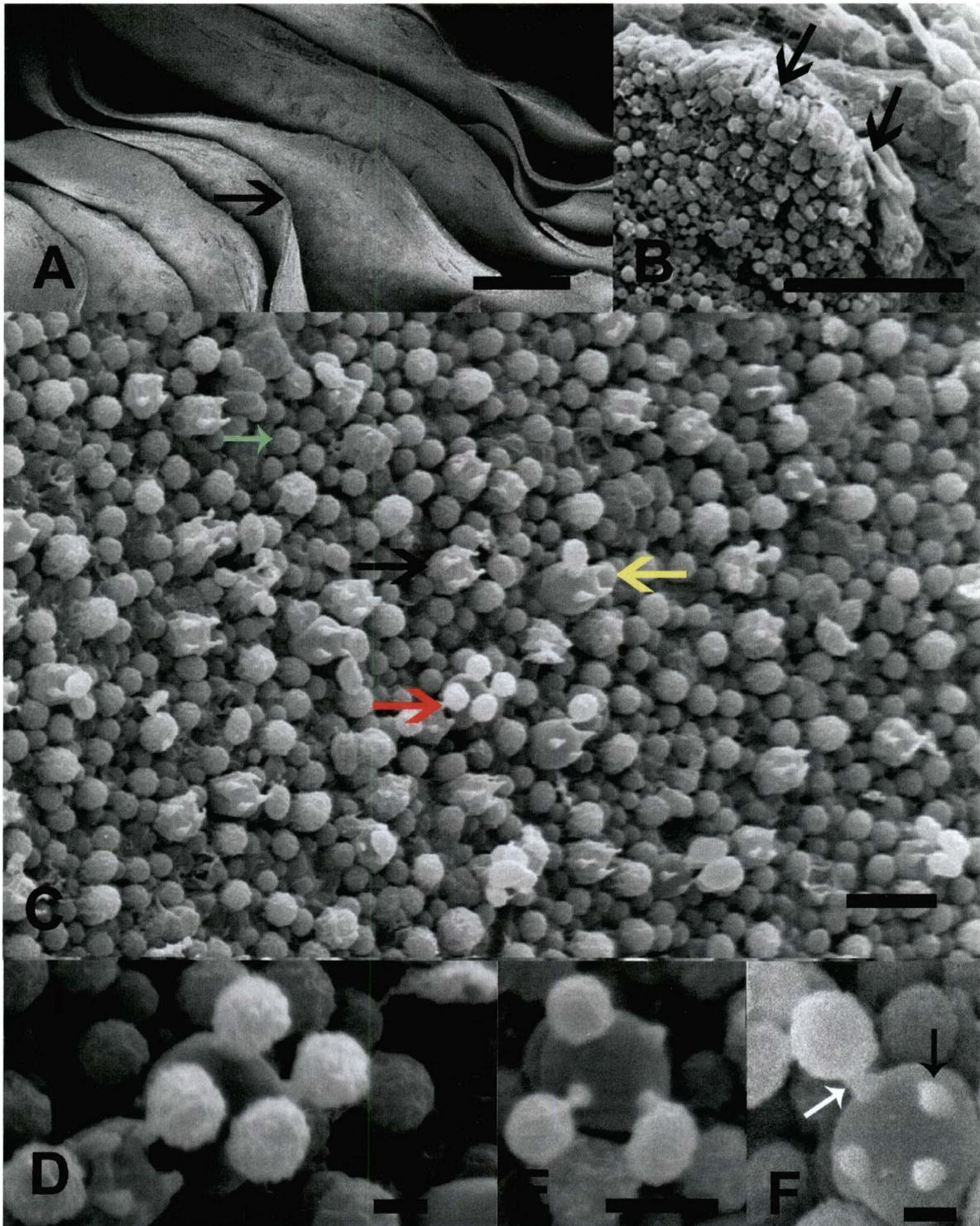


FIGURA 3: Morfologia do esporo

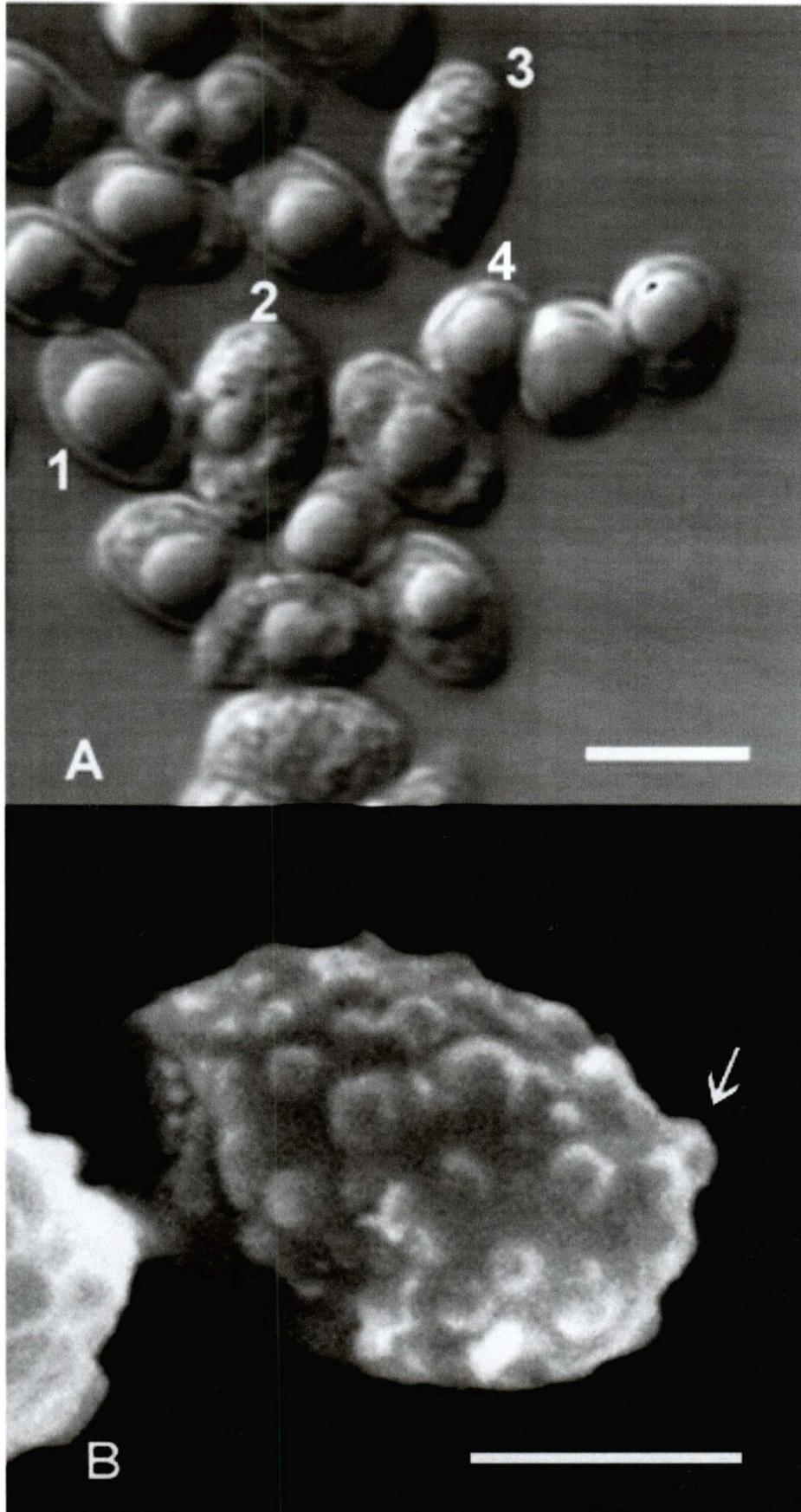


FIGURA 4: Corpos lipídicos em esporos

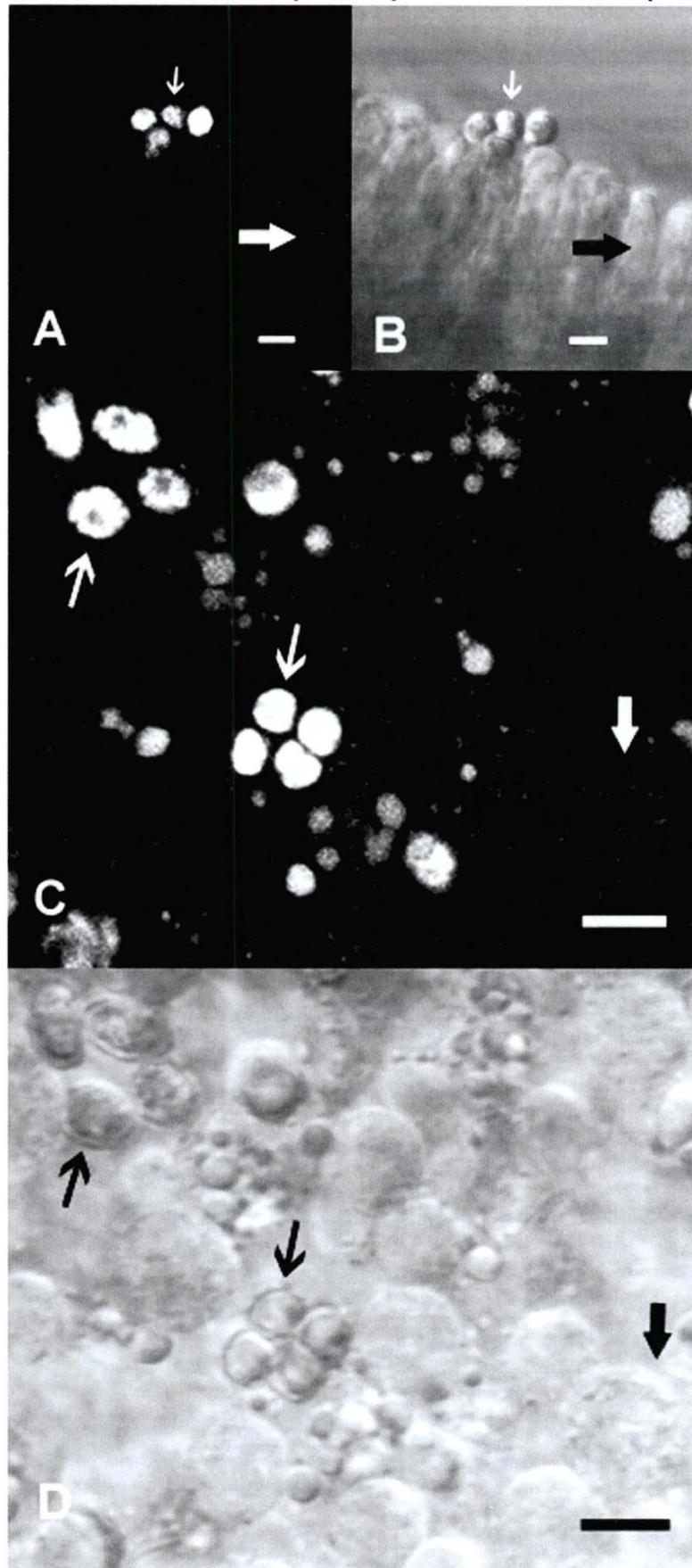


FIGURA 5: Corpos lipidicos, nucleos e vacuolos

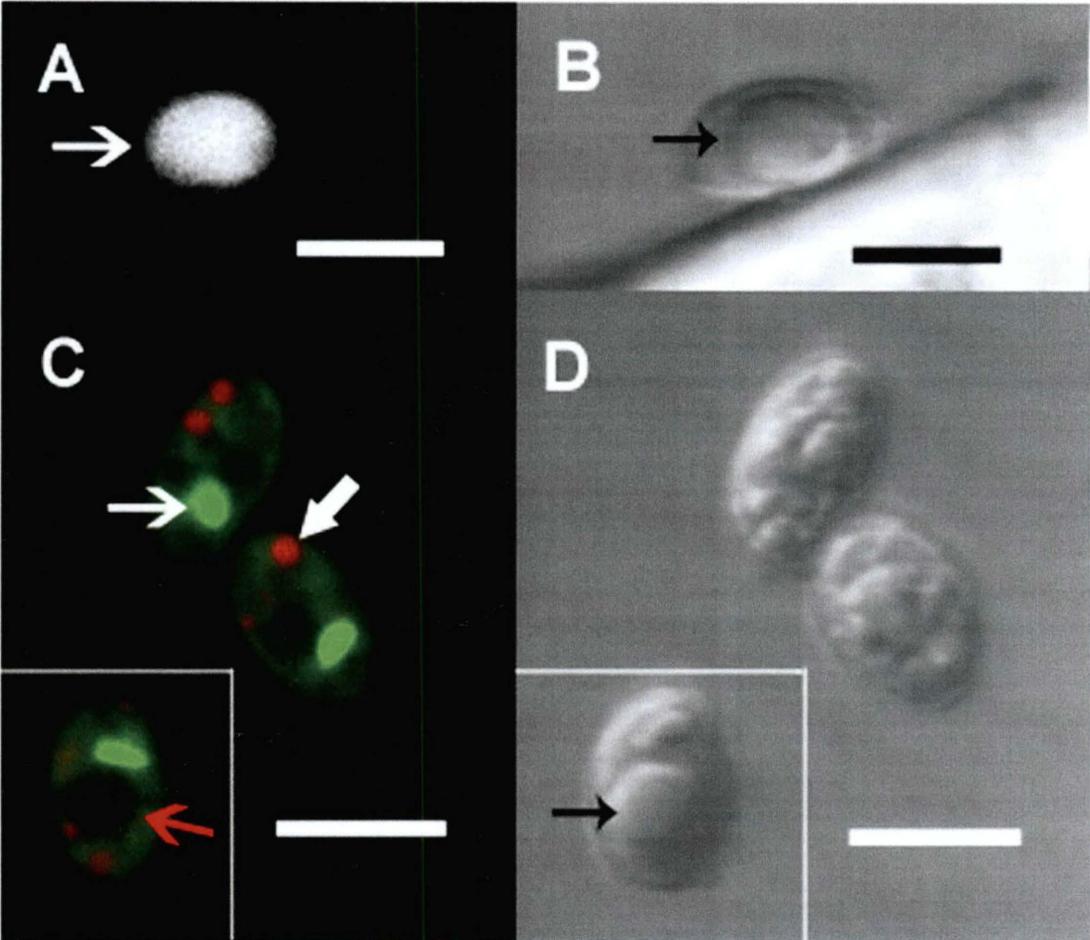


FIGURA 6: Nucleo em esporos

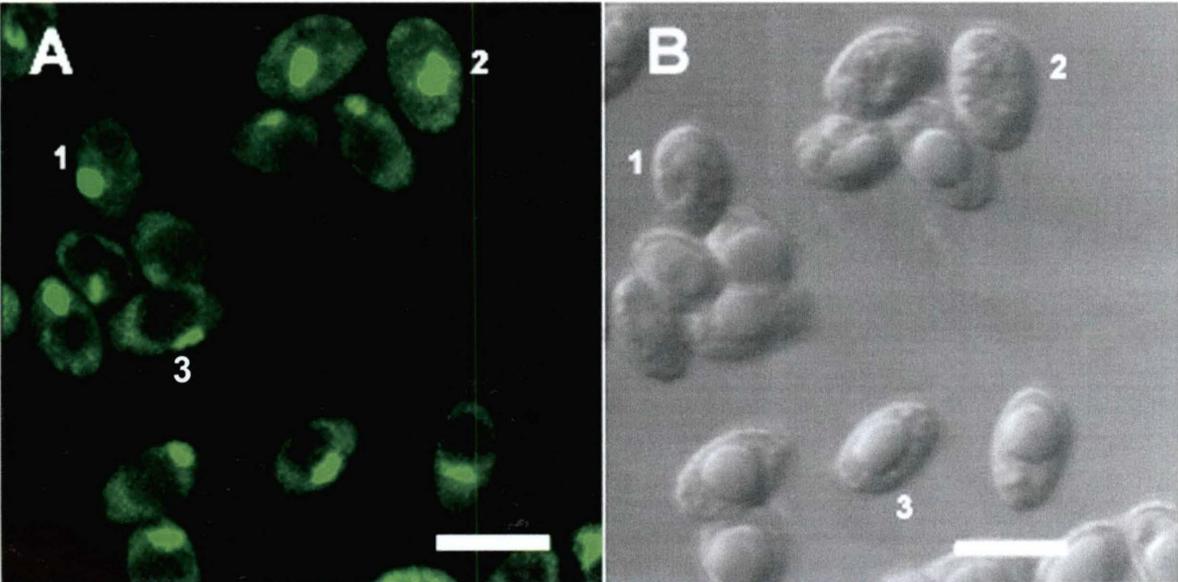


FIGURA 7: Morfologia da cultura e das hifas

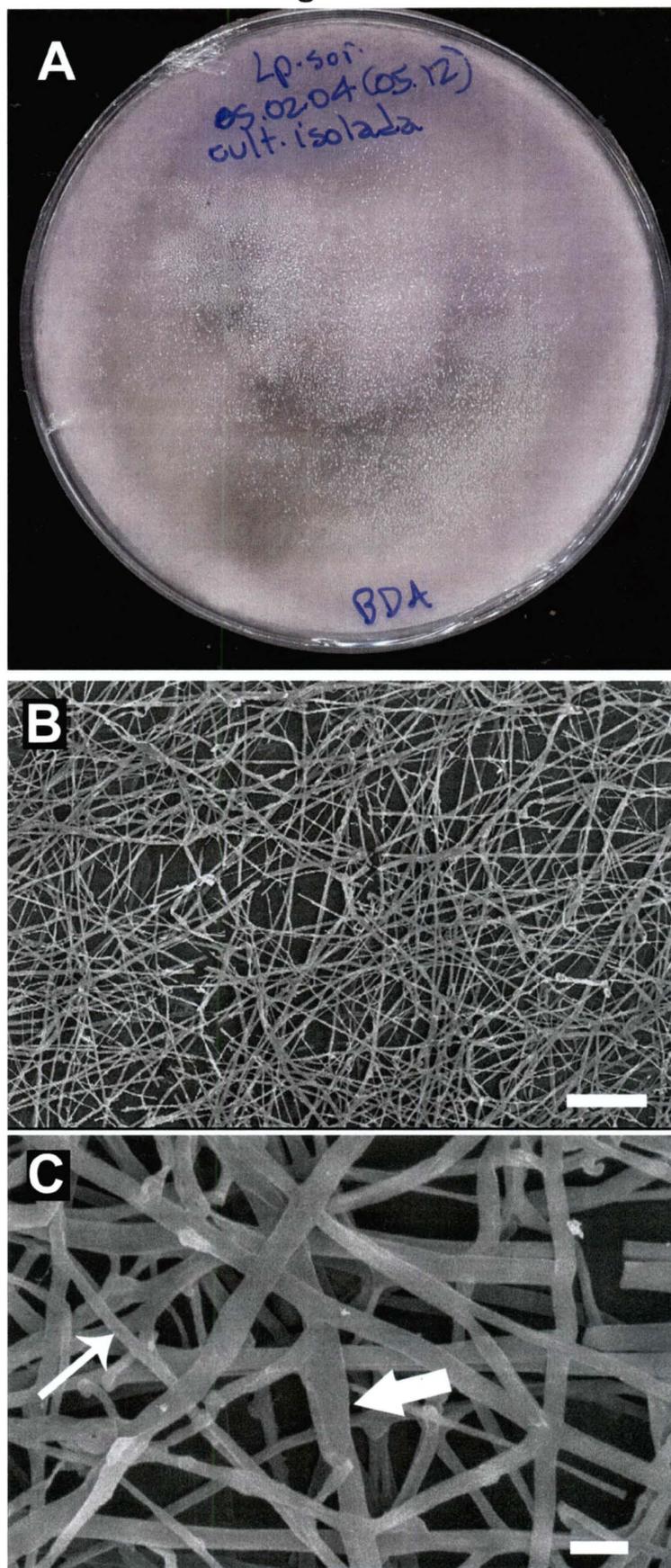


FIGURA 8: Hifas coradas com Laranja de Acridina

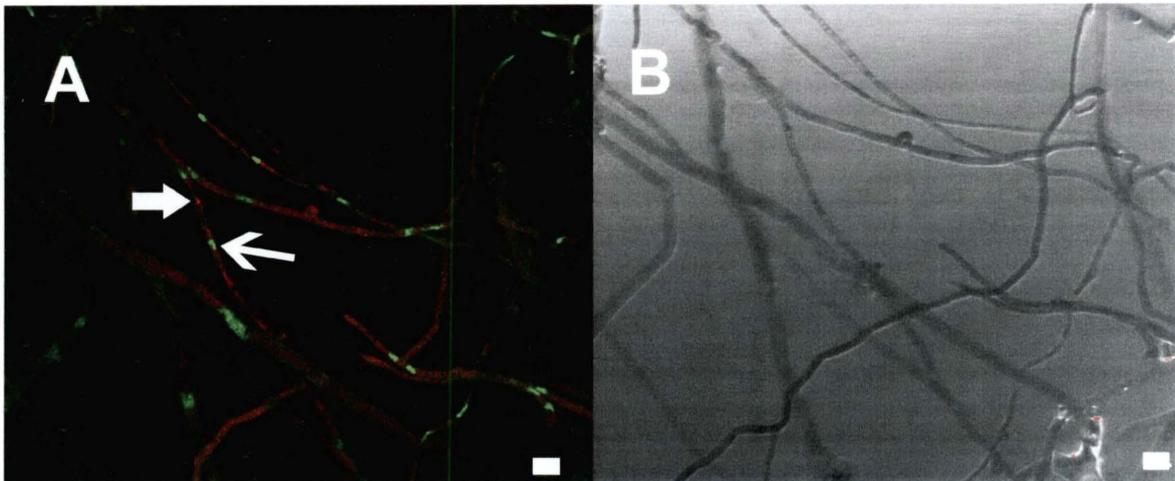


FIGURA 9: Hifas coradas com Vermelho Nilo

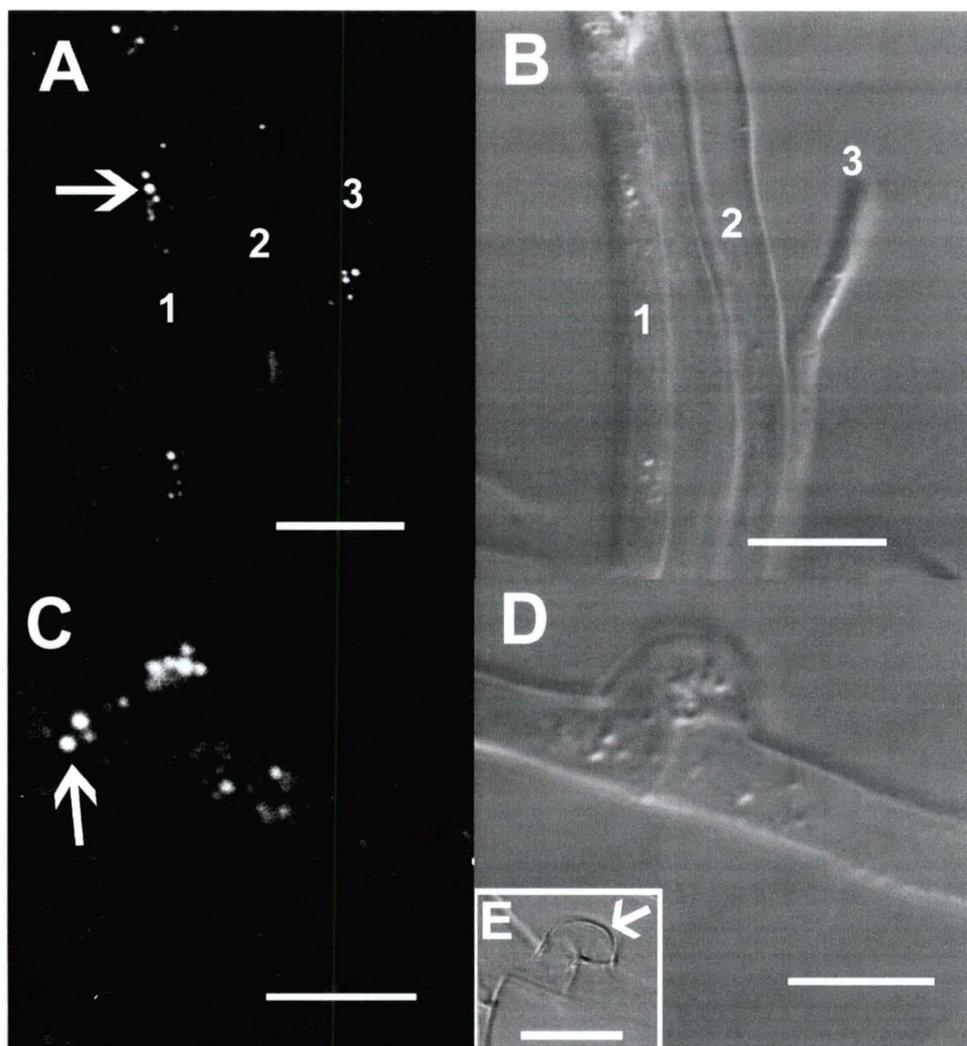


FIGURA 10: Caracterização das culturas isoladas

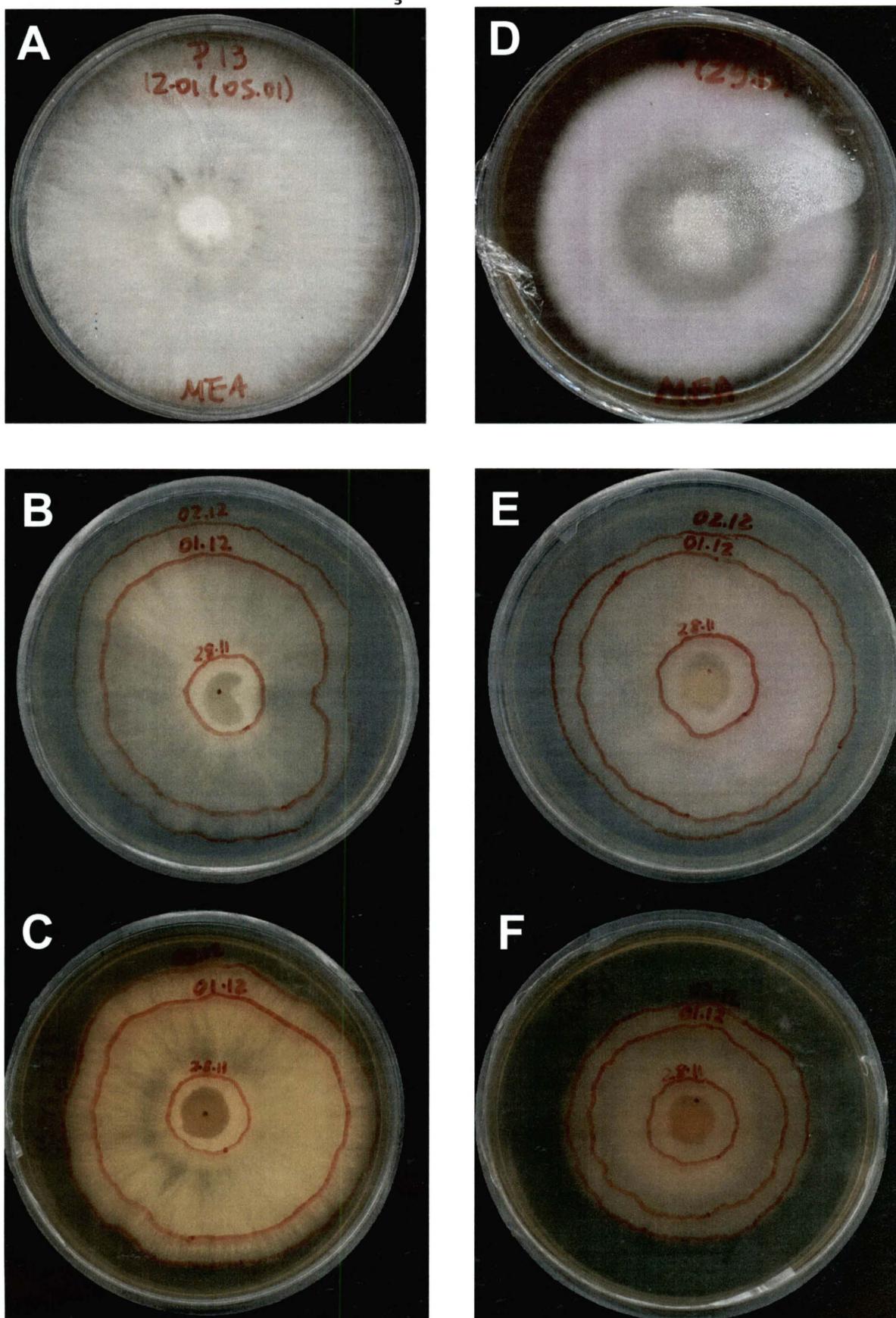


FIGURA 11: Interação de 27.11.03 em BDA

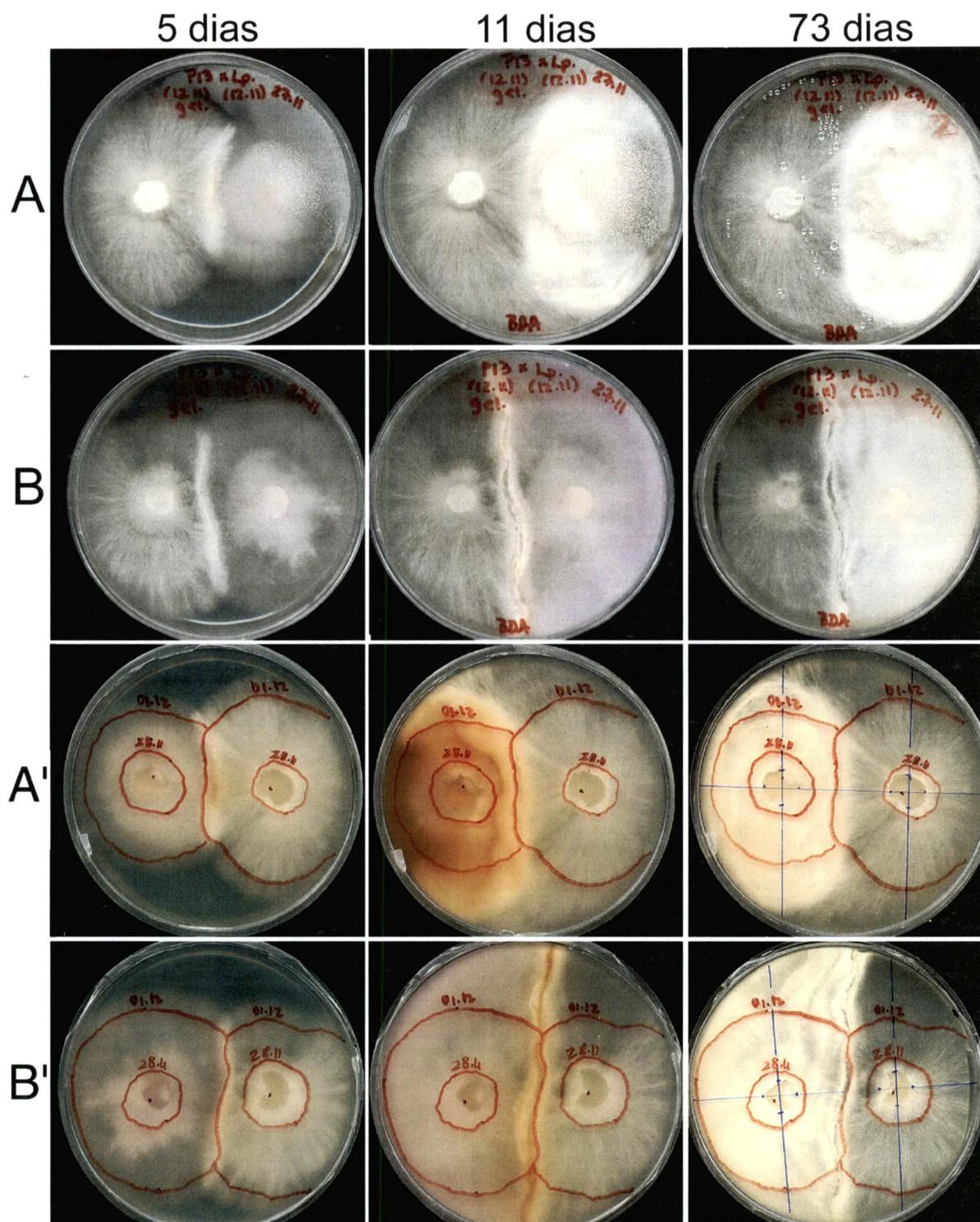


FIGURA 12: Cordas micelianas

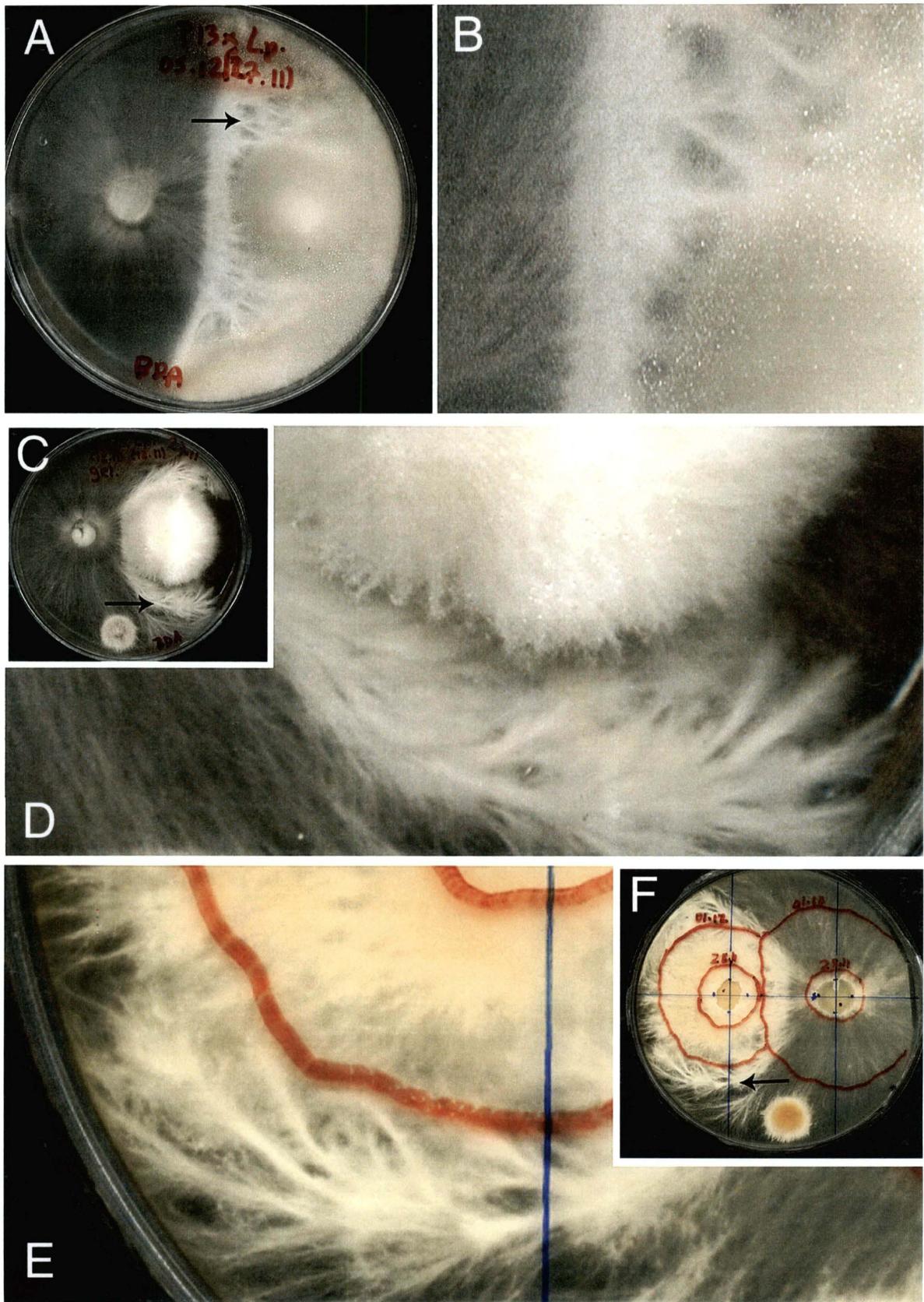


FIGURA 13: Interação de 05.01.04 em BDA

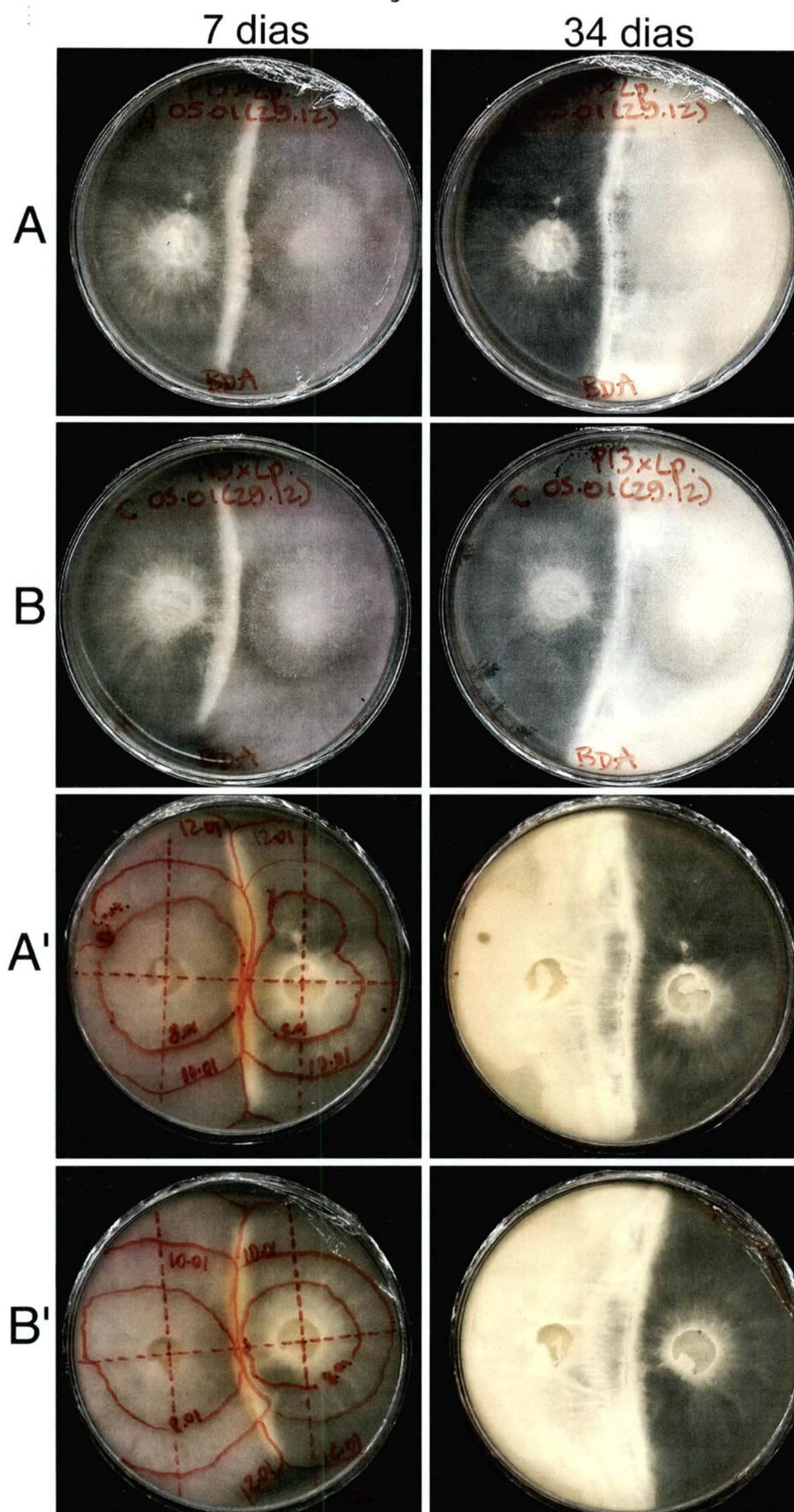


FIGURA 14: Interação de 24.11.03 em MEA

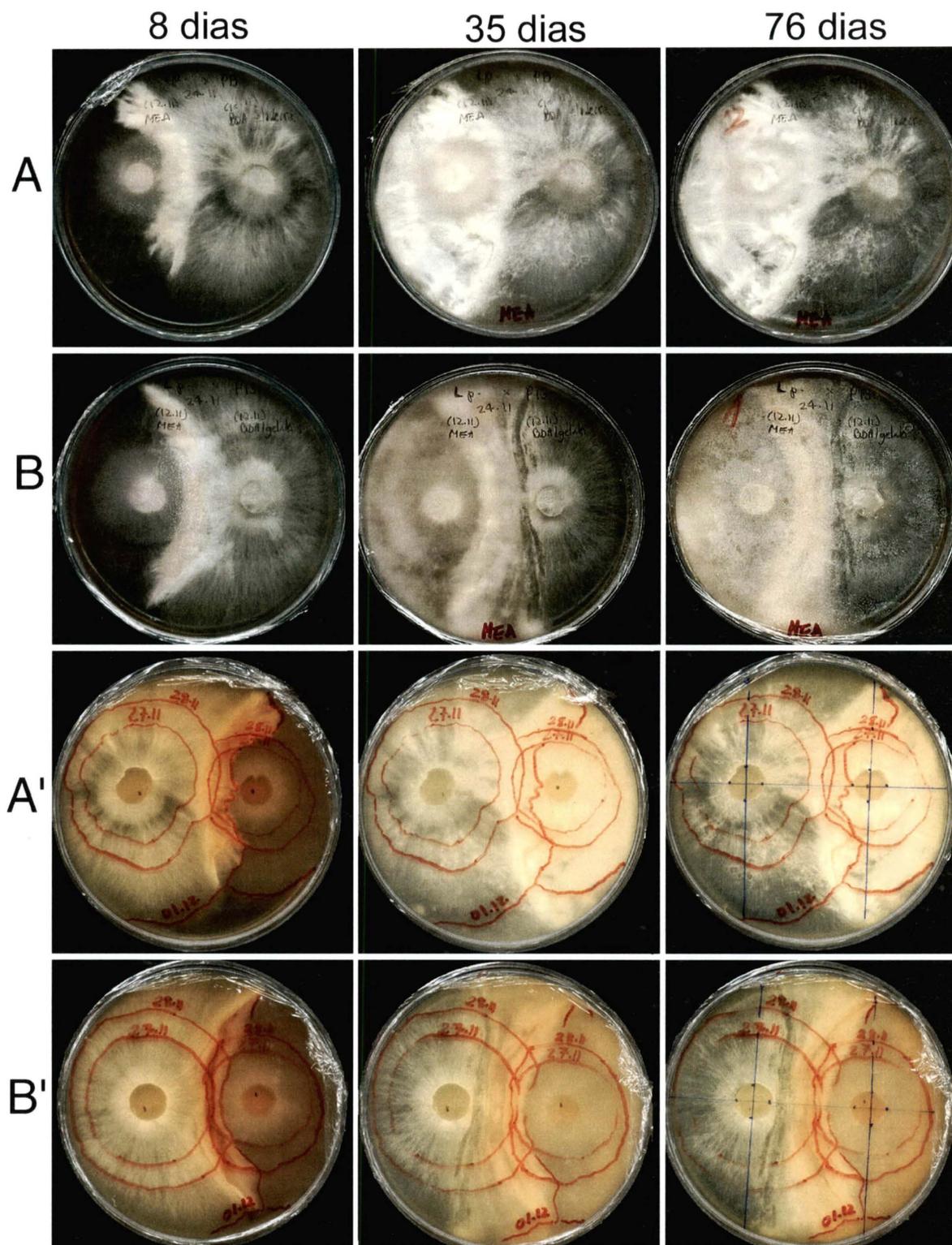


FIGURA 15: Interação de 05.12.03 em MEA

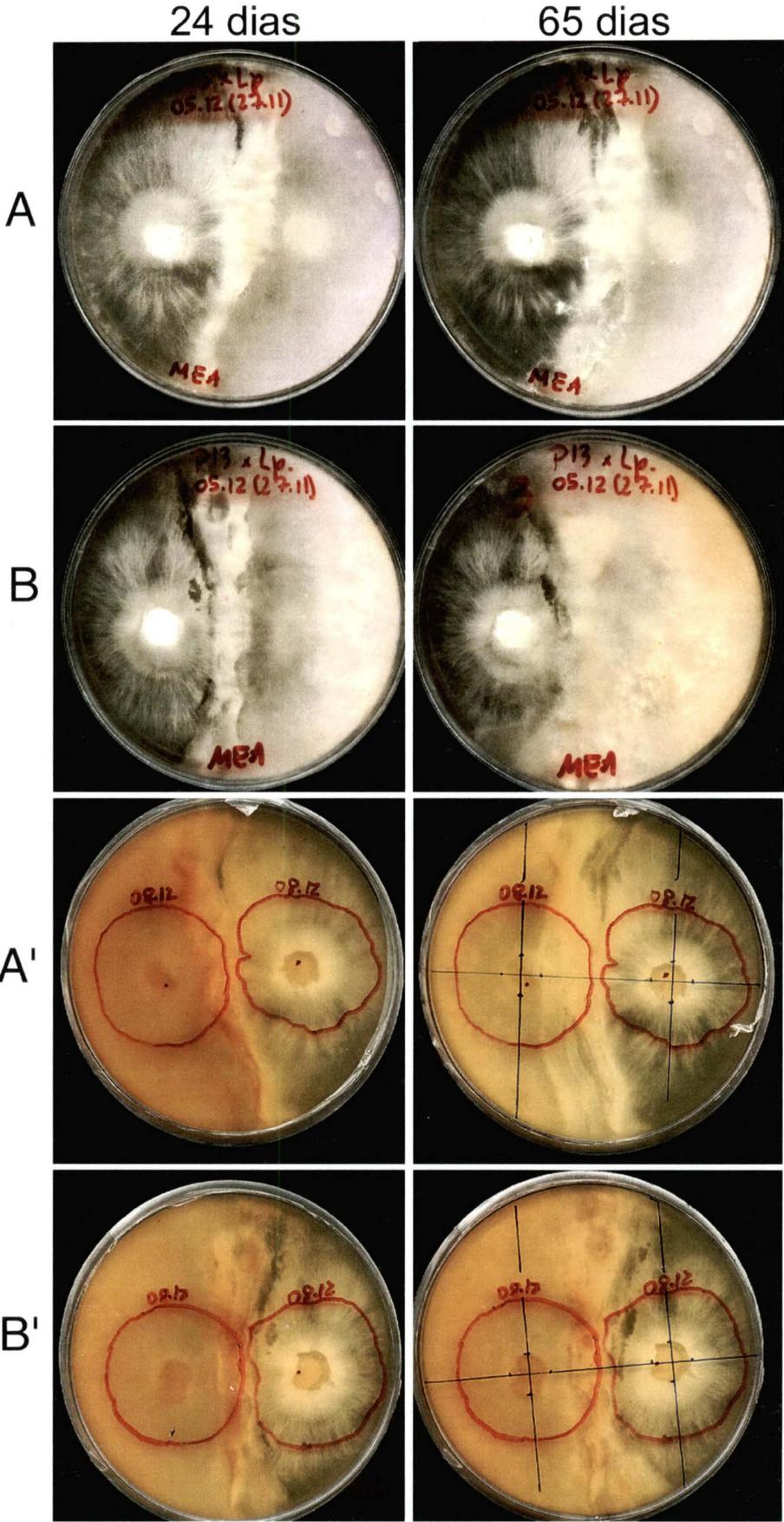


FIGURA 16: Interação de 05.01.04 em MEA

7 dias

34 dias

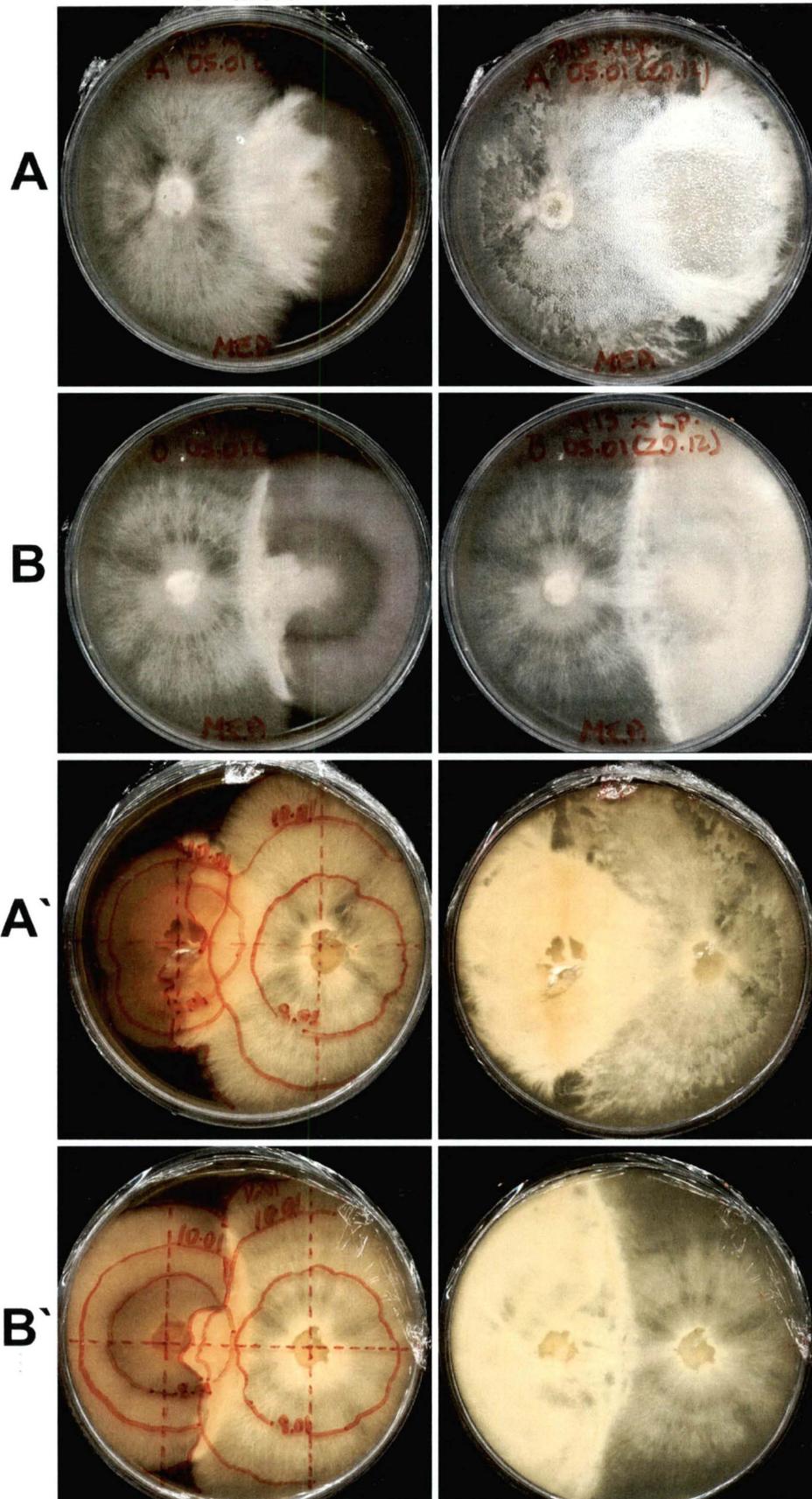


FIGURA 17: Bandejas com substrato

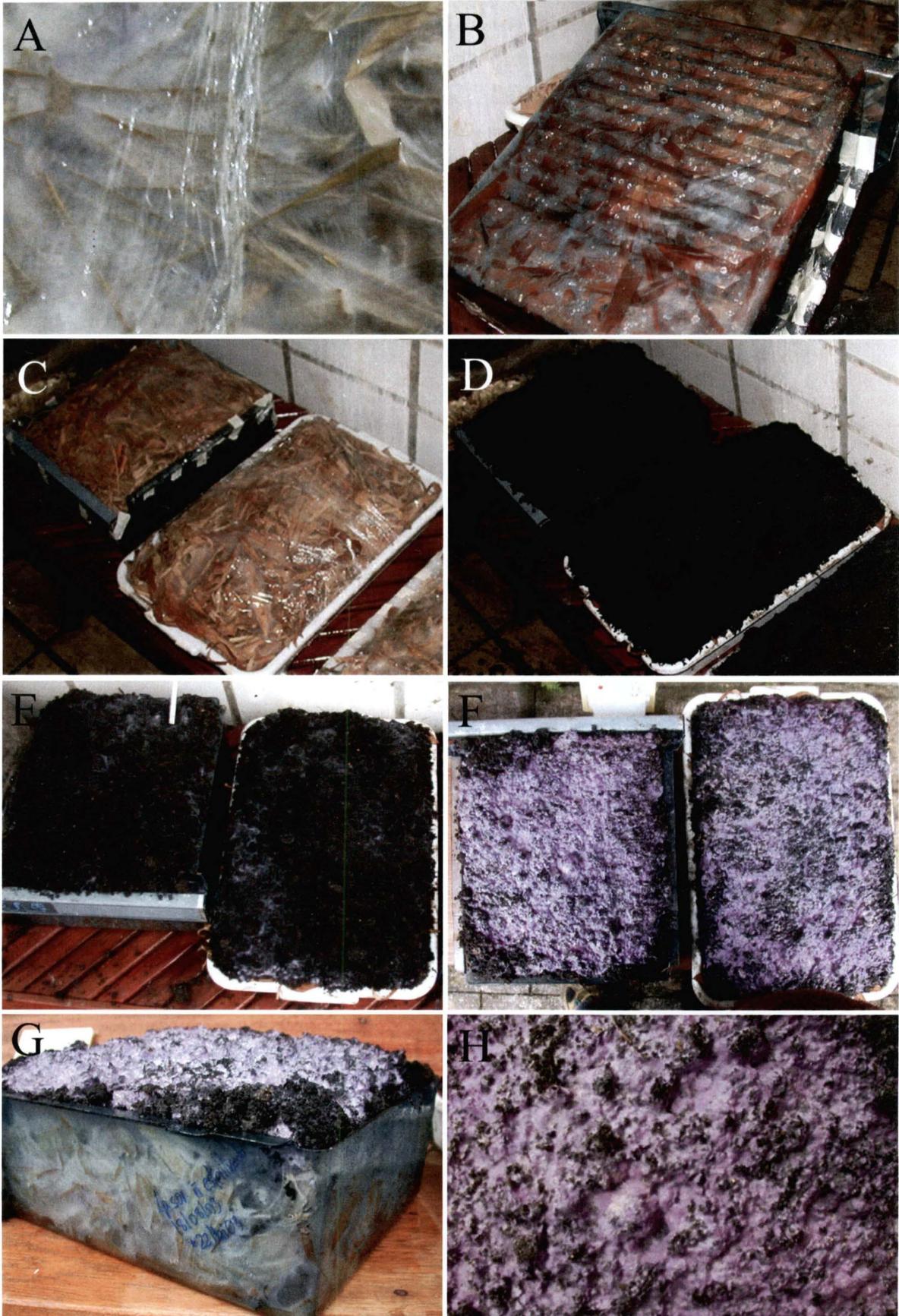
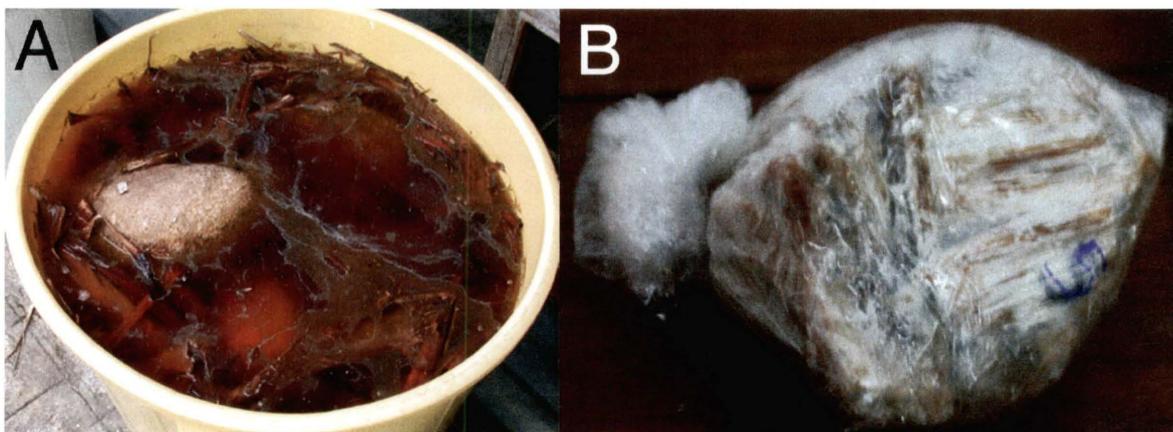


FIGURA 18: Cultivo selvagem experimental



FIGURA 19: *Habitat de Lepista sordida*

FIGURA 20: Substrato e semente-inoculo

FIGURA 21: Frutificações de *Pleurotus pulmonarius*