**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Macrofungos em mudas cítricas

Carlos Ivan Aguilar Vildoso

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2009**

Carlos Ivan Aguilar Vildoso
Engenheiro Agrônomo

Macrofungos em mudas cítricas

Orientadora:
Prof.^a. Dra. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Aguilar-Vildoso, Carlos Ivan

Macrofungos em mudas cítricas / Carlos Ivan Aguilar Vildoso. - - Piracicaba, 2009.
182 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Basidiomycota 2. Biodiversidade 3. Citricultura 4. Controle biológico 5. Controle químico
6. Fungos 7. Mudas 8. Viveiros I. Título

CDD 634.3
A283m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus amigos e minha família

DEDICO

À citricultura
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Este é um momento de reflexão que fazemos e sempre acabamos fazendo injustiças, por não conseguir descrever o real apoio das pessoas nesta fase da nossa vida, ou mesmo não fazendo menção nestas poucas linhas, mas estando nas nossas lembranças.

À Profa. Dra. Aline Pizzirani-Kleiner pela compreensão e confiança durante todo este trabalho.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária - NAP/MEPA, ESALQ/USP e ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima pela disponibilidade de uso dos equipamentos em especial do microscópio eletrônico de varredura. A Mônica Lanzoni Rossi pela ajuda no preparo e avaliação do material para MEV.

À minha família sempre me apoiando, obrigado pai, Rita, Rafael, Mário, Tânia, Kátia, minha mãe Olga, Ricardo e meus sobrinhos (Ana Luiza, Julio, Luiza e Yasmin), e especialmente a Rita, minha segunda mãe, pelo apoio constante, principalmente nos momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos: Ademir Durrer, Aldo Procópio, Alessandro Riffel, Aline Silva Romão (Romã), Ana Paula Pallu Tozadori, Anderson Ferreira, Andréa Bogas, Armando Cavalcante Franco Dias, Cláudia Gai, Cristiane Cipola Fasanella (Kit), Danice Mazzer Luvizotto (Metal), Denise Balani, Eliandra Sia, Emiliana Manesco Romagnoli; Fernanda Luiza de Souza Sebastianes, Fernanda de Souza Bernandes (CENA), Fernando Dini Andreote (mosca), Francisco Dini Andreote (Fran), Joelma Marcon, José Antônio da Silva (Zezo), Léia Cecília Lima Fávaro, Manuella Nóbrega Dourado (Manu), Maria Beatriz, Calderan Rodrigues (Bia), Maria Carolina Quecine (Carol/micuim), Mariele Porto Carneiro Leão, Marise Suzuki, Michele de Cássia e Silva, Paulo Teixeira Lacava, Priscila Rosseto (Pri), Renata Assis, Rodrigo Mendes, Rodrigo Stuart, Uira Belmonte, Vanessa Cicero, Viviane Colombari Pedrazzini dos Santos e Welington Luiz de Araújo; em especial à Emiliana que sofreu com minha convivência.

Aos colegas, funcionários e professores do Departamento de Genética da ESALQ/USP; em especial aos amigos Endson Santana Nunes, Fernanda Salvato, Giselle de Carvalho (Gika), Mateus Figueiredo Santos, Paula Fabiane Martins, Paulo Fernando de Melo Jorge Vieira, Priscila

Lupino Gratão, Salete A. Gaziola; aos funcionários: Cândida Vanderléia de Oliveira (Léia), Carlos Roberto Macedônio, Fernando Leopoldino, Nirlei Aparecida Silva; e aos professores Carlos Alberto Labate, José Baldin Pinheiro e Isaías Olívio Geraldi.

Aos amigos da ESALQ, principalmente dos Departamentos de Entomologia, Fitopatologia e Estatística; Agustín Cerna Mendoza, Aline Cristina Pereira da Rocha, Aloísio Coelho Junior, Ana Maria Araújo, Angelina Maria Marcomini, Cristiane Müller, Débora Rother, Erika Pessoa Japhyassu Britto, Fátima Teresinha Rampelotti Ferreira, Fernanda Engels do Nascimento, John Saldarriaga Ausique, Juliana Balbinotte, Leandro Delalibera Geremias, Lilian Beloti, Liliane de Diana Teixeira, Lorena Andrade Nunes, Magda Andréia Tessmer, Marcus Venicius Lourenço (Polé), Maria Fernanda Gomes Villalba Peñaflor, Rafael Major Pitta, Tiago Cardoso da Costa-Lima, Sandra Vergara, Thais Dias e Tiago Zucchi.

Ao amigos do CENA em especial ao Laboratório de histopatologia: Adilson Correa da Silva, Alice Noemi Aranda-Peres, Cleusa Pereira Cabral, Neusa de Lima Nogueira, Mônica Lanzoni Rossi, Renata Cruz, Renan Machado Packer e Suzineide Manesco. Principalmente à Dra. Neusa e a Mônica pela ajuda de sempre, profissional e principalmente pela amizade.

Ao pessoal da Alellyx, perdi a convivência diária dos amigos, mas ganhei a liberdade que precisava. Obrigado pelo apreendizado e pela amizade inesquecível Alessandra Franco Novelli, Almir Zanca, Elaine Cristina Alexandre, João Paulo Kitajima (Kita), João Paulo Piazza (JP), Liliane Arnaldi, Marcelo Afonso Vallim, Marcos Alegria, Maria E. Camargo, Patrícia Brant Monteiro, Paula Ziani; Poliana Giachetto (Poli), Renata C. Pascon, Tiago Moraes (Fifi), Vagner Katsumi Okura (Wagninho), Vanilda Nilsen (Van), Vivian Cristiane Zoia Gonçalves, Wilson Malaga Júnior (Wil).

Ao pessoal da Canavialis, pela oportunidade de ver uma outra grande cultura como a cana-de-açúcar, mas precisamos definir caminhos e arcar com as perdas. Adilson Correa da Silva, Adilson Soledade, Andresa Soares, Clodoaldo, Cristiane Poletti Toledo (Cris), Cristiano Fontes, Fernanda Ferrari, Guilherme Genari, Hamilton Jordão Júnior, Hideto Arizono, Juliana Cszimar, Luis Cláudio Rubio (Lee), Madalena Pereira da Mata, Paulo Eduardo Brugliato, Mauro Henrique S.R. Violante, Isis Franco, Rafaela Gaspari, Antônio Ricardo S. Madureira, Rodrigo Augusto Orth Ritter, Sizuo Matsuoka, Sonia Aparecida Facchini (Soninha), Tatiana P.S. Gonsalves, Thiago Guilherme, Vanessa M. Oliveira, Walter Maccheroni.

Ao pessoal da república que me apoiaram, conversaram, divertiram e sofreram comigo, isto é, convivemos juntos: Aldo Procópio, Aloísio Coelho Júnior, Anderson Ferreira, Armando Dias, Cláudio Nunes, Rafael da Silva Gonçalves, Vanderlei Varisi (Veia), meu muito obrigado, principalmente para Aloísio que não mediu esforços para me ajudar neste trabalho.

À família de Piracicaba formada por Alessandra Nalin, Bruna Domingues (Bruninha), Camila González, Caroline Lungo Devidé (Carol), Cláudio Nunes (Tio), Ezequiel Rodrigues (Zecá), Flávia Maria Scatena Leite, José Antônio Fonseca (Zezo), Milena Dadalto, Patrícia Maioque Martins, Joice dos Santos Soares, Ricardo Sanches e Valdirene Santos (Val), em especial a Carol, por ter nós unido e mantido sempre como mais do que um simples grupo de amigos e ao Tio pela turma, convivência e apoio.

À Phytonea Clínica de Plantas e à Incubadora do Agronegócio de Limeira através da Ana Paula dos Santos, Elen Moreira, Fabrícia Almeida, Fernando Guerra, Maurício, Neia Almeida, Rodrigo, Talita Scholl, Vanessa, Vitor de Sessa; e em especial ao Anderson Soares de Campos (batata) e sua família, pela convivência, sofrimento e paciência durante todo este período e que nosso sonho realizado chegue a se firmar e trazer retorno da nossa perseverança, para não dizer teimosia.

Aos meus amigos e pessoas especiais que fizeram valer a pena este período. Alessandra Alves de Souza, Alessandra Bargiela, Alexandre Baldin, André Lima, Antonia Gonçalves da Silva Zanetti (Toinha), Antônio Gonçalves de Alencar (Baixinho), Brígida Queiroz, Camila Caldana, Cristina Cassano Mendes, Debir Naves Gomes, Dirceu de Mattos Júnior, Eliane Cristina Locali-Fabris, Fabiana Alencar, Fabiane Benvenuto, Francisca Gonçalves Rodrigues (Dona Chica), Francisco Laranjeira (Chicão), Guilherme Lagazzi, Helvécio Della Coleta Filho, Jorgino Pompeu Júnior, José Dagoberto de Negri, José Orlando Figueiredo, Lilian Beloti, Maisa Hoerner, Marcelo Sposito, Mariângela Cristofani Yali, Marineila Frota (Neila), Marta Alves, Mary Túlia Vargas, Michel Moraes, Neto, Patrícia Amalfi, Patrícia Denites Ros, Renata Gustineli, Rhuanito Soranz, Rose Mary Pio, Rui Alexandre Kleiner, Sergio Alves de Carvalho (Sergião), Silvia Brumer, Socorro, Susana Godoi (Sussi), Valdenice Moreira Novelli (Val), Valter Spinelli, Vandeclei Rodrigues (Queque) e em especial à Graziéle Ramos Sasserón (Gra) pelo apoio, conversas e discussões durante todo este período.

Não podendo deixar de ressaltar os meus amigos Armando Dias e Welington Luiz de Araújo pelo apoio durante a fase final, sem o qual não teria conseguido e me deram uma base para continuar, eternamente minha gratidão.

Aos viveiros Blasco & Almeida, Citrograf, Citrosol, Horticitrus, Qualictrus, Sanicitrus, Ouro Verde, Teófilo & Scholl e às empresas Eucatex e Terra do paraíso pela participação direta ou indireta. Em especial a Marcelo Almeida (Blasco & Almeida mudas cítricas) e Vitor Cicolin (Horticitrus) pela amizade e apoio, sem o qual os experimentos não teriam sido validados, nem executados e não poderia estar superando esta fase difícil.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, muito obrigado!

“Rapadura é doce, mas não é mole não”.
(ditado popular)

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
ABSTRACT	17
LISTA DE FIGURAS.....	19
LISTA DE TABELAS.....	25
1 INTRODUÇÃO	29
2 DESENVOLVIMENTO.....	31
2.1 Revisão Bibliográfica.....	31
2.1.1 Citricultura	31
2.1.2 Produção de mudas	35
2.1.3 Macrofungos	37
2.1.3.1 Ascomicetos	38
2.1.3.2 Basidiomicetos.....	39
2.1.3.2.1 Cogumelos com lamelas	41
2.1.3.2.2 Cogumelos com poros.....	42
2.1.3.2.3 Orelhas-de-pau	43
2.1.3.2.4 Ninho-de-passarinho	43
2.1.3.2.5 Corpos de frutificação fechados	43
2.1.4 Identificação de macrofungos.....	44
2.1.4.1 Identificação morfológica.....	45
2.1.4.2 Identificação molecular	45
2.1.5 Composição de basidiomicetos	48
2.1.5.1 Macronutrientes	49
2.1.5.2 Micronutrientes	50

2.1.5.3 Metais pesados.....	51
2.1.6 Fisiologia de fungos.....	52
2.1.7 Macrofungos e suas associações.....	54
2.1.8 Levantamentos de macrofungos	56
2.2 Materiais e Métodos.....	59
2.2.1 Locais de coleta	59
2.2.2 Composição.....	59
2.2.3 Isolamento.....	59
2.2.4 Manutenção e conservação.....	60
2.2.5 Caracterização morfológica	60
2.2.6 Microscopia eletrônica de varredura	61
2.2.7 Extração de DNA	61
2.2.8 Amplificação por PCR.....	62
2.2.9 Sequenciamento.....	62
2.2.10 Análises filogenéticas	63
2.2.11 Análises <i>in silico</i>	71
2.2.14 Meios de cultura	72
2.2.15 Comparação de isolados monocarióticos e dicarióticos	72
2.2.16 Influência do pH.....	72
2.2.17 Fontes de Carbono	73
2.2.18 Fontes de nitrogênio.....	73
2.2.19 Experimento de controle em viveiro comercial.....	73
2.2.19.1 Efeito de diferentes doses de leite e vinagre.....	74
2.2.19.2 Experimento de controle biológico	74
2.2.19.3 Experimento de controle químico.....	74

2.2.19.4 Experimento de controle alternativo	75
2.2.20 Produção de inóculo	75
2.2.21 Crescimento em substratos	75
2.2.21.1 Escala de notas	76
2.2.21.2 Influência da fase de compostagem e do ressecamento	76
2.2.21.3 Interação nitrito e ureia	76
2.3 Resultados e discussão	77
2.3.1 Fábricas de substrato	77
2.3.2 Viveiros de mudas cítricas	79
2.3.3 Cogumelo vermelho (<i>Gymnopilus dilepis</i>)	80
2.3.4 Ninho-de-passarinho (<i>Cyathus stercoreus</i>)	93
2.3.5 Falsa Trufa (<i>Agaricaceae incertae sedis</i>)	99
2.3.6 Cogumelo marrom (<i>Gymnopus luxurians</i>)	109
2.3.7 Cogumelo Amarelo (<i>Leucocoprinus birnbaumii</i>) e Branco (<i>L. brebissonii</i>)	111
2.3.8 Meios de cultura	123
2.3.8.1 Composição complexa	123
2.3.8.2 Composição definida	127
2.3.8.3 Espécies de macrofungos	128
2.3.8.4 Culturas monocarióticas e dicarióticas	129
2.3.8.5 Populações de <i>Leucocoprinus</i>	131
2.3.8.6 Influência do pH	133
2.3.8.7 Fontes de Carbono	135
2.3.8.8 Fontes de Nitrogênio	137
2.3.8.9 Composição	139
2.3.9 Controle em viveiros	142

2.3.9.1 Experimento com leite	142
2.3.9.2 Experimento com vinagre	143
2.3.9.3 Controle biológico	145
2.3.9.4 Controle químico.....	146
2.3.9.5 Controle alternativo	148
2.3.9.6 Controle biológico natural.....	149
2.3.10 Avaliação em substrato.....	153
2.3.10.1 Inóculo.....	153
2.3.10.2 Macrofungos	154
2.3.10.3 Manejo e controle.....	155
2.3.11 Região ITS	158
2.3.11.1 Gênero <i>Gymnopilus</i>	158
2.3.11.2 Gênero <i>Cyathus</i>	161
2.3.12 <i>Primers</i> da região ITS	162
2.3.12.1 Gênero <i>Gymnopilus</i>	162
2.3.12.2 Gênero <i>Cyathus</i>	164
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	165
REFERÊNCIAS.....	169

RESUMO

Macrofungos em mudas cítricas

As mudanças na produção de mudas cítricas, com o uso de compostos a base de casca de pinus, vem levando a uma interação antagônica entre os citros e algumas espécies de cogumelos, ditos saprófitas. Este trabalho caracterizou esta nova interação, identificando e isolando os basidiomicetos associados ao problema e outros macrofungos presentes neste sistema de produção. O principal fungo encontrado foi *Leucocoprinus birnbaumii* que forma basidiomas de cor creme a amarelo brilhante, ocorrendo dois tipos morfológicos (LB e NTA). O micélio promove a impermeabilização no substrato dependendo das condições hídricas, o qual explica a variação nas perdas. Os esporos são produzidos após a abertura do píleo, sendo que a recomendação da coleta dos cogumelos fechados está sendo uma prática adotada nos viveiros. *In vitro*, as colônias são brancas para creme, tendo uma taxa de crescimento em diâmetro de 0,41 a 0,72 cm/dia em meio cenoura-ágar (CA), variando em função do isolado e da sua procedência. O pH não teve grande influência, mesmo variando de 4,5 a 8,0. O crescimento das colônias foi decrescendo nos meios de cultura CA, aveia-ágar, V8, BDA, malte-ágar e completo de Pontecorvo; enquanto que nos de composição definida, o meio Czapek (0,56 cm/dia) foi superior ao meio mínimo (0,48 cm/dia). Entre as fontes de carbono, o amido foi o melhor, seguido da galactose, maltose, glicerol, glicose, ágar, sacarose, ácido succínico e lactose, não houve crescimento em acetato de amônio nem em oxalato de sódio. Entre as fontes de nitrogênio, os compostos nítricos foram semelhantes aos aminoácidos (glutamato, glutamina e glicina) e ligeiramente preferenciais aos amoniacaais, enquanto a uréia inibiu o crescimento e o nitrito de sódio teve efeito fungicida. Nos experimentos realizados em viveiro comercial, o de controle químico teve aumento da produção de cogumelos para a maioria dos fungicidas avaliados, com exceção da iprodiona; o qual é explicado pelo efeito sobre os fungos agentes do controle biológico, como foram associados aos basidiomas *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans* e *Penicillium olsoni*. No experimento de controle biológico, as espécies de *Trichoderma* foram muito variáveis na sua eficiência, alguns colonizando até o substrato, mas não os cogumelos. O experimento com produtos alternativos teve melhores resultados de controle principalmente com o nitrito de sódio, o qual vem sendo adotado no controle deste basidiomiceto via aplicação no substrato e o vinagre pelo uso superficial. Outros macrofungos foram observados como o ninho-de-passarinho (*Cyathus stercoreus*); o cogumelo branco (*Leucocoprinus brebissonii*); a falsa trufa (Agaricaceae *incertae sedis*) e o cogumelo vermelho (*Gymnopilus dilepis*). A presença do cogumelo branco também causou preocupação nos viveiristas, mas não apresentou efeito nas plantas, nem impermeabilização. Entretanto, o cogumelo vermelho vem causando problemas na produção com fibra de coco por diminuir a capacidade de retenção de água. A falsa trufa também provoca prejuízos diretos diminuindo o desenvolvimento das mudas cítricas, tendo menor número de radículas, provavelmente associado à maior temperatura na decomposição do substrato. Assim, há uma necessidade de um contínuo levantamento dos novos macrofungos que possam se adaptar às condições de substratos e de manejo nos viveiros de mudas cítricas.

Palavras-chave: Agaricales; Antagonismo; *Citrus*; Controle; Diversidade; Impermeabilização; Interação; *in vitro*; ITS; Viveiro

ABSTRACT

Macrofungi in citrus nursery

Changes in the production of citrus nursery, using compounds from pine bark, have led to an antagonistic interaction between the citrus and some species of mushrooms, so-called saprophytes. This study characterized this new interaction, by identifying and isolating basidiomycetes associated to the problem and other macrofungi present in this production system. The main basidiomycete found was *Leucocoprinus birnbaumii* which has cream-colored to bright yellow, occurring two morphological types (LB and NTA). The mycelium promotes the sealing of the substrate depending on water conditions, for which there is much variation in losses. The spores are produced after the opening of the pileus, and the collection of closed cap has been adopted as a practice in citrus nurseries. *In vitro*, the colonies vary from cream to yellow, with a growth rate in diameter from 0.41 to 0.72 cm / day in the carrot-agar (CA) medium, depending on the isolate and its origin. The pH was not of great influence, even varying from 4.5 to 8.0. The colony growths was decreasingly in the culture medium CA, oatmeal agar, V8, PDA, malt agar and complete Pontecorvo, whereas the composition set, the Czapek medium (0.56 cm / day) was higher than the minimal medium (0.48 cm / day). Among the carbon sources, starch was the best, followed by galactose, maltose, glycerol, glucose, agar, sucrose, succinic acid and lactose, no growth in ammonium acetate or sodium oxalate. Among the sources of nitrogen, nitric compounds were similar to aminoacids (glicine, glutamate and glutamine) and were slightly preferred to ammonium, whereas urea inhibited the growth and sodium nitrite had fungicidal effect. In the experiments in citrus nursery, the chemical control assay, most fungicides has led to an increased production of mushrooms, except for iprodione, which is explained by the effect on fungal-biological control agents, which have been associated as *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans* and *Penicillium olsoni*. In the biological control experiment, *Trichoderma* species were highly variable in their efficiency, some of them colonized the substrate, but not the mushrooms. The experiment with unconventional products has led to better results, especially with sodium nitrite, which has been adopted to control the substrate and vinegar in surface application. Other macrofungi were observed as the nest-to-bird (*Cyathus stercoreus*), the white mushroom (*Leucocoprinus brebissonii*), the false truffle (Agaricaceae *incertae sedis*) and the Red Mushroom (*Gymnopilus dilepis*). The presence of the white mushroom has also caused concern in the nursery, but had no effect on plants, or sealing. However, the red mushroom is causing problems in the production of coconut fiber, leaving the fibers, which have no function in water retention. The false truffle also causes direct losses decreasing the development of the citrus trees, and fewer fibrous roots, probably associated to higher temperature in the decomposition of the substrate. Thus, there is a need for a new continuous survey of macrofungi that can adapt to the conditions of substrate and management in citrus nurseries

Keywords: Agaricales; Antagonism; *Citrus*; Control; Diversity; Interaction; *In vitro*; ITS; Nursery; Sealing

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Aspecto geral de uma fábrica de substrato a base de casca de pínus e diversidade de macrofungos existentes no local. Aspecto geral da fábrica (A-D); Cogumelo amarelo (E-I); diversidade de basicarpos em madeira (J-M); no substrato (N-Q), restos de substrato (R-U) e no solo (V-Y) 78
- Figura 2 - Ocorrência de cogumelo vermelho (*Gymnopilus dilepis*) em viveiro comercial de mudas cítricas e microscopia da esporada sobre folha de laranja. A) Aspecto na superfície da muda dos cogumelos vermelhos; B e C) Aspecto no substrato na parte lateral da muda; D e E) emergência dos cogumelos pelos orifícios da sacola da muda; Aspecto dos esporos em microscopia eletrônica de varredura. F) Esporada com escala de 20 μm ; G e H) com 10 μm e I) com 2 μm 81
- Figura 3 - Início de formação de basidiomas de *Gymnopilus dilepis*, com irrigação duas vezes à semana em casa-de-vegetação após 35 dias da inoculação, veiculado em milho pipoca em substrato a base de fibra de coco 82
- Figura 4 - Árvore filogenética por máxima verossimilhança de sequências de gêneros da família Cortinariaceae, com a amostra de *Gymnopilus* associada à mudas cítricas, com os fungos da ordem Russulales *Heterobasidium annosum* e *Bondarzewia bekeleyi* como grupos externos, baseado nas sequências da região ITS 86
- Figura 5 - Árvore filogenética da análise por máxima verossimilhança de 41 amostras do clado “*Gymnopilus*”, com a amostra de *Gymnopilus* associada a mudas cítricas, com *Galerina hypnorum* e *G. paludosa* como grupo externo, baseado nas sequências da região ITS 88
- Figura 6 - Árvore filogenética resultante da análise de máxima verossimilhança do grupo “*lepidotus-subearlei*”, com a amostra de *Gymnopilus* associada à mudas cítricas, com *Gymnopilus moabus* como grupo externo, baseado nas sequências da região ITS 89

- Figura 7 - Aspecto dos ninhos-de-passarinho de *Cyathus stercoreus* encontrado na superfície do substrato, a base de casca de pinus, em mudas cítricas. Barra = 1 cm 94
- Figura 8 - Árvore filogenética por máxima verossimilhança de 21 famílias da ordem Agaricales, representantes dos gêneros de Nidulariaceae, com os fungos da ordem Russulales *Heterobasidium annosum* e *Bondarzewia bekeleyi* como grupos externos e a sequência da *Cyathus* associada à produção de mudas cítricas, baseado nas sequências da região ITS 96
- Figura 9 - Árvore filogenética do gênero *Cyathus* inferida pela análise das sequências da região ITS do rDNA por máxima verossimilhança, com *Cystoderma amianthinum* e *Crucibulum laevae* como grupos externos e o *Cyathus* associado à mudas cítricas 97
- Figura 10 - Aspecto dos basidiomas da falsa trufa associada à mudas cítricas, externamente como internamente em viveiro comercial como *in vitro*. A-C) Aspecto dos corpos de frutificação na superfície do substrato das mudas; D) aspecto do lote de mudas afetado; E-G) Variação morfológica e de coloração externa e H-J) interna da gleba das falsas trufas coletadas das mudas, K e L) em meio cenoura-ágar produzida *in vitro* e M) cortada para visualizar a gleba. Barra=2cm 100
- Figura 11 - Aspecto em microscopia ótica e de varredura do interior da falsa trufa associada à mudas cítricas. A) esporos em microscopia ótica; B e C) interior da gleba com reentrâncias e esporos; D) esporos; E) corte lateral do himênio; F) detalhe de possíveis basídios e G) detalhe da ornamentação do esporo. Escalas de 2µm (G), 10 µm (A, D), 20 µm (D e E) e 200 µm (B e C) 101
- Figura 12 - Árvore filogenética da falsa trufa associada à mudas cítricas em relação a gêneros de macrofungos fechados presentes nos filos basidiomycotina e ascomycotina inferida pela análise das sequências da região ITS do rDNA pela máxima verossimilhança, com *Endogone lactiflua* e *Phytophthora infestans* como grupos externos 103

- Figura 13 - Árvore filogenética com os gêneros formadores de corpos de frutificação fechados e hipógeos do filo basidiomycotina, a falsa trufa associada à mudas cítricas, *Exobasidium vaccinii* e *Ustilago avenae* como grupos externos 105
- Figura 14 - Árvore filogenética da falsa trufa associada à mudas cítricas em relação às famílias da ordem Agaricales e gêneros da família Lycoperdacea, pela análise das sequências da região ITS do rDNA pela máxima verossimilhança. Os fungos da ordem Russulales *Heterobasidium annosum* e *Bondarzewia bekeleyi* como grupos externos 106
- Figura 15 - Árvore filogenética da falsa trufa associada à mudas cítricas em relação aos gêneros da família Agaricaceae e *Podaxys pistillaris* da Podaxaceae pela análise das sequências da região ITS do rDNA por máxima verossimilhança, com *Gymnopilus junonius* e *Pleurotus ostreatus* como grupos externos 107
- Figura 16 - Árvore filogenética da falsa trufa associada à mudas cítricas em relação a espécies dos gêneros *Agaricus*, *Chlorophyllum* e *Macrolepiota*, outros gêneros da família Agaricaceae e *Podaxys pistillaris* da Podaxaceae pela análise das sequências da região ITS por máxima verossimilhança 108
- Figura 17 - Árvore filogenética do *Gymnopus* associado à mudas cítricas em relação às espécies do gênero, pela análise das sequências da região ITS por máxima verossimilhança. Os fungos da ordem Russulales *Heterobasidium annosum* e *Bondarzewia bekeleyi* como grupos externos 110
- Figura 18 - Aspecto dos principais cogumelos do gênero *Leucocoprinus* observados em mudas e nos viveiros cítricos. A) Cogumelos brancos (*L. brebissonii*); Cogumelos amarelos (*L. birnbaumii*) B, F e I) comum (tipo LB) e C, G, J, L, M e N) o novo tipo amarelo (tipo NTA); D e H) aspecto da impermeabilização do substrato e aspecto micelial em muda com substrato a base de casca de pinus; E, F, G e I) início de formação dos basidiomas na superfície do substrato da muda e pelos furos para drenagem do saco plástico; H) aspecto em tubetes com fibra de coco e N) aspecto por baixo da bancada M) do micélio do tipo NTA e N) dos píleos abertos 112

- Figura 19 - Diferentes fases do desenvolvimento de corpos de frutificação de *Leucocoprinus birnbaumii* (A) e observação de basídios e basidiósporos (B, C, D e E) em microscopia ótica. Barra representa escala de 4 cm 115
- Figura 20 - Estruturas de *Leucocoprinus birnbaumii* antes e após a abertura do píleo (“chapéu”). A) Basidioma expondo as lamelas; B-G) píleo fechado e H-J) aberto; B) Aspecto geral da lamela; C) Visualização do queilocistidio e D) do basidiolo; E) aspecto geral do himênio antes da formação dos basidiósporos; F) Vista lateral do início de formação dos basidiolos; G) Início de formação de do basidiósporo; H) Basídios com basidiósporos e esterigmas; I) Formação não sincronizada dos basidiósporos e J) Basídio após liberação dos basidiósporos, perdendo turgescência 116
- Figura 21 - Aspectos da colônia de *Leucocoprinus birnbaumii* em meio de cultura cenoura-ágar, formação de cogumelos *in vitro* e em substrato, e visualização das hifas por microscopia eletrônica de varredura. A) Colônia em meio cenoura-ágar; B) Formação de basidiomas em meio de cultura e C) em substrato, após exposição à temperatura da sala. D) Visualização das hifas e E) presença de fibulas ou grampos-de-conexão. Escalas de D) 20 μm e E) 10 μm 118
- Figura 22 - Primórdios de corpos de frutificação (CF) de *Leucocoprinus birnbaumii* em meio de cultura A) Aspecto geral e agregado dos primórdios; B) Enovelamento de hifas nas estruturas em formação; C) corte do primórdio do CF mostrando a região central oca e D) da parede espessa; E) estrutura da parede e F) da região próxima da superfície. Escalas de 1mm (A); 100 μm (B-D); 20 μm (E) e 10 μm (F) 118
- Figura 23 - Relação filogenética das espécies de *Leucocoprinus* associados à mudas cítricas (Limeira e BR-MAP) em relação a outros gêneros de agaricales inferida pela análise das seqüências da região ITS do rDNA por máxima verossimilhança 120

Figura 24 - Desenvolvimento de primórdios de corpos de frutificação de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> nos testes de isca para detecção de <i>Phytophthora</i>	121
Figura 25 - Curvas de crescimento de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> em diferentes meios de cultura a 28°C	128
Figura 26 - Crescimento relativo dos isolados monocarióticos e dicarióticos de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> em meio cenoura-ágar, aos 6 e 9 dias	131
Figura 27 - Frequência do tamanho das colônias de populações de culturas monospóricas de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> (LB-MAP e NTA-MAP) e de <i>L. brebissonii</i> (BR-MAP) em meio cenoura-ágar, a 28°C. A) <i>L. birnbaumii</i> tipo LB e B) tipo NTA e C) <i>L. brebissonii</i>	132
Figura 28 - Influência do pH no crescimento em diâmetro de colônias de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> , a 28°C, em meio cenoura-ágar	133
Figura 29 - Composição relativa na composição dos cogumelos associados a mudas cítricas, crescidas em substrato a base de casca de pinus. LB - <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> ; NTA - <i>L. birnbaumii</i> ; e BR - <i>L. brebissonii</i>	140
Figura 30 - Influência do tratamento de mudas de laranja Pêra, enxertadas em limão Cravo com diferentes concentrações de leite na produção de primórdios e cogumelos de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> , colonizadas naturalmente em viveiro comercial	143
Figura 31 - Aspecto de primórdios e de cogumelos de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> ao contato com solução a base de vinagre A) antes e B) após o tratamento	145
Figura 32 - Aspecto dos cogumelos afetados por <i>Penicillium</i> em viveiros comerciais de mudas cítricas. <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> tipo LB (A e B) e tipo NTA (C) e em <i>L. brebissonii</i> (D e E). Ultraestrutura de <i>Penicillium</i> (F) e <i>Aspergillus</i> (G) associados a cogumelos	151

Figura 33 - Colonização temporal do substrato a base de casca de pínus em função da quantidade de sementes de milho pipoca colonizados com <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> a 28°C	154
Figura 34 - Crescimento de fungos basidiomicetos em fibra de coco, associados à produção de mudas cítricas. <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> (LB e NTA), <i>L. brebissonii</i> (BR) e <i>Gymnophilus dilepis</i> (Roxo) e uma testemunha sem fungo, com irrigação duas vezes à semana em casa-de-vegetação após 35 dias da inoculação, veiculado em milho pipoca	155
Figura 35 - Superfície de resposta das concentrações do nitrito de sódio e da uréia no índice de colonização de substrato a base de casca de pínus por <i>Leucocoprinus birnbaumii</i>	157
Figura 36 - Relação entre o comprimento da região ITS1 e a ITS2 em <i>Gymnophilus</i> . a) Comportamento geral; b) Comportamento linear e c) comportamento aleatório restrictivo	159
Figura 37 - Seqüência da região ribossomal ITS1-5.8-ITS2 do isolado <i>Cyathus</i> associado a mudas cítricas, complementada com <i>Cyathus stercoreus</i> (FJ478125). Seqüência dos <i>primers</i> ■; seqüência faltando □, região repetida na região ITS1 e ITS2 ■ e região 5.8S <u>XXX</u>	162

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação do número de acesso das sequências de fungos no GenBank, com a espécie e família e ordem a que pertencem	64
Tabela 2 -	Dimensões e peso fresco das falsas trufas encontradas nas mudas cítricas	101
Tabela 3 -	Dimensões de basidiósporos de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> de cogumelos obtidas no substrato de mudas de citros, produzidas em ambiente protegido, em microscópio ótico	114
Tabela 4 -	Influência do meio de cultura sobre a taxa de crescimento de diferentes isolados de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> , originados de estipes de cogumelos de diferentes procedências e do mesmo local, a 28°C, plaqueados previamente em meio cenoura-ágar	123
Tabela 5 -	Influência do meio de cultura sobre a fase lag de diferentes isolados de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> , originados de estipes de cogumelos de diferentes procedências e do mesmo local, a 28°C, plaqueados previamente em meio cenoura-ágar	124
Tabela 6 -	Influência do meio de cultura sobre a taxa de crescimento de diferentes isolados de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> , originados de estipes de cogumelos de diferentes procedências e do mesmo local, a 28°C, plaqueados previamente no mesmo meio de cultura	125
Tabela 7 -	Influência do meio de cultura sobre a fase lag de diferentes isolados de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> , originados de estipes de cogumelos de diferentes procedências e do mesmo local, a 28°C, plaqueados previamente no mesmo meio de cultura	126
Tabela 8 -	Influência dos meios de cultura sobre a taxa de crescimento e a fase lag de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> , mantidos a 28°C	127

Tabela 9 -	Influência dos meios de cultura sobre a taxa de crescimento de colônias de macrofungos, isolados de viveiros comerciais de mudas cítricas, mantidos a 28°C	129
Tabela 10 -	Diâmetro médio das colônias em meio cenoura-ágar, aos 6 e 9 dias, taxa de crescimento e fase lag de isolados originados de basidiósporos e do estipe de um cogumelo de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> , a 28°C	130
Tabela 11 -	Influência do pH na taxa de crescimento e fase lag de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> em meio cenoura-ágar (CA), a 28°C	134
Tabela 12 -	Influência da fonte de carbono no meio de cultura básico Czapeck sobre a taxa de crescimento de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> , a 28°C	136
Tabela 13 -	Influência da fonte de nitrogênio no meio de cultura básico Czapeck sobre a taxa de crescimento e fase lag de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> , a 28°C	138
Tabela 14 -	Características físico-químicas e composição de macronutrientes e micronutrientes nos três tipos de cogumelos encontrados na produção de mudas cítricas do gênero <i>Leucocoprinus</i>	139
Tabela 15 -	Número médio de primórdios e cogumelos de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> em mudas de laranja Pêra enxertadas em limão Cravo, tratadas com 400mL de diferentes concentrações de leite, em viveiro comercial	142
Tabela 16 -	Número de primórdios e cogumelos de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> em mudas, de laranja Pêra enxertada em limão Cravo, tratadas com 400mL de diferentes concentrações de vinagre, em viveiro comercial	144
Tabela 17 -	Número médio de mudas que apresentavam primórdios ou cogumelos de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> nos experimentos de influência da concentração do leite e do vinagre, em viveiro comercial	144

Tabela 18 -	Número médio de corpos de frutificação de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> em mudas de laranja Pêra enxertadas em limão Cravo, após tratamento com produtos biológicos para o controle do cogumelo amarelo em viveiro comercial, no município de Araras	146
Tabela 19 -	Número médio de corpos de frutificação de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> em mudas de laranja Pêra enxertadas em limão Cravo, após tratamento com defensivos agrícolas para o controle do cogumelo amarelo em viveiro comercial, no município de Araras	147
Tabela 20 -	Número médio de corpos de frutificação de <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> em mudas de laranja Pêra enxertadas em limão Cravo, após tratamento com produtos alternativos para o controle do cogumelo amarelo em viveiro comercial, no município de Araras	148
Tabela 21 -	Efeito da concentração de nitrito de sódio e de uréia no índice de colonização de substrato em frascos, inoculado com milho pipoca colonizado por <i>Leucocoprinus birnbaumii</i> , incubados a 28°C	156
Tabela 22 –	Variação no número de bases na região ribossomal ITS1-5.8S-ITS2 para as diferentes espécies de <i>Gymnopilus</i>	160
Tabela 23 –	Identidade e presença de “Gaps” da região de 30 nucleotídeos duplicada na região ITS de <i>Cyathus</i> associado a mudas cítricas em relação às seqüências disponíveis do GenBank e sua relação com os grupos intragenéricos de <i>Cyathus</i>	163
Tabela 24 -	Seqüências de potenciais <i>primers</i> , analisadas <i>in silico</i> a especificidade e a qualidade a partir da seqüência da região ITS de <i>Cyathus</i> associada à mudas cítricas	164

1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira é destaque, não somente pela grandiosidade do agronegócio envolvido, mas pela superação de obstáculos, principalmente relacionados a doenças e pragas, e no momento atual, frente à crise mundial. Esta capacidade aliada à grande área propícia para o seu cultivo, levou o Brasil à liderança na produção de laranja. O resultado deveu-se preferencialmente pela obtenção de novas copas e porta-enxertos em momentos críticos, além do aumento da produtividade ou estabilidade da produção, pelo uso de insumos e defensivos agrícolas, melhorando a sanidade e nutrição das plantas cítricas, culminando no manejo integrado de pragas e doenças.

O manejo dos pomares sofreu graves mudanças com a chegada de novas pragas e doenças nos últimos 25 anos. A clorose variegada dos citros (CVC), provocada por *Xylella fastidiosa* Wells et al., trouxe a poda dos ramos afetados e o manejo das cigarrinhas, transmissoras da bactéria. A mancha preta dos citros ou pinta preta (*Guignardia citricarpa* Kiely) o aumento das pulverizações para proteção dos frutos desde a queda de pétalas, passando de duas para quatro. O minador-dos-citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton) levou a alteração nas medidas de erradicação do cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Vauterin et al.), o qual acontecia de forma agregada, para um padrão aleatório quando acima de 0,5% das plantas afetadas, mudando as práticas de inspeção e de perda de plantas. A mancha marrom (*Alternaria alternata* [Fr.:Fr.] Keissl) nas tangerinas que fez com que ocorressem até 12 aplicações para obter frutos de qualidade e inviabilizando em algumas áreas o plantio do tangor Murcott [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *C. reticulata* Blanco]. O huanglongbing ou greening (*Candidatus Liberibacter asiaticus*, L. americanus e agora até um fitoplasma) traz um desafio maior, por afetar todas as variedades cítricas comerciais, principalmente laranjas e tangerinas, e levar à erradicação das plantas afetadas assim como a um controle contínuo dos psílídeos vetores (*Diaphorina citri* Kuwayama).

Visando a sanidade das plantas, principalmente das mudas cítricas, a produção em ambiente protegido trouxe um grande avanço na qualidade e reconhecimento mundial, principalmente para o convívio com a CVC. O viveirista de citros se adaptou às novas mudanças e trouxe novas tecnologias de produção, como o uso de compostos de casca de pinus e da fibra de coco, como substrato para o crescimento das plantas, melhorando a qualidade do sistema

radicular, a sanidade da planta, a redução do tempo para obter a muda pronta e um melhor desenvolvimento após o plantio.

Toda mudança traz benefícios, mas adaptações e novos problemas associados podem ocorrer. O uso de substratos, em substituição ao solo, trouxe problemas de homogeneidade, nutrição, toxidez de boro, compostagem e por último a presença do cogumelo amarelo, identificado neste trabalho como *Leucocoprinus birnbaumii* (Fr.) Nf.. Este último, embora não sendo um patógeno, pode inibir o desenvolvimento da planta pela impermeabilização do substrato.

O cogumelo amarelo (*L. birnbaumii*) é um novo desafio na produção de mudas e precisa ser estudado em todas as áreas, do ponto de vista genético, fisiológico, de controle e de detecção. Mas, ele precisa ser avaliado conjuntamente com a diversidade de macrofungos que vem sendo associados a este novo sistema de produção de mudas e suas implicações, não de forma pontual, mas holisticamente, porque alguns destes fungos poderão causar prejuízos indiretamente, pela sua grande capacidade de decomposição de substratos lignocelulolíticos. Assim, este trabalho visa poder auxiliar na resposta a estas necessidades, dando um apoio do ponto de vista básico e aplicado.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Citricultura

Na produção de frutas, as cítricas são as mais produzidas no mundo, sendo estimada em 108 milhões de toneladas por ano. A citricultura mundial é desenvolvida em 137 países, mas a sua produção concentra-se principalmente no Brasil, nos Estados Unidos e na China. A produção brasileira de citros está ao redor de 20,5 milhões de toneladas por ano, correspondendo a um quarto da produção mundial (FAO, 2009). Entretanto, esta produção está predominantemente destinada à industrialização, principalmente quando consideramos as laranjas. Apesar de o Brasil ser líder mundial na comercialização internacional de suco de laranja concentrado congelado, participando com 80% do volume, sofre sanções na forma de barreiras tarifárias e fitossanitárias que visam diminuir a competitividade nacional (BOTEON; NEVES, 2005).

No Brasil, a citricultura ocupou uma área aproximada de um milhão de hectares, e no Estado de São Paulo cerca de 770 mil hectares (FNP, 2005), distribuídos em 330 municípios, mas este Estado vem diminuindo a sua área citrícola para 550 mil hectares devido às dificuldades de manejo de doenças e pelo mercado (FNP, 2009). No Estado, quase 80% da produção é destinada à indústria, cujo suco é exportado para vários países, principalmente para a comunidade europeia (71%), USA (12%) e Ásia (10%) (BOTEON; NEVES, 2005).

Atualmente, a citricultura brasileira, vem sofrendo graves prejuízos por problemas fitossanitários, devido ao surgimento de doenças (clorose variegada dos citros, mancha preta dos citros, mancha marrom das tangerinas e huanglongbing), ou pelo ressurgimento de velhos problemas, como o cancro cítrico. No caso da produção de mudas cítricas, o cancro cítrico (*X. axonopodis* pv. *citri*), a gomose dos citros (*Phytophthora* spp.) e o cogumelo amarelo (*L. birnbaumii*) são os problemas que vem ocorrendo nos últimos anos. O cogumelo amarelo vem sendo detectado entre os produtores desde 2004 acentuando-se desde então, sendo identificado morfológicamente em 2005, como parte deste trabalho (AGUILAR-VILDOSO et al., 2006a).

Na citricultura moderna a planta cítrica é uma quimera, formada pela realização da enxertia, geralmente de duas espécies diferentes, uma representada pela copa que será formada e produzirá os frutos, e a outra pelo porta-enxerto, responsável pelo sistema radicular. Este procedimento trouxe como benefício, a precocidade de produção, a não formação de espinhos, a diminuição do tamanho da planta, a tolerância à seca e a resistência a doenças do solo e nematóides, além da garantia das características da planta clonada (POMPEU JUNIOR, 2005).

Apesar dos grandes benefícios que a enxertia trouxe, houve desafios que precisaram ser superados durante a história da citricultura brasileira e mundial. Os chineses já praticavam a enxertia a mais de mil anos, mas o seu amplo uso ocorreu no século XIX principalmente para aumentar a resistência à gomose dos citros provocada por espécies do gênero *Phytophthora*, sendo escolhida a laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) pela sua resistência a este patógeno. Este porta-enxerto predominou na citricultura paulista até a chegada da tristeza em 1937, que dizimou os pomares cítricos (MÜLLER et al., 2005). A constatação que combinações de copa/porta-enxerto tolerantes ao vírus da tristeza dos citros (CTV) levou a um novo ressurgimento da citricultura pelo uso do limão Cravo (*C. limonia* Osbeck). Entretanto muitas variedades cítricas estavam com exocorte e/ou com xiloporose, sendo este novo porta-enxerto sensível, apresentando reduções de até 70% da produção (POMPEU JÚNIOR; SALVA; BLUMER, 2004). Os clones nucelares (plantas originadas de sementes) resolveram este problema, visto que estes patógenos, não passam pela semente e assim esta “limpeza” permitiu a retirada das gemas de plantas matrizes isentas do viróide da exocorte e possibilitando o uso do limão Cravo na citricultura. Apesar deste ganho, a variedade de laranja Pêra [*C. sinensis* (L.) Osbeck] sofria graves perdas, pois mesmo em porta-enxerto tolerante, os tecidos desta variedade eram sensíveis ao CTV. A seleção de plantas que não apresentavam perdas significativas nos pomares da variedade ‘Pêra’ levou à seleção de estirpes atenuadas do vírus da tristeza. O uso de gemas contendo estes vírus com menor agressividade levou à denominação da pré-imunização da variedade Pêra, que permitiu novamente o seu uso, a qual é estratégica por ser de uso tanto para o mercado *in natura* como para a indústria; além das múltiplas floradas que permitem uma maior distribuição da produção.

Plantas afetadas pelo cancro cítrico foram detectadas no Estado de São Paulo desde 1957 e desde então o sistema de inspeção, erradicação e medidas preventivas foram adotadas (ROSSETTI, 1977). O agente causal é a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vaut

devido a sua importância para o Brasil e o mundo foi sequenciado o seu genoma e determinadas novas estratégias de patogenicidade. Esta bactéria provoca lesões em frutos, folhas e caules jovens, mas a sua principal importância é ser uma praga quarentenária em muitos países, servindo de barreira fitossanitária para negociações comerciais (GOTTWALD et al., 2001). Esta bactéria penetra pela abertura dos estômatos e por ferimentos, o que leva inúmeros fatores que aumentam sua incidência e severidade, pelo qual a necessidade de várias práticas que minimizem a sua introdução como os quebra-ventos. A sua dissiminação é facilitada pelo simples contato e pela sua sobrevivência, principalmente em tecidos sintomáticos pelo qual são tomadas as medidas profiláticas com pessoas, veículos e materiais usados nos pomares.

No final da década de 70, surgiu o declínio dos citros afetando os pomares em limão Cravo (RODRIGUEZ et al., 1979), o que levou a uma maior diversificação de porta-enxertos, mas não à substituição, porque as perdas ocorriam em pomares com mais de dez anos. Apesar de ser conhecida a mais de cem anos no mundo, ainda não se sabe o real agente etiológico desta doença (DERRICK; TIMMER, 2000) e a diferenciação de outros problemas pode ser realizada pela constatação da obstrução dos vasos na avaliação da absorção da água, usando uma seringa e uma furadeira, no período chuvoso do ano (LEE et al., 1984).

Em 1987 foi detectada a clorose variegada dos citros que afeta as principais variedades de laranjeiras, doença surgida no Brasil e provocada pela bactéria *X. fastidiosa* (ROSSETTI et al., 1990 e LEE et al., 1993). Para poder conviver com a doença, iniciou-se uma mudança radical na produção das mudas cítricas, passando a ser realizada somente em ambiente protegido por telados (CARVALHO; LARANJEIRA, 1994), para evitar as várias espécies de cigarrinhas (ALMEIDA et al. 2005), vetores já conhecidas deste patógeno (PURCELL; FINLAY, 1979), tornando-se obrigatório este modelo de produção no Estado de São Paulo desde 2001. Esta mesma espécie de patógeno foi detectada afetando café (PARADELA FILHO et al., 1997), mas foram separadas, sendo a subespécie *X. f. subsp pauca* para a associada aos citros (SCHAAD et al., 2004).

Em 1992 foi detectada a mancha preta ou pinta preta no Estado de São Paulo que se tornou a principal doença fúngica, passando de duas para até cinco aplicações para o seu controle no pomar, limitando as exportações de fruta *in natura* (AGUILAR-VILDOSO et al., 2002). A presença de formas endofíticas dificultou o diagnóstico, até serem separadas em duas espécies diferentes, *Guignardia citricarpa* para a patogenicidade e *G. mangiferae* para a endofítica (GLIENKE-BLANCO, et al., 2002).

Em 1996, o minador-dos-citros (*Phyllocnistis citrella*) foi detectado no Estado de São Paulo (PRATES; NAKANO; GRAVENA, 1996), o que provocou uma mudança radical da epidemiologia do cancro cítrico e levou a mudança do sistema de erradicação e inspeção nos pomares. O número de focos sofreu drástica alteração, de 25 casos por ano em 1995, para 4180 em 1999; e a distribuição espacial foi de altamente agregada para uma agregação intermediária e aleatória (BERGAMIN FILHO et al., 2001).

A morte súbita dos citros (MSC) ocorreu na região do triângulo mineiro e norte do Estado de São Paulo em 2001 e provocou uma grande preocupação por afetar o limão Cravo, principal porta-enxerto brasileiro e o mais resistente à seca da região (GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001; MÜLLER et al. 2001). Este problema pelas características e epidemiologia deveria ser de origem viral (MÜLLER et al., 2002) e podia ser transmitido por enxertia (ROMÁN et al., 2004), o que aumentava a necessidade de descobrir o agente etiológico e a confirmação dos insetos vetores. A doença foi associada a um variante do vírus da tristeza (CTV) (COLETTA FIHO et al.; 2005) e a um timovirus (CSDaC) (MACCHERONI et al., 2005), entretanto a extrema variabilidade do CTV e a baixa concentração do CSDaV vem limitando a confirmação do agente etiológico. Entretanto, os viveiristas foram obrigados a usarem telas anti-afídeo na produção de mudas quando o pulgão preto (*Toxoptera citricida* Kirkaldy) foi sugerido como vetor (FUNDECITRUS, 2003).

Em 2002 foi detectada a mancha marrom de *Alternaria* em tangerinas o que inviabilizou a produção em algumas áreas do tangor Murcott, visto que deveriam ser aplicadas até 12 pulverizações de fungicidas para o seu controle (AGUILAR-VILDOSO et al., 2004).

Em 2004 foi confirmada a presença no Estado de São Paulo do huanglongbing (HLB) ou greening, sendo que as bactérias são transmitidas pelo psílídeo, o qual já se encontrava no Estado, além de possuir grande capacidade de disseminação o que levou a um grande número de municípios afetados em poucos meses. Devido a isso, foi tomada como medida de controle a erradicação das plantas com sintomas, fato este que somente é viável com o comprometimento do citricultor para com a inspeção das plantas e com a complementação do Fundecitrus. Além disso, se faz necessário várias pulverizações com inseticidas, sendo realizado até aplicações quinzenais com alternância de princípios ativos (LARANJEIRA et al. 2005b).

Em 2008 foi confirmada a presença da mosca negra (*Aleurocanthus woglumi* Ashby) no Estado de São Paulo, sete anos após ter sido constatada no Brasil, no Pará (OLIVEIRA; SILVA;

NAVIA, 2001) e cinco da observada no Maranhão (LEMOS et al., 2006). Apesar da preocupação no início, o controle já realizado para os psílídeos vetores do HLB está sendo suficiente para o controle desta nova praga. Entretanto problemas com resistência aos inseticidas é esperado para ambos os insetos, como desequilíbrios no manejo integrado de pragas e doenças dos citros, sendo essencial para a superação e convivência com estas doenças/pragas a produção de mudas sadias.

2.1.2 Produção de mudas

O tipo de enxertia usada é a borbulhia que emprega uma gema obtida de plantas matrizes produtivas, na qual os tecidos do lenho se soldaram aos do caule da outra planta, denominada de porta-enxerto. Após a confirmação do “pegamento”, é retirada a parte aérea do porta-enxerto e forçada a brotação da gema, para formação de planta cítrica (CARVALHO et al., 2005).

A sanidade das mudas vem sendo garantida principalmente pela realização de medidas preventivas, durante todas as fases de produção. O material de propagação (a semente e a borbulha) tem que ser originado de plantas matrizes certificadas. As sementes são retiradas de frutos sadios, que não tenham caído no chão, secas, tratadas com fungicidas e resfriadas para a conservação. Antes do seu uso, as sementes passam por um tratamento térmico a 52°C por 10 minutos para evitar *Phytophthora* (FEICHTENBERGER, 1996); e para facilitar a retirada da casca da semente, esta é tratada em solução à base de hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio, o qual também serve para desinfecção superficial das sementes. As borbulhas têm que ser originárias de borbulheiras certificadas as quais foram produzidas de matrizes certificadas. As borbulheiras são mantidas em ambiente protegido e devem ser usadas por até cinco anos, para depois serem substituídas. Anualmente deve ser realizado o diagnóstico de *X. fastidiosa* por PCR e inspeções visuais para outras doenças como o cancro cítrico ou HLB (LARANJEIRA et al. 2005a).

Os colaboradores não usam a roupa com que chegam ao viveiro, em alguns casos tomam um banho em um vestiário e colocam a roupa e calçados próprios do viveiro, os quais são lavados ou limpos várias vezes na semana, sendo ideal o procedimento diário ou quando houver alguma atividade que suje a roupa. Antes de entrar nas estufas passam por um pé de lúvio e desinfetam as mãos (LARANJEIRA et al. 2005a). É também solicitado que os funcionários não possuam

plantas cítricas nas suas casas, que não levem frutas cítricas para as refeições, nem telefones celulares para dentro das estufas, por não poder desinfetar estes aparelhos.

A escolha do local é extremamente importante, porque quanto mais afastado de um pomar, menor as possibilidades de entrada dos patógenos pelo vento ou por pessoas que passem por estas fontes de inóculo. A distância legal recomendada é de 200 metros, mas sabemos que esta distância não é suficiente para garantir a segurança, o que pode ser observado quando ocorre uma detecção do cancro cítrico em um viveiro, e o raio de quarentena é de 1200m. Todos os veículos devem ser bem lavados e desinfetados para entrar nos viveiros, para o qual é usado o rodolúvio com solução de amônia quaternária, principalmente para o controle do cancro cítrico (LARANJEIRA et al. 2005a).

As estufas são feitas com tela de polietileno na parte externa e por cima cobertas com plástico, para evitar insetos vetores, principalmente cigarrinhas, psílídeos e pulgões, vetores da CVC, do HLB, da morte súbita dos citros (MSC) e da tristeza dos citros. Para evitar a entrada de insetos há uma antecâmara antes das portas das estufas e as telas e plásticos são vistoriados constantemente para não ocorrer furos. As mudas precisam estar a uma distância de forma que as folhas ou ramos não encostem na tela durante toda a fase de formação (CARVALHO et al., 2005).

As inspeções e o monitoramento garantem que as medidas realizadas estão adequadas. As armadilhas dispostas dentro das estufas garantem a vistoria constante da presença de insetos externos, esperando-se não ser encontrada nenhuma cigarrinha, pulgão ou psílídeo, sendo comumente encontradas o díptero *Bradysia* spp. conhecido como “fungus gnat” e moscas predadoras desta praga de substrato (RADIN, et al. 2009) . Detecções nas armadilhas de insetos não veiculados pelo substrato representam algum tipo de falha nas medidas, as quais precisam ser reavaliadas e modificadas (LARANJEIRA et al. 2005a).

Todas estas medidas garantem a segurança dos viveiros, mas devem estar constantemente revistas para que elas sejam eficientes. Mudanças nas inspeções do cancro cítrico ocorreram porque a simples inspeção das plantas não tem sido adequada, como os casos confirmados nos últimos anos. As contaminações por *Phytophthora* ainda mostram que as medidas não estão adequadas e precisam ser revistas, a diferença é que a simples eliminação das plantas pelo cancro cítrico é suficiente para garantir a nova produção no mesmo local, mas não é o caso de

Phytophthora, por contaminar o solo do viveiro e ser difícil a sua erradicação do local (FEICHTENBERGER, 1996).

A substituição do solo por substratos orgânicos é uma medida que levaria a uma produção de mudas isentas de problemas do solo, porque durante a sua produção passam por temperaturas que são letais para as principais pragas e patógenos. Além da sua capacidade de retenção de água e nutrientes, levando à maximização do crescimento dos porta-enxertos e das mudas por meio de adubações equilibradas (RUSCHELL et al., 2004; FERRAREZI, 2007). Os substratos a base de casca de pinus sofrem o processo de compostagem, os quais chegam a temperaturas de 60-70 °C por meses. Estas temperaturas são suficientes para eliminar os inóculos de patógenos de plantas, de plantas daninhas e outras pragas. As bordas das pilhas não chegam nessas temperaturas e são locais onde pode falhar o sistema de produção, mas como é uma pequena parte dos lotes, a diluição torna-se quase impossível por diluição e amostragem, principalmente se as amostras são retiradas do centro das pilhas. As fábricas separam as áreas de produção dos veículos que carregam o substrato pronto para evitar a contaminação externa. Para os funcionários há pé de lúvios e a desinfecção de mãos, como a troca de roupa à semelhança das medidas adotadas nos viveiros cítricos (LARANJEIRA et al. 2005a).

Os substratos a base de fibra de coco é originado como subproduto da indústria da água de coco, mas está se tornando de grande importância comercial. Ele passa por um tratamento com água quente para retirar o excesso de sódio, com o qual também garante a qualidade fitossanitária, mas durante o seu trajeto até os viveiros, dependendo do transporte e do seu armazenamento, podem ser contaminados. No momento, os principais problemas fitossanitários que podemos encontrar associados aos substratos são *Phytophthora* spp., díptero *Bradysia* spp. e os macrofungos, ou como os viveiristas os denominam simplesmente de cogumelos.

2.1.3 Macrofungos

O termo macrofungo (ou macromiceto) pode ser definido como as espécies fúngicas que produzem corpos de frutificação visíveis sem o auxílio do microscópio (ULLOA; HANLIN, 2000), isto é, maiores que um centímetro de altura e/ou de largura. O termo refere-se especificamente ao esporocarpo do que ao micélio, o qual vive sobre ou dentro do substrato em

decomposição. Os macrofungos incluem grupos que são conhecidos popularmente como cogumelos, orelhas-de-pau, ninho-de-passarinho ou trufas, termos que refletem a diversidade morfológica que é encontrada nestes fungos (KIRK et al., 2001). Os nomes e sinônimos usados para identificar os fungos são considerados como os listados no CABI Index Fungorum (www.indexfungorum.org) sendo que a última grande mudança nos táxons dos fungos foi realizada recentemente, nos quais tanto ascomicetos como basidiomicetos estão dentro do sub-reino dikarya, caracterizado por fungos unicelulares ou filamentosos, com perda do flagelo nos seus esporos e frequentemente incluindo estados dicarióticos (HIBBETT et al., 2007).

2.1.3.1 Ascomicetos

O grupo dos ascomicetos inclui os fungos que produzem esporos sexuais internos, dentro de estruturas unicelulares (ascos), onde ocorre a cariogamia e a meiose para formar os ascósporos. Os ascocarpos podem ser do tipo fechado (cleistotécios), com pequena abertura (peritécios), abertos em forma de taça (apotécios), ou imersos em estromas (ascostromas). Os apotécios podem ser abertos desde o início da sua formação (euginohiménial), fechados durante o desenvolvimento para abrir na maturidade dos ascósporos (paraginohiménial) ou nunca abrir em formas hipógeas (cleistohiménial); este último como é o caso das trufas (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

Atualmente, o filo ascomycota é subdividido nos subfilos Taphrinomycotina; Saccharomycotina e Pezizomycotina (HIBBETT et al., 2007). O subfilo Taphrinomycotina é constituído por leveduras e alguns fungos dimórficos que não possuem célula ascogênica para dar origem aos ascos, o qual é considerado monofilético e diferenciou-se no início da formação do filo ascomycota, sendo archiascomycetes o termo antigo mais próximo. Como exemplo tem os gêneros *Schizosaccharomyces* (leveduras com divisão por fissão), *Taphina* (fitopatógeno dimórfico, leveduriforme em cultura e filamentoso na planta hospedeira) e *Neolecta* (único macrofungo deste subfilo) (HIBBETT et al., 2007). O Saccharomycotina é constituído por leveduras frequentemente acompanhadas de pseudohifas e/ou hifas verdadeiras, que não formam ascocarpos. O asco pode ter de um a vários ascósporos. A reprodução assexuada pode ser por gemulação, conidial ou por fissão (artrósporos). Como exemplo tem *Saccharomyces* e *Candida*

(HIBBETT et al. 2007). O Pezizomycotina é sinônimo do termo Euascomicota, agrupa a maioria dos fungos filamentos que se reproduzem por fissão e produzem hifas e corpos de frutificação que pertencem ao filo ascomicota (HIBBETT et al. 2007), incluindo a predominância dos macrofungos com corpos de frutificação visíveis a olho nu, como trufas, apotécios e alguns peritécios da ordem Xylariales (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

A antiga classe dos Discomycetes ainda é usada para descrição dos táxons com formação de apotécios, tanto abertos como fechados, principalmente para as ordens Helotiales, Elaphomycetales, Ostropales, Pezizales e Rhytismatales (KIRK et al., 2001). A ordem Pezizales é caracterizada por ascomatas fechados de várias formas e derivadas dos apotécios, podendo ser epígeos, semi-hipógeos e hipógeos (trufas). Anteriormente as trufas encontravam-se na antiga ordem Tuberales (PUTZKE; PUTZKE, 2004b; SILVEIRA, 1995). A família Tuberaceae possui como característica ascocarpos sólidos, imersos no substrato (hipógenos), mais ou menos esféricos com ascos unitunicados e que permanecem fechados, liberando os ascósporos somente quando eles se decompõem ou são quebrados por animais micofagos. Além dos mamíferos, como cachorros e porcos, insetos também estão associados à detecção das trufas, como alguns besouros e moscas (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). A família tuberaceae é caracterizada por ascósporos marrom-escuro e ornamentados, os ascos possuem de 1 a 6 ascósporos, sendo as mais comuns as trufas condimentares do gênero *Tuber* (PUTZKE; PUTZKE, 2004b; SILVEIRA, 1995).

2.1.3.2 Basidiomicetos

O grupo dos basidiomicetos inclui os fungos de micélio septado que produzem esporos sexuais externos às hifas especializadas (basídios), pelo qual são denominados de basidiósporos, e geralmente, são formados nos ápices dos esterígmias (ULLOA; HANLIN, 2000). Nele são encontradas muitas espécies que formam estruturas macroscópicas, com hifas modificadas formando pseudotecidos, denominados corpos de frutificação, basidiocarpos e basidiomas, sendo o último, o termo mais aceito (PUTZKE; PUTZKE, 2004b). O organismo propriamente dito é formado pelo micélio que coloniza e explora o substrato, apesar de muitas vezes não ser levado em consideração como deveria, principalmente quando consideramos a ciclagem de nutrientes e as interligações entre diferentes comunidades, principalmente de plantas e fungos nas florestas.

O micélio consiste de hifas septadas, bem desenvolvidas, microscópicas, que podem ser facilmente observadas quando formam massas miceliais. As hifas podem apresentar grampos de conexão, fíbulas ou anças que são a formação de uma ponte sobre o septo, ocorrendo somente em tecidos dicarióticos, permitindo a passagem de um dos núcleos, enquanto o outro passa pelo poro, mantendo-se a condição dicariótica entre um septo e outro (PUTZKE; PUTZKE, 2004b).

O micélio dos basidiomicetos pode ser de três tipos, denominados de primário, secundário e terciário. O primário é formado pela germinação do basidiósporo e formação de um micélio haplóide. O secundário pela fusão de hifas originadas de esporos diferentes (anastomose), ocorrendo compatibilidade passam a crescer juntas numa única hifa, de constituição dicariótica e podendo apresentar fíbulas. Este micélio pode tronar-se perene no substrato até formar o corpo de frutificação (cogumelo), quando produzira pseudotecidos (micélio terciário), constituindo as diferentes estruturas especializadas, para culminar na produção dos basidiósporos pelos basídios. Assim, o micélio terciário é que constitui os “tecidos” dos macrofungos, sendo dicariótico (KIRK et al., 2001; PUTZE; PUTZE, 2004b).

A antiga classe de basidiomycetes foi elevada a filo (basidiomycota), possuindo três novos subfilos os quais são Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina e Agaricomycotina (Hibbett, 2006). A Agaricomycotina agrupa os fungos macroscópicos e com basídio não septado (antiga subclasse Homobasidiomycetidae), enquanto a Pucciniomycotina inclui as ferrugens e a Ustilaginomycotina os carvões e alguns basídios não septados como a ordem Exobasidiales (HIBBETT et al., 2007).

O subfilo Agaricomycotina deve ter surgido entre 380 e 960 milhões de anos, possuindo como ordens mais antigas Sebacitenales, Cantharellales e Auriculariales, enquanto que Agaricales, Boletales e Atheliales como as mais recentes, sendo agrupadas na sub-classe Agaricomycetidae e a ordem Russulales deve ser o grupo irmão a este clado (HIBBETT, 2006).

Os macrofungos dos basidiomicetos possuem dois tipos básicos de basidiósporos, em função da sua liberação. Os balistósporos que são liberados abruptamente e encontram-se numa linha himenal organizada, seja nas lamelas dos Agaricales, seja nos poros dos Boletales (ULLOA; HANLIN, 2000). Os estatimósporos são liberados passivamente e são encontrados no antigo grupo dos gasteromicetos, os quais não apresentam himênio exposto, por isso, não possuem lamelas nem poros, como na família Nidulariaceae e as ordens Sclerodermatales ou Lycoperdales (ULLOA; HANLIN, 2000).

2.1.3.2.1 Cogumelos com lamelas

Estes fungos pertencem à ordem Agaricales e são rapidamente identificados pelo basidioma denominados popularmente de cogumelos, com o estipe (“haste”) sustentando o píleo (“chapéu”), que na sua parte inferior apresenta as lamelas (“lâminas”). A superfície das lamelas é composta pela superfície himenal onde se encontram os basídios, basidiólos, basidiósporos e cistídios. Os cistídios são estruturas estéreis que ocorrem entre os basídios sendo denominados pleurocistídios quando ocorrem na lateral das lamelas; queilocistídios quando nas extremidades das mesmas; pileocistídios quando na superfície do píleo e caulocistídios quando na superfície do estipe; e podendo ter outros nomes (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Estes basidiomas são carnosos e de vida curta (efêmeros) e a taxonomia de família, gênero e espécie é baseada na morfologia macro e microscópica deles (KIRK et al., 2001), entretanto, as identificações ou novas classificações precisam do aval da sistemática molecular, pelo sequenciamento da região ribossomal, principalmente das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 (GUZMÁN-DÁVALOS et al., 2009).

A família Agaricaceae possui 51 gêneros com 918 espécies que possuem como características principais píleo variando de convexo a aplanado, normalmente umbonado, liso a escamoso, lamelas sempre livres, estipe central e com presença de anel. Microscopicamente caracterizam-se por apresentar basidiósporos ovóides ou elipsóides, dextrinóides, com poro de germinação presente ou ausente, com coloração variada, mas não marrom canela nem ferruginosa (KIRK et al., 2001). Os basídios clavados, normalmente tetraesporados, pleurocistídios raros, queilocistídios normalmente presentes e trama da lamela regular a irregular (PUTZE; PUTZE, 2004b). Na sua maioria saprófitas e participam da decomposição de folhas, galhos e troncos, sendo encontrados em uma grande variedade de substratos e em diferentes biomas como mata, cerrado, floresta e restinga (CAPELARI, 1989). Há representantes comestíveis, sendo o mais conhecido e cultivado no Brasil, *Agaricus bisporus* (Lange) Singer (champignon-de-paris) e algumas espécies de *Macrolepiota* que não se conhece cultivo em escala comercial. Algumas espécies são venenosas, como exemplo *Chlorophyllum molybdites* (Meyer: Fr.) Masee que, se consumido cru, pode causar problemas gastro-intestinais (SINGER, 1986).

Dentre os membros da tribo Leucocoprineae, o gênero *Leucocoprinus* macroscopicamente é caracterizado por possuir píleo aplanado, às vezes umbonado, com lamelas livres próximas entre si, com estipe central e cilíndrico e anel presente. Ao microscópio, as principais características são os basidiósporos de parede espessada, metacromáticos em azul de cresil, dextrinóides, com poro de germinação evidente, porém ausente em poucas espécies, ausência de pleurocistídios e queilocistídios sempre presentes. Dentro deste táxon há dois grupos distintos morfologicamente, um grupo com basidiósporos grandes, parede espessada e com poro de germinação e um outro grupo com basidiósporos pequenos, parede fina e sem poro de germinação, sendo representado por 40 espécies principalmente tropicais e em casas de vegetação nas regiões temperadas (KIRK et al., 2001).

2.1.3.2.2 Cogumelos com poros

Na ordem Boletales, os basidiomas também recebem a denominação de cogumelos à semelhança da ordem Agaricales, entretanto, ao invés de haver lamelas na superfície inferior do píleo há tubos, pelo qual a superfície himenal é dita poróide. Os tubos podem ser separados do píleo com certa facilidade (GUGLIOTTA; CAPELARI, 1999). As espécies mais conhecidas são os comestíveis do gênero *Boletus* e *Suillus*, as quais formam associações ectomicorrízicas.

Na ordem Russulales podem ser encontradas espécies com basidiomas tanto agaricóides (com lamelas expostas como em *Russula* e *Lactarius*) como gastróides (formados no interior dos corpos de frutificação como nos gêneros *Gymnomycetes* e *Martellia*), os quais são classificados nas famílias: Russulaceae e Elasmomycetaceae, respectivamente. Os Russulales diferem dos Boletales e Agaricales porque os basidiomas possuem trama heterogênea com grupos de heterocistos dispersos, que se originam de uma hifa central de forma de roseta. Também apresentam sistema laticífero, ausência de fibulas e apresentam cistídios denominados de pseudocistídios e macrocistídios. Os basidiósporos possuem uma estrutura complexa, são hialinos e ornamentados. A ornamentação apresenta reação amilóide e pode ser verrucosa, espinhosa, sulcada ou reticulada (KIRK et al., 2001).

2.1.3.2.3 Orelhas-de-pau

Os fungos conhecidos como “orelha-de-pau”, alguns com estipe, constituíam um grupo polifilético na antiga ordem Aphyllophorales (HIBBETT et al., 2007), passando a compor a ordem Polyporales, com 23 famílias e 298 gêneros (KIRK et al., 2001), a qual em alguns casos mostrasse monofilético (HIBBETT, 2006). A maioria deles são lignícolas, pelo qual podem ser agrupados em: 1) causadores de podridão branca produzem celulasas e ligninases capazes de quebrar os principais componentes da madeira (celulose, hemicelulose e lignina); e 2) os causadores da podridão parda, os quais removem a celulose e hemicelulose, mas não a lignina (GUGLIOTTA; CAPELARI, 1999). Os basidiomas são coriáceos a lenhosos, gimnocárpicos (himênio sempre exposto) e holobasídios, podendo possuir himênio estratificado (renovação do himênio pela substituindo o anterior, basidioma com vários ciclos de produção de esporos). Como exemplos há o gênero *Ganoderma* comumente encontrado em árvores mortas, que sofreram morte parcial do tronco por traumatismos e em alguns casos por podridão provocada pelo próprio fungo (KIRK et al., 2001).

2.1.3.2.4 Ninho-de-passarinho

A família Nidulariaceae da ordem Agaricales possui peridiólos numerosos, aderidos ao perídio, geralmente lenticulares, disseminados pelo impacto da gota da chuva, por que não tem nenhum mecanismo ativo de expulsão dos peridiólos, sendo os esporos lisos e hialinos (PUTZKE; PUTZKE, 2004b).

2.1.3.2.5 Corpos de frutificação fechados

Os gasteromicetos possuem como estruturas comuns o perídio, a gleba e o capilício. Perídio é a camada externa do basidioma; a gleba é a parte interna do perídio e compreende a massa de esporos e estruturas associadas. Como a liberação dos esporos não é ativa, ocorrem várias formas de abertura do perídio. Nas formas epígeas a liberação ocorre pelo vento e pela água. Os Phallales são disseminados por insetos porque eles os atraem e possuem uma mucilagem que garante a adesão dos esporos aos animais. Nos hipógeos, a dispersão é realizada

por invertebrados e mamíferos, como ocorre com as trufas verdadeiras (GUGLIOTA & CAPELARI, 1998).

As mudanças taxonômicas deste grupo morfológico foram muito grandes, principalmente nos Agaricomycotina, no qual foi demonstrado que a ocorrência da formação de gasteromórficos ocorreu pelo menos em seis eventos (HIBBETT et al., 1997) e a necessidade de poucas alterações genéticas para isto ocorrer, como a alteração de um único alelo em *Lentinus tigrinus*, que torna o himenóforo fechado (HIBBETT; TSUNEDA; MURAKAMI, 1994). Muitas ordens foram alteradas para famílias como Lycoperdales e Nidulariales para Lycoperdaceae e Nidulariaceae, respectivamente, dentro da ordem Agaricales. Nos Lycoperdaceae a gleba possui cavidades e pulverulentas na maturidade com capilício. O perídio constituído de duas camadas (exo e endoperídio), podendo ter até quatro. São saprófitas podendo ser micorrízicos, alcançando diâmetros de até 80 cm (*Calvatia gigantea*). São comestíveis quando jovens e com o interior branco, sendo o sabor desagradável quando maduros; para algumas pessoas podem provocar dificuldades intestinais (PUTZKE; PUTZKE, 2004b).

2.1.4 Identificação de macrofungos

O conceito de espécies é bastante discutido e polêmico, mas a importância da espécie como unidade fundamental da evolução onde as forças micro e macroevolutivas convergem para gerar a diversidade biológica é unânime. A identificação das espécies é essencial para os objetivos de documentação, descrição e preservação da biodiversidade, assim a definição de um indivíduo ou de uma população é decidido para cada caso, devendo as informações comportamentais, geográficas, moleculares e morfológicas colaborar para este fim (YODER et al., 2005).

A principal identificação nos diferentes táxons é baseada na caracterização morfológica dos corpos de frutificação, tanto ao nível macroscópico como microscópico. Nos últimos anos a identificação molecular vem auxiliando neste objetivo, diminuindo a subjetividade e podendo relacionar grupos principalmente ao nível de classe, ordem e família, por permitir melhores comparações do que a fornecida pela morfologia para a realização de inferências (LI, 1997).

2.1.4.1 Identificação morfológica

A identificação dos macrofungos é baseada em características qualitativas e quantitativas dos corpos de frutificação e dos esporos (basidiósporos ou ascósporos). Como a predominância é de cogumelos, haverá um detalhamento para estes grupos, seguindo as denominações por Putzke e Putzke (2004a) e por Ulloa e Hanlin (2000).

O píleo é caracterizado pela: 1) forma (convexo, aplanado, cônico, parabólico, campanulado, infundibuliforme ou umbonado; enquanto nos *aphyllophorales* de sésil anual, sésil perene, estipitado, efuso-reflexo ou ressupinado); 2) consistência (frágil, carnosos, gelatinoso e coriáceo; 3) superfície (lisa, estriada, escamosa, velutinafibrilosa ou viscosa; 4) margem (lisa, involuta, revolta, ondulada, estriada com ou sem véu remanescente) e 5) coloração. As lamelas quanto: 1) fixação ao estipe (livre, aderida (adnexa ou adnata), sinuada ou decorrente); e 2) coloração. O estipe quanto: 1) forma (cilíndrico, achatado, sinuoso, bulboso, afilado; 2) superfície (lisa, estriada, escamosa, velutina ou fibrilosa; 3) presença de anel; 4) presença de volva; 5) presença de rizomorfias; ou 6) presença de micélio na base (GUGLIOTTA; CAPELARI, 1999; PUTZKE; PUTZKE, 2004b).

A parte microscópica caracteriza os basídios, basidiósporos e cistídios. Os basídios quanto: 1) forma (clavado ou cilíndrico clavado); 2) espessura da parede; 3) número de esterígmias ou basidiósporos, e 4) tamanho. Os basidiósporos quanto: 1) forma (globoso, subgloboso, elíptico, cilíndrico, angular, alantóide, rombóide; 2) ornamentação (liso, punctuado, verrucoso, equinulado, reticulado, tuberculado, espinoso ou estriado); 3) coloração; 4) espessura da parede e 5) tamanho e 6) amiloidia (positiva, negativa ou dextrinóide). Os cistídios quanto: 1) localização (pleurocistídios, queilocistídios, pileocistídios ou caulocistídios); 2) forma (cilíndrico, ventricoso, clavado, ramificado, lecitiforme, filiforme, piriforme, lageniforme com incrustação); 3) coloração e 4) tamanho (GUGLIOTTA; CAPELARI, 1999; PUTZKE; PUTZKE, 2004b).

2.1.4.2 Identificação molecular

As técnicas de biologia molecular ocuparam rapidamente o interesse da grande maioria das ciências biológicas básicas e aplicadas, sendo que os próprios órgãos de fomento à pesquisa

científica, quase fizeram uma regra o seu uso. Apesar do modismo, vale ressaltar que em muitas áreas foi de grande importância a sua aplicação, porque vieram a suprir áreas que estavam com limitações tecnológicas que as impediam de se desenvolver adequadamente, podendo ser ressaltados nos estudos de sistemática, mapeamento, no estudo de dinâmica de populações e nas interações interespecíficas, como as relações microrganismo-hospedeiro.

Na filogenética, a caracterização molecular tem conduzido a uma revisão em todos os níveis taxonômicos dos fungos e dos seres vivos, visando construir uma árvore da vida que realmente expresse o ideal de Darwin, isto é, termos a verdadeira árvore genealógica de cada reino dos seres vivos (MONCALVO et al., 2002).

Um dos pontos mais limitantes na filogenia molecular de fungos é o baixo número de genes e sequências facilmente acessíveis para a sistemática. A maioria é baseada no DNA ribossomal (18S, ITS1-5.8-ITS2, e 25-28S), mudando para o uso de mais genes, como a tubulina, o fator de elongação α e as subunidades da RNA polimerase II (TUB, EF1 α , RPB1 e RPB2, respectivamente), para obter dados multilocus e análises mais confiáveis dos nós e das identificações (HIBBETT, 2006; JAMES et al., 2006). Entretanto isso está mudando principalmente pelo número crescente de genomas seqüenciados (ROKAS et al., 2003), ESTs e proteômicas disponíveis. A continua diminuição dos custos do seqüenciamento e novas estratégias de seqüenciamento, como o piroseqüenciamento, associado à evolução das técnicas de bioinformática para análise e manuseio de grandes quantidades de dados, estão levando a um crescimento exponencial da genômica dos fungos e da sua interação com a filogenética o surgimento da filogenômica (ROBBERTSE et al, 2006).

Atualmente, a utilização da PCR e de outras técnicas moleculares para caracterizar fungos é possível devido à presença de sequências específicas. As regiões que transcrevem os RNA ribossômicos (rDNA) são mais usados porque se encontram em seqüência, com grande número de repetições (*'tandem'*) e comportam-se como neutros, podendo-se estimar o tempo da divergência entre os táxons. No diagnóstico, vêm sendo utilizadas estas regiões do rDNA, pelo grande número de cópias e pelo grande número de espécies que possuem suas sequências em bancos de dados. A sistemática do DNA ribossomal tornou-se um padrão na taxonomia fúngica e a cada dia aumentam as seqüências, tornando-se mais robustas as análises ao nível de espécie, gêneros, famílias e em alguns casos até ordens. Entretanto, o rDNA nem sempre pode resolver relações filogenéticas de alguns grupos, principalmente para os níveis taxonômicos superiores

onde há necessidade de maior número de bases úteis para a construção das árvores filogenéticas, pelo qual o rDNA não é suficiente para dar apoio estatístico, tornando necessário o uso de sequências de vários genes para esse objetivo. Assim, incongruências podem ocorrer em todos os níveis taxonômicos quando é usado um único grupo de seqüências, pelo qual são sugeridos de 8 a 20 genes ou acima de 8000 nucleotídeos, para se obter todos os nós com bootstrap com um intervalo de confiança de 95%, para confirmar ou refutar uma hipótese filogenética (ROKAS et al., 2003). Entretanto para a identificação molecular, não é necessário tanto rigor e de forma geral a região ITS ou outras ribossomais vem se mostrando apropriadas para a diferenciação de espécies. Nos casos em que não têm sensibilidade suficiente há necessidade do uso de um ou mais grupos de seqüências auxiliares.

Na identificação molecular, os passos a serem seguidos são: 1) obtenção da sequência do organismo/população alvo, 2) seleção das sequências do táxon a serem usadas no estudo, 3) a escolha do grupo externo, 4) a qualidade do alinhamento, 5) a retirada de bases não informacionais, 6) a análise filogenética, 7) a geração da árvore filogenética e 8) a identificação em si (LI, 1997).

A biodiversidade de leveduras do filo Basidiomycotina é determinada adequadamente para a maioria das espécies pelo domínio D1/D2 da subunidade maior do rDNA, mas para algumas espécies necessita da região ITS para a sua diferenciação e concordância com características metabólicas, como ocorre para *Cryptococcus ater*, *C. magnus*, *Filobasidium elegans* e *F. floriforme* (Filobasidiales), os quais possuem seqüências idênticas para o domínio D1/D2 mas diferenciadas pela região ITS (FELL et al.; 2000).

O número de bases necessário para diferenciar uma espécie de um dado táxon depende da região utilizada, das informações disponíveis e experiência no grupo em estudo. Para leveduras do filo Basidiomycotina, diferenças na região D1/D2 superior a duas bases (0,3%) é suficiente para a distinção entre espécies, mas se as seqüências forem iguais não implica em ser a mesma espécie (FELL et al.; 2000). Entretanto, de forma geral é considerada a partir de um por cento de diferenças na região ribossomal, para ser uma espécie molecularmente diferente ou uma identidade inferior a 97% (BROCK; DÖRING; BIDARTONDO, 2008).

A região ribossomal vem sendo usada para a identificação e classificação dos fungos. Essas regiões são caracterizadas pela alternância de sequências transcritas (25-28S, 5,8S e 18S) e não transcritas (IGS, ITS1 e ITS2). A subunidade maior do ribossomo é composta pelo 28S (4718

bases), 5.8S (160 bases) e pelo 5S (com 120 bases e localizada fora da região dos outros rDNA) e da subunidade menor a 18S (1874 bases) . A ITS possui duas regiões denominadas de ITS-1, amplificadas pelos oligonucleotídeos universais ITS1 e ITS2, que se encontram entre o 18S e o 5.8S; já a ITS-2, que encontra-se entre o 5.8S e o 25-28S, é amplificada pelo ITS3 e ITS4. O fragmento total do ITS é obtido pelo uso do ITS1 e ITS4, amplificando juntamente toda a região 5.8S. As regiões ITS1 e ITS2 são variáveis no tamanho e composição de bases entre os diferentes táxons. As características que marcam esta região como convenientes para a identificação molecular são: 1) fragmento entre 600 a 800 pares de bases; 2) amplificada com *primers* universais, 2) múltiplas cópias e 3) variabilidade suficiente para a distinção entre espécies que possuem diferenças morfológicas (GARDENS; BRUNS,1993).

2.1.5 Composição de basidiomicetos

Cogumelos podem ser saprófitas, simbiontes ou parasitas de plantas. Todos eles precisam de material orgânico para crescer (heterotróficos), mas os saprófitas são usados para fins comerciais de cultivo. Esses cogumelos secretam enzimas que digerem ao seu redor gêneros alimentícios e assim obter seus nutrientes da matéria orgânica. Os compostos para fins comerciais usam mistura de palha ou feno, espigas de milho, sementes de algodão e suplementos de nitrogênio, os quais podem influenciar na composição química e consequentemente no valor nutricional dos cogumelos cultivados. A qualidade dos cogumelos é influenciada por outros fatores como o estágio de desenvolvimento e as condições de pré ou pós-colheita, sendo a composição da matéria seca de aproximadamente 39.9% de carboidratos, 17.5% proteínas e de 2.9% de lipídeos (LATIFF; DARAN; MOHAMEDB, 1996).

A umidade dos cogumelos em geral é em torno de 90% (KALAC; SVOBODA, 2000), variando de 85-95% (LATIFF et al., 1996). Em *Pleoroutus ostreatus* (90,7%), *P. eryngii* (90,4%), *P. pulmonarius* (87,7%) e *Lentinula edodes* (90,0%) tendo um desvio padrão de até 3,5% (MANZI, et al. 1999).

A simples composição dos fungos não é indicação de que um elemento é essencial, porque as hifas absorvem do meio sem muita discriminação tanto os elementos essenciais, como os que podem ser tóxicos, assim todos os elementos essenciais são encontrados dentro dos fungos, mas nem todos os elementos encontrados neles são essenciais. Entretanto, há diferenças entre a

composição do substrato do crescimento do basidiomiceto, no micélio vegetativo e nos corpos de frutificação, e mesmo entre as diferentes partes dos cogumelos, isto é, entre o estipe e o píleo (LATIFF; DARAN; MOHAMEDB, 1996). A essencialidade do elemento pode ser pelo critério direto ou pelo indireto. O critério direto é quando o elemento participa de algum composto ou de alguma reação, sem a qual os fungos não sobrevivem. Enquanto o indireto é quando na ausência do elemento o fungo não completa o seu ciclo de vida, sendo o elemento não substituível por outro e possui efeito direto na vida do fungo (GRIFFING, 1994).

O estudo da composição dos cogumelos teve início na década de 70 com dois objetivos principais: 1) a seleção de corpos de frutificação como bioindicadores da poluição ambiental e 2) o levantamento do acúmulo de elementos em espécies comestíveis; sendo observado que as concentrações dos elementos nos corpos de frutificação são geralmente espécie-dependentes (KALAC; SVOBODA, 2000).

2.1.5.1 Macronutrientes

Os macronutrientes considerados para os fungos são o carbono, o enxofre, o fósforo, o magnésio, o nitrogênio e o potássio (GRIFFING, 1994). Eles são considerados essenciais para o crescimento dos fungos e requeridos em maiores quantidades do que os outros elementos. As suas concentrações na matéria seca correspondem a variações de 1,0 a 100 g/kg, ou 0,1 a 10% ou 10^{-3} a 10^{-4} M (GRIFFING, 1994), sendo encontrados normalmente seguindo a sequência de $N > K > P > S > Ca > Mg > Na$. Os macronutrientes C, N, P e S são fáceis de confirmar por serem componentes estruturais das células fúngicas ou das hifas, enquanto o magnésio e o potássio não têm essa característica, mas são importantes na ativação de enzimas, formação de um ambiente iônico e no potencial osmótico interno, principalmente o potássio (JENNINGS; LYSEK, 1996).

O sódio também é encontrado em quantidades semelhantes, mas não é considerado essencial, com exceção para o fungo marinho *Thraustochytrium roseum*, que é requerido para o transporte de fosfato (BELSKY; GOLDSTEIN; MENNA, 1970) e substituí parcialmente o potássio em algumas funções (GRIFFING, 1994).

O cálcio é considerado importante na sinalização celular, na esporulação, na morfogênese, na formação de corpos de frutificação e na ramificação das hifas (JENNINGS; LYSEK, 1996), entretanto pode ser considerado não universalmente requerido e devido às baixas concentrações

requeridas para sua essencialidade, considerado como um micronutriente (GRIFFING, 1994), apesar das quantidades encontradas nos corpos de frutificação. Por isso há vários meios de cultura para fungos que não são suplementados com cálcio, como o meio Czapek (GAMS et al., 1987).

Existe uma tendência de maior acúmulo de macronutrientes no píleo do que no estipe, sendo significativo para o N, K e Mg, sendo o cálcio acumulado preferencialmente no estipe do que no píleo (RUDAWSKA; LESKI, 2005). Os macronutrientes são acumulados em maiores concentrações nos cogumelos do que no substrato, onde eles cresceram. Isto implica que os fungos devem possuir mecanismos especializados de absorção e acúmulo de nutrientes em seus corpos de frutificação. Os corpos de frutificação devem ser especialmente efetivos nos mecanismos de acúmulo e translocação de nitrogênio, potássio (RUDAWSKA; LESKI, 2005) e sódio, visto o baixo conteúdo desses elementos nos solos/substratos.

2.1.5.2 Micronutrientes

Os micronutrientes são o cálcio, o cobre, o ferro, o manganês, molibdênio e o zinco (GRIFFING, 1994). As concentrações na matéria seca destes elementos correspondem a variações de 0,1 a 10.000 mg/kg ou 10^{-6} a 10^{-9} M (GRIFFING, 1994). Os microelementos são necessários em baixas concentrações para o crescimento dos fungos, mas geralmente são tóxicos em altas concentrações. A confirmação de outros elementos como essenciais é difícil pelas mínimas quantidades requeridas e os meios de cultura quanto a sua isenção. Os microelementos são ativadores de enzimas, sendo incluídos como essenciais ainda o escândio, o gálio e o vanádio (GRIFFING, 1994). O cobalto não vem sendo comprovado a sua essencialidade, mas como alguns fungos sintetizam a vitamina B₁₂, sendo o Co imprescindível à sua síntese, assim sendo essencial indiretamente (GRIFFING, 1994).

Os níveis de cobre em cogumelos são maiores do que das plantas, enquanto para outros metais as concentrações são semelhantes. As concentrações de cobre nas espécies acumuladoras não são consideradas de risco para a saúde, apesar de ser um metal pesado. Um peptídeo ácido foi identificado em *Grifola frondosa*, o qual aumenta a absorção do cobre solúvel pelo intestino (KALAC; SVOBODA, 2000).

2.1.5.3 Metais pesados

O estudo da composição dos cogumelos detectou que muitas espécies de ocorrência natural acumulam altas concentrações de alguns elementos químicos especialmente de cádmio, mercúrio e chumbo, quando comparados com outros alimentos (KALAC; SVOBODA, 2000). Do ponto de vista de indicadores biológicos, algumas espécies principalmente dos gêneros *Agaricus*, *Macrolepiota*, *Lepista* e *Calocybe* acumulam altos níveis de cádmio e mercúrio mesmo em áreas despoluídas ou medianamente poluídas. Entretanto, em áreas altamente poluídas como áreas de mineração, esses elementos aumentam consideravelmente, juntamente com o chumbo (KALAC; SVOBODA, 2000).

Apesar da composição do substrato ser um fator importante, grandes diferenças podem ser observadas na absorção de metais, que diferem do substrato de crescimento (KALAC; SVOBODA, 2000). Desta forma, o cádmio, o mercúrio e o cobre são acumulados nos corpos de frutificação; os níveis de zinco e manganês são comparáveis ao do substrato, enquanto que chumbo e ferro são menores nos corpos de frutificação do que no substrato (KALAC; SVOBODA, 2000). Assim, os fatores de bioconcentração são de 50-300 e de 30-500 para o cádmio e para o mercúrio, respectivamente, enquanto que são somente de 10^{-1} - 10^{-2} para o chumbo (KALAC; SVOBODA, 2000).

A idade dos corpos de frutificação ou seu tamanho são de menor importância, entretanto alguns autores reportam altas concentrações em corpos de frutificação novos. Isto pode ser explicado pelo transporte dos metais do micélio aos corpos de frutificação durante o início da frutificação, seguido de um incremento em massa e uma diminuição da concentração dos metais. A importância das deposições atmosféricas também devem ser de menor importância devido ao curto tempo de vida dos corpos de frutificação, o qual é normalmente de 10 a 14 dias (KALAC; SVOBODA, 2000).

Os níveis de metais nos corpos de frutificação de cogumelos de crescimento natural são considerados afetados pela idade do micélio e pelo intervalo entre as frutificações. As maiores concentrações são observadas no início da colheita de cogumelos cultivados (*Agaricus bisporus*). Entretanto os níveis de metais em *A. bisporus* selvagens são consideravelmente maiores do que os cultivados. Isto podendo ser explicado pelas diferenças de composição dos substratos, contaminações e pela idade do micélio (KALAC; SVOBODA, 2000).

A maioria dos elementos é distribuída desigualmente dentro dos corpos de frutificação. Os maiores níveis são observados nas lamelas, diminuindo no resto do píleo e as menores no estipe. O conhecimento dos mecanismos de transporte dos metais do micélio aos corpos de frutificação é bem limitado ao transporte do mercúrio associado a uma proteína transportadora contendo um grupo sulfidril, enquanto o transporte do cádmio deve ter outro mecanismo (KALAC; SVOBODA, 2000).

A maioria das conclusões do uso dos cogumelos como bioindicadores é que nenhuma espécie pode ser usada como um indicador preciso da poluição ambiental com metais pesados, mas os corpos de frutificação poderiam ser usados para distinguir entre áreas poluídas e não poluídas (KALAC; SVOBODA, 2000).

Alguns países vêm estabelecendo níveis para metais pesados em cogumelos comestíveis. Na República Tcheca, os limites de 5,0; 2,0 e 100 mg.kg⁻¹ de matéria seca são para o mercúrio, cádmio e chumbo, respectivamente para cogumelos silvestres, enquanto que 1,0; 1,0 e 10,0 mg.kg⁻¹ de matéria seca para os cultivados (KALAC; SVOBODA, 2000).

Nos cogumelos comestíveis são quase ausentes os trabalhos sobre as mudanças nas concentrações dos elementos traços durante os processos de preservação tais como secamento, congelamento ou esterilização, e com os diferentes tratamentos culinários. A lavagem e descascamento de *A. bisporus* diminuem as concentrações de cádmio, chumbo, cobre e zinco por 30-40%. Durante o alveijamento de *A. bisporus* a 95-100°C por 15 min, perdas de 45, 36, 23 e 4% foram observadas para o manganês, ferro, zinco e cobre, respectivamente (KALAC; SVOBODA, 2000).

2.1.6 Fisiologia de fungos

O entendimento do funcionamento dos fungos e de sua associação com o meio ambiente é de extrema importância para podermos ter uma previsão do comportamento dos macrofungos nos seus diferentes habitats. Os estudos *in vitro* servem para poder entender parte deste funcionamento, podendo estudar um a um cada situação e resposta dos organismos em estudo; mas não para uma extrapolação direta das inúmeras variáveis existente na natureza. Os meios definidos permitem estudar vias bioquímicas e permitem a reprodutibilidade, definindo a necessidade de elementos, condições físicas e químicas, e compostos orgânicos requeridos para o

desenvolvimento dos fungos (PATERSON; BRIDGE, 1994). As condições que influenciam as condições de crescimento são: a temperatura, pH, as fontes de carbono e nitrogênio, a luminosidade e as vitaminas.

Os fungos mostram grandes diferenças de comportamento nas variações de temperatura, não só influenciando o crescimento micelial ou vegetativo como também a produção de esporos e corpos de frutificação. Havendo correlação entre temperatura de crescimento em cultura pura, sua distribuição geográfica e época de ocorrência. Essa correlação sendo mais evidente em fungos que produzem murchas, como *Fusarium oxysporium* e *Verticillium alboatrum*. A maioria dos fungos possui em geral o ótimo entre 20-30°C. Em temperaturas desfavoráveis os fungos e suas estruturas podem estar em condições latentes, germinando ou voltando a crescer quando as condições forem favoráveis. Os fungos associados a plantas geralmente possuem como temperatura máxima entre 35 e 37°C, enquanto que a inferior é normalmente inferior a 10°C (SILVEIRA, 1995).

Os fungos são sensíveis à acidez ou alcalinidade do meio onde crescem, mas a maioria possui uma larga faixa de pH para seu crescimento. O suprimento de água é essencial para o crescimento dos fungos e pouquíssimos fungos podem se desenvolver em baixas umidades. Os bolores são fungos de ambientes úmidos e a água livre é de suma importância para os formadores de zoósporos como *Phytophthora parasitica*, que afeta constantemente os viveiros cítricos (SILVEIRA, 1995).

A capacidade de assimilação de fontes de carbono depende de produzir enzimas extracelulares que permitam a absorção e utilização delas no crescimento dos fungos. O uso de meios definidos com a alteração da fonte de carbono ou nitrogênio permite a avaliação do uso. As fontes avaliadas geralmente são adicionadas a 1% (p/v). O crescimento pode ainda ocorrer devido a impurezas ou decomposição pelos processos de esterilização, pelo qual há necessidade de controles negativos e positivos. Em condições desfavoráveis o micélio pode ter um hábito de crescimento de “fome”, isto é, um crescimento das hifas pouco densas, mas com taxas de crescimento similares a de fontes assimiláveis, medida para poder encontrar novos locais de nutrição devido à heterogeneidade dos substratos naturais (JENNINGS; LYSEK, 1996). Os açúcares mais simples são mais fáceis de assimilação, enquanto os polissacarídeos e compostos fenólicos são mais restritos. A via preferencial de nitrogênio é a de fontes amoniacais, entretanto,

alguns utilizam nitratos e nitritos. Os nitritos quando em concentrações mais altas pode ser tóxico a muitos fungos.

A luminosidade não tem um efeito generalizado entre os fungos, mas ela influi diretamente sobre o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo; na fase vegetativa preferem a obscuridade ou a luz difusa para ocorrer um bom desenvolvimento do micélio, enquanto que na reprodutiva, procuram a luz para formar os corpos de frutificação (SILVEIRA, 1995). As vitaminas são compostos orgânicos que são usados como coenzimas e são requeridos em quantidades mínimas. Os fungos para satisfazer as suas necessidades de uma determinada vitamina, a mesma deve ser disponibilizada a concentrações de μM ou nM , sendo a biotina e a tiamina as mais comuns deficiências observadas (GRIFFING, 1994).

2.1.7 Macrofungos e suas associações

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza e nos ambientes antrópicos, como eles não fixam CO_2 em compostos orgânicos, eles precisam que o meio que os rodeia forneça as substâncias necessárias para a sua alimentação, obrigando-os a viverem em estado de saprofitismo, parasitismo ou ainda em simbiose (SILVEIRA, 1995).

Denomina-se de simbiose a associação de dois ou mais organismos vivos que se beneficiam mutuamente. Os fungos realizam associações com algas (líquen), insetos e plantas (micorrizas). As formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* se alimentam do fungo que cultivam (*Leucocoprinus gongylophorus*) nos formigueiros, nas folhas cortadas por elas, o qual deva ocorrer a mais de 25 milhões de anos (CHAPELA, 1994), sendo esta alteração do modo de vida parece ter ocorrido num grupo restrito de formigas, já que a maioria das 10.000 espécies mantém os seus hábitos. Esta associação está longe de ser uma exploração; pelo contrário, ambos souberam tirar proveito, assim como proteger a sua participação (POULSEN; BOOMSMA, 2005). Na ausência de enzimas que possibilitam a degradação da matéria vegetal e de insetos mortos, estas formigas obtêm os nutrientes de que necessitam através do micélio do fungo. Em contrapartida, eles ganham um local no solo onde podem desenvolver-se, protegidos pelas formigas de predadores e parasitas, e conseguem obter mais material da área circundante do que se estivessem por sua conta, material esse que já vem preparado pelas enzimas produzidas pelas formigas. Os fungos utilizam esta biomassa preparada para crescerem e acumulam tantos

nutrientes que as extremidades das suas hifas incham com açúcares e proteínas, que depois os insetos podem alimentar-se. No preparo do substrato para as suas culturas, as formigas conseguem atenuar os efeitos dos fungicidas presentes nas plantas e desenvolveram a capacidade de escolher as folhas com menor conteúdo destes compostos. Esta aptidão é retribuída pelos fungos, já que eles conseguem degradar as substâncias inseticidas presentes no alimento trazido pelas formigas. A horta de fungos é, assim, uma forma eficiente de transformar material indigerível em alimento utilizável pela colônia de formigas. O fungo também evita a introdução de novas colônias pela reação de incompatibilidade (POULSEN; BOOMSMA, 2005). Ao analisar o DNA de mais de 500 fungos encontrados em formigueiros, descobriu-se que a maioria dos fungos pertence à família Lepiotaceae, os quais são especializados na decomposição de detritos vegetais. Entretanto, há diferenças entre as formigas consideradas “inferiores” e as ditas “superiores”. As inferiores constituem colônias relativamente pequenas e colhem uma grande variedade de alimentos que colocam à disposição dos seus fungos, incluindo alguns fora da família Lepiotaceae (VILLESEN et al., 2004). Contrariamente, as formigas “superiores” tendem a usar apenas material vegetal e as “cortadeiras” utilizam apenas material retirado de plantas vivas. Os seus formigueiros são estruturas elaboradas, com câmaras de diferentes tamanhos, com diferentes castas, especializadas em tarefas distintas. As formigas colhem e mastigam as folhas, para entregar em pequenos fragmentos, mastigados e com enzimas digestivas dos insetos formam uma pasta que é espalhada sobre o substrato dos fungos.

A partir do momento em que os fungos iniciaram a relação simbiótica deixaram de se reproduzir sexualmente e acabaram por depender das formigas para a sua dispersão. Reproduzem-se de forma vegetativa, através de rebentos, que não são mais do que “clones” do fungo original. As novas rainhas ao saírem para acasalar e formar novas colônias transportam os fungos nas suas peças bucais, garantindo à transmissão vertical (POULSEN; BOOMSMA, 2005). No entanto, investigações genéticas demonstraram que, apesar das formigas de uma mesma colônia só cultivarem um tipo de fungo, outras colônias da mesma espécie utilizam outros tipos de fungos, o que implica que, de vez em quando, as formigas saiam dos formigueiros para obter fungos livres na natureza, de forma a renovar os seus estoques e, provavelmente, obterem uma maior variedade alimentar.

A associação de raízes e fungos de forma benéfica é denominada de micorrizas, em que a planta se beneficia da maior capacidade de absorção de nutrientes do solo, principalmente de

baixa disponibilidade como o fósforo; enquanto os fungos se beneficiam pelos carboidratos que a planta fornece. Há dois tipos principais de micorrizas, as endomicorrizas e as ectomicorrizas. Nas endomicorrizas, os fungos colonizam as radículas sem levar a nenhuma modificação aparente. Enquanto nas ectomicorrizas, os fungos produzem uma camada de hifas (rede de Harting) que cobre as raízes e ocorrem modificações morfológicas como de cor das radículas, neste caso, além da absorção as plantas são beneficiadas pela camada de proteção. Entretanto, a visão moderna é quem regula a interação simbiótica é a planta (HARTMANN; SCHMID; TUINEN, 2009).

Os fungos saprofitos vivem sobre os detritos vegetais e substâncias orgânicas em decomposição, retirando deste meio seus nutrientes. Eles tomando parte da decomposição de celulose, hemicelulose, amido, assim como substâncias resistentes como gomas, parafinas, lignina ou compostos xenobióticos (SILVEIRA, 1995).

Os patógenos são aqueles fungos intimamente ligados a um outro ser vivo multicelular (hospedeiro) do qual absorvem as substâncias elaboradas por este, penetrando nos tecidos ou provocando a desagregação dos mesmos, assim, o fungo patogênico então se nutre à custa do hospedeiro. Os basidiomicetos patogênicos a citros e que produzem cogumelo não ocorrem no Brasil, sendo que *Armillaria mellea* (Vahl ex. Fr.) Kummer ocorre na Califórnia e na Austrália provocando a doença denominada de “podridão de raízes de *Armillaria*” ou “podridão de raízes do cogumelo”, enquanto que *Cleitocybe tabescens* (Scop. ex. Fr.) Bres. ocorre na Flórida (WHITESIDE; GARNSEY; TIMMER, 1988). Os basidiomicetos fitopatogênicos a citros que ocorrem no Brasil são *Erythricium salmonicolor* (Berk. & Br.) Burdsall, agente causal da rubelose, e as várias espécies de *Septobasidium* que provocam o feltro ou camurça (LARANJEIRA et al., 2005b). Havendo poucos trabalhos com estes fungos, como os realizados quanto à diversidade e compatibilidade vegetativa (SEBASTIANES et al., 2007). As espécies dos fungos que provocam a camurça estão muito associadas à coloração dos sinais sobre os tecidos, a variação de cor pode ser acinzentada (*S. cinereum*), cinza escuro [*S. saccardinum* (Rangel) Marchion], cinza com margem clara (*S. alveomarginatum*), chocolate (*S. fumigatum* Burt, *S. fuscum* Couch. e *S. lepidosaphis* Couch) e o mais comum, a cor parda (*S. pseudopedicellatum* Burt) (LARANJEIRA et al., 2005b).

2.1.8 Levantamentos de macrofungos

Os macrofungos ocorrem em uma grande variedade de habitats, desde as regiões árticas aos trópicos. Algumas espécies são encontradas em regiões bem restritas outras em áreas geograficamente bem distantes (REES; ZUCCARELLO; ORLOVICH, 2004). A maioria mostra preferência por certo tipo de habitat, mas mesmo dentro de um mesmo habitat, eles podem mostrar preferência a um determinado substrato. Alguns corpos de frutificação destes macrofungos são produzidos no solo (terrestres), em folhas mortas (folícolas), em madeira (lignícolas), em estrume (coprófilos) e em cogumelos (fungícolas), ou ainda podendo ter relações parasíticas ou micorrízicas (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

O levantamento de macrofungos em citros é de constatações esporádicas, principalmente a árvores ou partes mortas das plantas, sendo relatados como podridões da madeira os gêneros *Ganoderma*, *Polyporus* e *Poria* da ordem Polyporales, *Polystictus* (Hymenochaetales), *Schizophyllum* (Agaricales), *Stereum* (Russulales), *Hydnum* (Cantharellales), e *Daldinia* (Xylariales) (FAWCETT, 1936).

O levantamento de macrofungos vem sendo realizado em diferentes ambientes, principalmente em florestas, principalmente pelo seu tamanho que facilita a sua localização. A capacidade de decomposição de materiais lignocelulolíticos os macrofungos vêm aumentando sua importância, principalmente na degradação de lignina e xenobióticos. Entretanto, há uma falta deste tipo de levantamento nas condições de produção de substratos e mudas cítricas, que além de trazer informações sobre as relações entre eles e as mudas cítricas, poderão levar há novas aplicações biotecnológicas, como melhor conhecimento dos fungos existentes no Brasil.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Locais de coleta

As avaliações e coletas de macrofungos foram realizadas em viveiros comerciais de mudas cítricas nos municípios de Araras, Conchal, Cordeirópolis, Ipeúna, Itobi, Limeira, Mogi-Guaçu, e Rio Claro e de fábricas de substratos de casca de pinus em Paulínia e Holambra no Estado de São Paulo. A avaliação de mudas e porta-enxertos foi realizada tanto em estufas com produção em substrato a base de casca de pinus como de fibra de coco. Os microrganismos associados e potenciais agentes do controle biológico foram obtidos de viveiros comerciais de mudas cítricas, localizados no município de Araras.

2.2.2 Composição

Para a determinação da composição dos basidiomas foram coletados cogumelos associados à mudas cítricas em viveiro comercial no município de Araras-SP. As amostras consistiram em 1) mistura de cogumelos do processo de coleta do viveiro; 2) *Leucocoprinus birnbaumii* (amarelo tipo LB); 3) *L. birnbaumii* (amarelo tipo NTA) e 4) *L. brebissonii* (branco). As análises foram realizadas no Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, como análise de material orgânico seguindo os métodos analíticos oficiais (KIEHL, 1985 e MAPA, 2007), sendo determinandos pH, densidade, umidade, matéria orgânica total (%), carbono orgânico (%), relação C/N, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, manganês, zinco, ferro, boro e sódio.

2.2.3 Isolamento

Para o isolamento das colônias dicarióticas foram realizados os seguintes passos: 1) lavagem com água corrente do estipe do cogumelo; 2) desinfecção em álcool 96% por um minuto

em fluxo laminar; 3) retirada do micélio interno do estipe com auxílio de bisturi e pinça, 4) acondicionando pequenos fragmentos do micélio em meio cenoura-ágar (CA) (200g e 20g, respectivamente) com tetraciclina (50µg/mL). Para o isolamento das colônias monospóricas: 1) O píleo aberto de um cogumelo foi acondicionado em um frasco com 100mL de água, destilada e autoclavada previamente. Adicionado Tween 80 (0,1%) e tetraciclina (50µg/mL) para facilitar a dispersão dos esporos e evitar bactérias, agitado manualmente e deixado em repouso por uma hora para melhor liberação dos basidiósporos. Diluições em série foram realizadas para poder obter colônias independentes nas placas. Uma alíquota de 100µL da suspensão foi adicionada por placa de Petri contendo meio CA com tetraciclina (50µg/mL). As placas de Petri do isolamento foram incubadas na temperatura da sala.

2.2.4 Manutenção e conservação

A manutenção dos microrganismos foi realizada em meio CA. Os fungos obtidos das macroestruturas foram mantidos a 28°C em BOD e os do controle biológico a temperatura da sala. A conservação dos microrganismos foi realizada pelos métodos do óleo mineral e de Castellani. Os fungos foram crescidos em meio CA e das bordas das colônias foram retiradas pequenos fragmentos contendo micélio ativo. Estes fragmentos foram colocados em tubos Eppendorf de 1,5mL contendo água (Castellani) ou óleo mineral, autoclavados previamente. Os tubos Eppendorfs foram identificados e armazenados em refrigerador.

2.2.5 Caracterização morfológica

Os macrofungos foram caracterizados visualmente e as mensurações foram realizadas, quando possível no próprio viveiro. Os esporos e microestruturas foram caracterizados por microscópio ótico, estereoscópico e eletrônico de varredura. Determinaram-se as dimensões e características das estruturas observadas. As identificações foram realizadas comparando as dimensões e características avaliadas com literatura especializada (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; BASEIA; MILANEZ, 2001b; GLICK, 1991; GUZMÁN-DÁVALOS, et

al. 2003; PITT, 1985; PUTZKE; PUTZKE, 2004b; REES; MARCHANT; ZUCCARELLO, 2004; SILVEIRA, 1995; SINGER, 1986).

2.2.6 Microscopia eletrônica de varredura

Os materiais a serem observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram, esporos sobre folhas, lamelas dos cogumelos, parte dos corpos de frutificação e micélio de colônias crescidas em meio cenoura-água. Eles foram fixados em glutaraldeído (2%) em cacodilato de sódio 0.1M a 4 C, sendo lavados em cacodilato de sódio (0.1M). A desidratação foi realizada por uma série de lavagens em concentrações crescentes de etanol (35, 50, 60, 75, 85, 95 e 100% por 20, 20, 20, 20, 20, 30 e 30 minutos, respectivamente). Em seguida realizada a secagem ao ponto crítico com CO₂ líquido e metalizados com ouro coloidal, posteriormente observados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura (Zeiss, DSM 940A), operando entre 10 e 15kV, no NAP/MEPA, ESALQ/USP.

2.2.7 Extração de DNA

A extração de DNA de cada fungo foi realizada pela raspagem superficial do micélio de uma placa de Petri, macerado com nitrogênio líquido e adicionado 1500µL do tampão de extração (SDS 1%, EDTA 25mM, Tris-HCl pH8,0 200mM, NaCl 250mM) em cadinhos, transferidos para tubos de 2mL e incubados a 60°C por no mínimo de 30 minutos. Centrifugado a 8.000 g por 10 minutos. Adicionado 600µL do sobrenadante em dois Eppendorfs de 1,5mL. Acrescentado 600 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Centrifugado e coletado 500 µL do sobrenadante em outro Eppendorf contendo 500µL de isopropanol gelado. Centrifugado novamente, descartando o sobrenadante e lavado duas vezes com 1000µL de etanol 80%. Após seco ressuscitado em 50µL de água ultra pura autoclavada (MilliQ) por uma noite em geladeira e armazenado a -20°C até o seu uso (adaptado de PORTER; SKILLMAN; MONCALVO, 2008).

2.2.8 Amplificação por PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para amplificar a região ribossomal contendo o espaçador interno ITS1, o gene do rRNA 5.8S e o espaçador interno ITS2 (região ITS). Cada reação da PCR continha 5µL do tampão da reação, 3,0µL MgCl₂ (25mM), 5,0µL de dNTPs (2,5mM), 2 unidades de Taq DNA polimerase, 0,5 µL de 100mM de cada *primer*, 1µL de DNA molde e água ultra pura autoclavada em quantidade suficiente para 50µL. Controles negativos, sem DNA molde, foram incluídos para detectar contaminação dos reagentes. Os pares de *primers* da reação foram o ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (WHITE et al., 1990).

As amplificações foram realizadas no termociclador GeneAmp® PCR System 9700. As condições para a amplificação foram 94°C por 5 minutos e 35 ciclos a 94°C por 30s, 53°C por 30s e 72°C por 50s e uma extensão final de 72°C por 10 minutos e uma incubação final a 4°C. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1% e evidenciados com brometo de etídio. O produto de PCR foi purificado em um novo tubo Eppendorff com 1000 µL de álcool isopropílico e duas lavagens posteriores em álcool etílico 80% gelado a 8.000 g por 10 minutos cada centrifugação. Deixado secar e resuspendido em 20 uL de água ultra pura (MilliQ) (adaptado de SILVA et al., 2008).

2.2.9 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado bidirecionalmente usando os *primers* do PCR (ITS1 e ITS4) no Centro de Estudos do Genoma Humano, USP/São Paulo, no seqüenciador Megabace 1000 (GE Healthcare), utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare), com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase, sendo as sequências preliminares analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12 (GE Healthcare).

As sequências recebidas foram inicialmente avaliadas pelo Software Bioedit versão 7.0.8., sendo que a obtida do ITS4 era modificada para o seu complemento reverso. As sequências foram submetidas individualmente ao BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997) e descartadas quando não eram de macrofungos ou dos gêneros identificados morfológicamente. Das sequências dos

mesmos isolados foram obtidas as sequências consenso pelo alinhamento múltiplo pelo software Muscle (EDGAR, 2004) e pela visualização no Jalview (WHITESIDE et al., 2009). Os consensos foram conferidos com os eletroferogramas das sequências originais pelo Bioedit, alinhados novamente e realizado um consenso final para cada isolado fúngico. Quando a sobreposição foi muito pequena entre os consensos foram usadas sequências, do GenBank do gênero e espécies afins inicialmente pelo BLASTn, para alinhamento e visualização da sobreposição. Para a aceitação preliminar da identificação molecular da espécie fúngica era esperado uma similaridade da sequência superior a 97%, não ocorresse ambigüidade e não houvesse nenhuma das seguintes observações no título como “cf.”, “sp.”, “uncultured”, “unidentified”; senão eram considerados “insuficientemente identificados” (BROCK; DÖRING; BIDARTONDO, 2008). Se dois nomes fossem encontrados e eram sinônimos, foi usado o do Index fungorum como correto (www.indexfungorum.org).

2.2.10 Análises filogenéticas

Para a identificação molecular final foi realizada a análise filogenética. As escolhas dos grupos externos foram os mais próximos possíveis dos táxons em análise para obter o maior número de regiões sinapomórficas para maior inferência filogenética (FREEMAN; HERRON, 2007). As sequência inicialmente selecionadas na (Tabela 1) do GeneBank (NCBI, 2009) foram alinhadas na plataforma da European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk) pelo Muscle v3.7 (EDGAR, 2004), eliminadas as sequências mal alinhadas, curtas ou ruins visualizadas pelo JalView (CLAMP et al., 2004), antes da análise filogenética na plataforma (www.phylogeny.fr), a qual realiza as análises necessárias passo a passo. As sequências foram alinhadas novamente pelo Muscle, em formato fasta, e depuradas pelo Gblocks por parcimônia (CASTRESANA, 2000 e TALAVERA; CASTRESANA, 2007), retirando regiões não informativas, contendo gaps ou mal alinhadas. A árvore filogenética foi reconstruída pelo método da máxima verossimilhança pelo programa PhyML v.3, com o modelo de substituição HKY85 e estimado o parâmetro de distribuição gamma, as taxas de transição e transversão e a proporção de invariáveis (GUINDON; GASCUEL, 2003; ANISOMOVA; GASCUEL, 2006). A representação gráfica da árvore foi pelo TreeDyn v198.3 (CHEVENET et al., 2006).

Tabela 1 - Relação do número de acesso das sequências de fungos no GenBank, com a espécie e família e ordem a que pertencem

(continua)				
GenBank	Espécie	Família	Ordem	Filo*
EF989122	<i>Chondrogaster angustisporus</i>	Agaricomycetes incertae sedis	-----	B
AY839842	<i>Diehliomyces microsporus</i>	Ascomycota incertae sedis	-----	A
AY484673	<i>Agaricus abruptibulbus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY484675	<i>Agaricus albolutescens</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
EU567323	<i>Agaricus aristocratus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF161015	<i>Agaricus arvensis</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY484672	<i>Agaricus augustus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF432880	<i>Agaricus bernardii</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AJ884632	<i>Agaricus bernardiiformis</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF432882	<i>Agaricus bisporatus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
FJ755218	<i>Agaricus bisporus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF465402	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF465401	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>burnettii</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF465400	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>eurotetrasporus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
EU258675	<i>Agaricus bitorquis</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
EF471305	<i>Agaricus blazei</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ182531	<i>Agaricus boisseletii</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AJ884650	<i>Agaricus brasiliensis</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ185572	<i>Agaricus bresadolianus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF432891	<i>Agaricus bridghami</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ182509	<i>Agaricus californicus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ232644	<i>Agaricus campbellensis</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
FJ223223	<i>Agaricus campestris</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AJ884624	<i>Agaricus comtulus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ182532	<i>Agaricus cupreobrunneus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
EU363031	<i>Agaricus cupressicola</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
EU363036	<i>Agaricus devoniensis</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF482831	<i>Agaricus diminutivus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ182511	<i>Agaricus endoxanthus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY484682	<i>Agaricus excellens</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY484683	<i>Agaricus fissuratus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ182512	<i>Agaricus freirei</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY484684	<i>Agaricus fuscofibrillosus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY484677	<i>Agaricus fuscovelatus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AJ884636	<i>Agaricus gennadii</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
FJ222602	<i>Agaricus heterocystis</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ182515	<i>Agaricus hondensis</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ182519	<i>Agaricus iodosmus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY484699	<i>Agaricus langei</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY943975	<i>Agaricus laskibarii</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY484676	<i>Agaricus lilaceps</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY484686	<i>Agaricus macrocarpus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF432878	<i>Agaricus macrosporus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AJ884642	<i>Agaricus maskae</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ182520	<i>Agaricus menieri</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ185562	<i>Agaricus moelleri</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AJ884637	<i>Agaricus nevoi</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY484670	<i>Agaricus nivescens</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AJ884647	<i>Agaricus padanus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY899269	<i>Agaricus parvitigrinus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY943974	<i>Agaricus pattersonae</i>	Agaricaceae	Agaricales	B

Tabela 1 - Relação do número de acesso das sequências de fungos no GenBank, com a espécie e família e ordem a que pertencem

GenBank	Espécie	Família	Ordem	(continuação)
				Filo*
AJ884639	<i>Agaricus pequinii</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ185552	<i>Agaricus phaeolepidotus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF432879	<i>Agaricus placomyces</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
FJ596842	<i>Agaricus pocillator</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ182526	<i>Agaricus pseudopratisensis</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ182527	<i>Agaricus pseudopratisensis</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AJ884631	<i>Agaricus rollanii</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
FJ478118	<i>Agaricus romagnesii</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ182528	<i>Agaricus rotalis</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY818649	<i>Agaricus rufotegulis</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AJ133390	<i>Agaricus semotus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ232647	<i>Agaricus subantarcticus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
EU257803	<i>Agaricus subfloccosus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF432889	<i>Agaricus subperonatus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY818660	<i>Agaricus subrufescens</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ232649	<i>Agaricus subrutilescens</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AJ133375	<i>Agaricus sylvaticus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY703913	<i>Agaricus tollocanensis</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
EU118125	<i>Agaricus trisulphuratus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF432902	<i>Agaricus vaporarius</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY899276	<i>Agaricus xanthodermulus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ182534	<i>Agaricus xanthodermus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF482857	<i>Allopsalliota geesterani</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY176343	<i>Chamaemyces fracidus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF097755	<i>Chlamydopus meyenianus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ200928	<i>Chlorophyllum agaricoides</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY24361	<i>Chlorophyllum alborubescens</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY081230	<i>Chlorophyllum brunneum</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY243619	<i>Chlorophyllum globosum</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY243613	<i>Chlorophyllum hortense</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY081243	<i>Chlorophyllum molybdites</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF482855	<i>Chlorophyllum nothorachodes</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY081242	<i>Chlorophyllum olivieri</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY081240	<i>Chlorophyllum rachodes</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ192177	<i>Cystoderma amianthinum</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AM946480	<i>Cystoderma amianthinum</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
U85333	<i>Cystolepiota cystidiosa</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF482834	<i>Endoptychum depressum</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY243645	<i>Lepiota decorata</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF482869	<i>Leucoagaricus purpureolilacinus</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY53411	<i>Leucocoprinus birnbaumii</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF482838	<i>Macrolepiota clelandii</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
U85311	<i>Macrolepiota colombiana</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF482839	<i>Macrolepiota dolichaula</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF482840	<i>Macrolepiota excoriata</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF482841	<i>Macrolepiota fuliginosa</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
U85314	<i>Macrolepiota gracilentia</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY243606	<i>Macrolepiota heimii</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY243603	<i>Macrolepiota konradii</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF482844	<i>Macrolepiota mastoidea</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF482845	<i>Macrolepiota neomastoidea</i>	Agaricaceae	Agaricales	B

Tabela 1 - Relação do número de acesso das sequências de fungos no GenBank, com a espécie e família e ordem a que pertencem.

(continuação)				
GenBank	Espécie	Família	Ordem	Filo*
AF482847	<i>Macrolepiota phaeodisca</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF482848	<i>Macrolepiota procera</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY243600	<i>Macrolepiota psammophila</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY243596	<i>Macrolepiota rhodosperma</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY243605	<i>Macrolepiota subsquarrosa</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF482853	<i>Macrolepiota velosa</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY176494	<i>Melanophyllum haematospermum</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
EF069420	<i>Micropsalliota alba</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AY176352	<i>Termiticola</i> sp.	Agaricaceae	Agaricales	B
DQ241779	<i>Verrucospora flavofusca</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AF482858	<i>Volvolepiota albida</i>	Agaricaceae	Agaricales	B
AB080790	<i>Amanita muscaria</i>	Amanitaceae	Agaricales	B
DQ184690	<i>Battarreia phalloides</i>	Battarreaceae	Agaricales	B
FJ810131	<i>Agrocybe pediades</i>	Bolbitiaceae	Agaricales	B
AY19453	<i>Galeropsis desertorum</i>	Bolbitiaceae	Agaricales	B
AY194555	<i>Gastrocybe lateritia</i>	Bolbitiaceae	Agaricales	B
AF325628	<i>Setchelliogaster australiensis</i>	Bolbitiaceae	Agaricales	B
AY277276	<i>Alnicola alnetorum</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY575919	<i>Anamika angustilamellata</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
FJ717605	<i>Cortinarius anomalus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
FJ717605	<i>Cortinarius anomalus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY669625	<i>Cuphocybe</i> sp.	Cortinariaceae	Agaricales	B
U56055	<i>Dermocybe phoenicea</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY281020	<i>Galerina autumnalis</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY281021	<i>Galerina clavata</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AJ585470	<i>Galerina hypnorum</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY228347	<i>Galerina marginata</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AJ585448	<i>Galerina paludosa</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AJ585487	<i>Galerina vittiformis</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY280977	<i>Gymnopilus aeruginosus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF501542	<i>Gymnopilus allantopus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF501563	<i>Gymnopilus anomalus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
EU518422	<i>Gymnopilus arenophilus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY280978	<i>Gymnopilus cerasinus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
EU401711	<i>Gymnopilus cyanopalmicola</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF325660	<i>Gymnopilus decipiens</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY280980	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
FJ800363	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY386830	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY386826	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY386825	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY386824	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF501546	<i>Gymnopilus eucalyptorum</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF501547	<i>Gymnopilus ferruginosus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
EU518420	<i>Gymnopilus flavus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY280982	<i>Gymnopilus fulvosquamulosus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY280983	<i>Gymnopilus hispidellus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY280985	<i>Gymnopilus hispidus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF501548	<i>Gymnopilus hybridus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY280986	<i>Gymnopilus imperialis</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B

Tabela 1 - Relação do número de acesso das sequências de fungos no GenBank, com a espécie e família e ordem a que pertencem

(continuação)				
GenBank	Espécie	Família	Ordem	Filo*
AY280987	<i>Gymnopilus junonius</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY280988	<i>Gymnopilus junonius</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY280991	<i>Gymnopilus lepidotus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY280989	<i>Gymnopilus lepidotus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY280990	<i>Gymnopilus lepidotus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF325668	<i>Gymnopilus luteofolius</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
EU518419	<i>Gymnopilus maritimus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY280994	<i>Gymnopilus medius</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF501551	<i>Gymnopilus moabus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY280995	<i>Gymnopilus nevadensis</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF501553	<i>Gymnopilus norfolkensis</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
EU401709	<i>Gymnopilus ochraceus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF325659	<i>Gymnopilus odini</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY280997	<i>Gymnopilus pampeanus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY281000	<i>Gymnopilus penetrans</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY281003	<i>Gymnopilus picreus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
EU834214	<i>Gymnopilus punctifolius</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
EU401714	<i>Gymnopilus purpureosquamulosus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY281024	<i>Gymnopilus pyrrhum</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY281004	<i>Gymnopilus robustus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY281007	<i>Gymnopilus sapineus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY281009	<i>Gymnopilus spectabilis</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY281010	<i>Gymnopilus spectabilis</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY281013	<i>Gymnopilus subearlei</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
DQ311084	<i>Gymnopilus subearlei</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY281015	<i>Gymnopilus suberis</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY281016	<i>Gymnopilus subpurpuratus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF325669	<i>Gymnopilus turficola</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF501562	<i>Gymnopilus tyallus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY281017	<i>Gymnopilus underwoodii</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY281018	<i>Gymnopilus validipes</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
FJ845403	<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY320399	<i>Hebelomina neerlandica</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AM882893	<i>Inocybe flocculosa</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
EU523592	<i>Mallocybe unicolor</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY963567	<i>Mycocybe siccigleba</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF325629	<i>Naucoria scolecina</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY571054	<i>Pellidiscus pallidus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
GQ165691	<i>Phaeocollybia pleurocystidia</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AY571056	<i>Phaeosolenia densa</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
EU084975	<i>Protoglossum aromaticum</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF325566	<i>Quadrispora oblongispora</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
AF325599	<i>Thaxterogaster albocanus</i>	Cortinariaceae	Agaricales	B
FJ596823	<i>Crepidotus crocophyllus</i>	Crepidotaceae	Agaricales	B
FJ770408	<i>Clitopilus prunulus</i>	Entolomataceae	Agaricales	B
EU489636	<i>Favolaschia calocera</i>	Favolaschiaceae	Agaricales	B
DQ020592	<i>Hydnangium</i> sp.	Hydnangiaceae	Agaricales	B
FJ627027	<i>Hygrocybe laeta</i>	Hygrophoraceae	Agaricales	B
EU697269	<i>Destuntzia fusca</i>	Hymenogastraceae	Agaricales	B
AF325632	<i>Hymenogaster alnicola</i>	Hymenogastraceae	Agaricales	B

Tabela 1 - Relação do número de acesso das sequências de fungos no GenBank, com a espécie e família e ordem a que pertencem

GenBank	Espécie	Família	(continuação)	
			Ordem	Filo*
EU784363	<i>Hymenogaster tener</i>	Hymenogastraceae	Agaricales	B
EU833649	<i>Arachnion album</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
DQ112610	<i>Bovista cretacea</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
DQ112613	<i>Bovista plumbea</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
FJ441028	<i>Bovistella radicata</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
AJ486873	<i>Calvatia cyathiformis</i> var. <i>cyathiformis</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
AJ486961	<i>Calvatia fragilis</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
AJ617492	<i>Calvatia gigantea</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
DQ112627	<i>Disciseda bovista</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
DQ112590	<i>Handkea excipuliformis</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
EU833660	<i>Holocotylon brandegeeanum</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
DQ112623	<i>Langermannia gigantea</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
EU833661	<i>Lycoperdon marginatum</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
AJ237627	<i>Lycoperdon perlatum</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
AJ237618	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
DQ112591	<i>Lycoperdon umbrinum</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
AF485065	<i>Morganella fuliginea</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
EU833667	<i>Vascellum intermedium</i>	Lycoperdaceae	Agaricales	B
AY445121	<i>Campanella subdendrophora</i>	Marasmiaceae	Agaricales	B
EU833666	<i>Mycenastrum corium</i>	Mycenastraceae	Agaricales	B
AY571053	<i>Nia vibrissa</i>	Niaceae	Agaricales	B
EU784188	<i>Crucibulum laeve</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463357	<i>Crucibulum laeve</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463340	<i>Cyathus africanus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463347	<i>Cyathus africanus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463342	<i>Cyathus africanus</i> var. <i>latisporus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463351	<i>Cyathus annulatus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463355	<i>Cyathus berkeleyanus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463344	<i>Cyathus colensoi</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463350	<i>Cyathus crassimurus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463346	<i>Cyathus hookeri</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463341	<i>Cyathus jiayuguanensis</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463345	<i>Cyathus olla</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463343	<i>Cyathus olla</i> f. <i>brodiensis</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463356	<i>Cyathus pallidus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463348	<i>Cyathus pygmaeus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463352	<i>Cyathus renweii</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463349	<i>Cyathus setosus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463354	<i>Cyathus stercoreus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
EU784193	<i>Cyathus stercoreus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
EU784192	<i>Cyathus stercoreus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
FJ478125	<i>Cyathus stercoreus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
EU784195	<i>Cyathus striatus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
EU784194	<i>Cyathus striatus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ486697	<i>Cyathus striatus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
EF613553	<i>Cyathus subglobisporus</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ911596	<i>Mycocalia denudata</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
DQ463358	<i>Nidula niveotomentosa</i>	Nidulariaceae	Agaricales	B
FJ481045	<i>Omphalotus japonicus</i>	Omphalotaceae	Agaricales	B
GQ249887	<i>Phellorinia herculea</i>	Phelloriniaceae	Agaricales	B

Tabela 1 - Relação do número de acesso das sequências de fungos no GenBank, com a espécie e família e ordem a que pertencem

(continuação)				
GenBank	Espécie	Família	Ordem	Filo*
FJ501564	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pleurotaceae	Agaricales	B
FJ816660	<i>Pluteus xylophilus</i>	Pluteaceae	Agaricales	B
DQ311082	<i>Podaxis pistillaris</i>	Podaxaceae	Agaricales	B
AY787669	<i>Coprinellus disseminatus</i>	Psathyrellaceae	Agaricales	B
FJ766486	<i>Grifola frondosa</i>	Schizophyllaceae	Agaricales	B
DQ494679	<i>Nivatogastrium nubigenum</i>	Strophariaceae	Agaricales	B
AJ519800	<i>Psilocybe semilanceata</i>	Strophariaceae	Agaricales	B
AY194533	<i>Weraroa cucullata</i>	Strophariaceae	Agaricales	B
FJ606883	<i>Armillaria mellea</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ444310	<i>Gymnopus acervatus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ480112	<i>Gymnopus alkalivirens</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AF505770	<i>Gymnopus alnicola</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ480101	<i>Gymnopus alpinus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY25669	<i>Gymnopus aquosus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263432	<i>Gymnopus aurantiipes</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263422	<i>Gymnopus austrosemihirtipes</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263423	<i>Gymnopus bicolor</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY256699	<i>Gymnopus biformis</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263434	<i>Gymnopus brunneigracilis</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AF505772	<i>Gymnopus collybioides</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY256697	<i>Gymnopus confluens</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ450057	<i>Gymnopus cylindricus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AF505766	<i>Gymnopus dichrous</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AF505787	<i>Gymnopus dryophilus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY256698	<i>Gymnopus dryophilus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ449987	<i>Gymnopus dysodes</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY256694	<i>Gymnopus earleae</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AF505783	<i>Gymnopus erythropus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ449973	<i>Gymnopus exculptus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY842953	<i>Gymnopus fibrosipes</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AF505777	<i>Gymnopus fusipes</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263435	<i>Gymnopus gibbosus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ449980	<i>Gymnopus hybridus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AF505779	<i>Gymnopus impudicus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263424	<i>Gymnopus indoctoides</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263439	<i>Gymnopus indoctus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ449985	<i>Gymnopus iocephalus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY256693	<i>Gymnopus junquilleus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ450001	<i>Gymnopus kauffmanii</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY256705	<i>Gymnopus lodgeae</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ480105	<i>Gymnopus luxurians</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ449978	<i>Gymnopus macropus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263442	<i>Gymnopus melanopus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263426	<i>Gymnopus menehune</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AF505768	<i>Gymnopus mesoamericanus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AF505769	<i>Gymnopus neotropicus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263445	<i>Gymnopus nonnullus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AF505781	<i>Gymnopus nubicola</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ449956	<i>Gymnopus ocior</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AF505761	<i>Gymnopus omphalodes</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B

Tabela 1 - Relação do número de acesso das sequências de fungos no GenBank, com a espécie e família e ordem a que pertencem.

(continuação)				
GenBank	Espécie	Família	Ordem	Filo*
AF505774	<i>Gymnopus parvulus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AF505760	<i>Gymnopus peronatus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ450028	<i>Gymnopus polygrammus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
FJ596895	<i>Gymnopus polyphyllus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AF505747	<i>Gymnopus pseudolodgeae</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AF505762	<i>Gymnopus pseudoomphalodes</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ450034	<i>Gymnopus readii</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263447	<i>Gymnopus salakensis</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263449	<i>Gymnopus sepiiconicus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263427	<i>Gymnopus spissus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ480093	<i>Gymnopus spongiosus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ450037	<i>Gymnopus subcylathiformis</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ450018	<i>Gymnopus subnudus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ450025	<i>Gymnopus subpruinosis</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ480103	<i>Gymnopus subsulphureus</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263450	<i>Gymnopus tamblinganensis</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263451	<i>Gymnopus termiticola</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263428	<i>Gymnopus trogioides</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
DQ450058	<i>Gymnopus villosipes</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AY263429	<i>Gymnopus vitellinipes</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
FJ596857	<i>Laccaria laccata</i>	Tricholomataceae	Agaricales	B
AB073504	<i>Termitomyces</i> sp.	Tricholomataceae	Agaricales	B
AJ629401	<i>Astraeus hygrometricus</i>	Astraeaceae	Boletales	B
AJ629403	<i>Astraeus hygrometricus</i>	Astraeaceae	Boletales	B
AJ629410	<i>Astraeus hygrometricus</i>	Astraeaceae	Boletales	B
EU834198	<i>Chamonixia caespitosa</i>	Boletaceae	Boletales	B
AY918953	<i>Octavianina</i> sp.	Boletaceae	Boletales	B
EU726299	<i>Octavianina</i> (Não cultivável)	Boletaceae	Boletales	B
DQ974748	<i>Octavianina</i> (Não cultivável)	Boletaceae	Boletales	B
EU834206	<i>Leucogaster citrinus</i>	Leucogastraceae	Boletales	B
AY907543	<i>Leucophleps magnata</i>	Leucogastraceae	Boletales	B
AJ555512	<i>Melanogaster ambiguus</i>	Melanogastraceae	Boletales	B
AM947076	<i>Pisolithus albus</i>	Pisolithaceae	Boletales	B
EU718114	<i>Pisolithus tinctorius</i>	Pisolithaceae	Boletales	B
AF374720	<i>Pisolithus tinctorius</i>	Pisolithaceae	Boletales	B
AY971828	<i>Rhizopogon brunsi</i>	Rhizopogonaceae	Boletales	B
EU379678	<i>Rhizopogon roseolus</i>	Rhizopogonaceae	Boletales	B
AF263931	<i>Rhizopogon vinicolor</i>	Rhizopogonaceae	Boletales	B
EU819438	<i>Scleroderma areolatum</i>	Sclerodermataceae	Boletales	B
GQ166907	<i>Scleroderma citrinum</i>	Sclerodermataceae	Boletales	B
FJ840450	<i>Scleroderma verrucosum</i>	Sclerodermataceae	Boletales	B
L54097	<i>Truncocolumella citrina</i>	Truncocolumellaceae	Boletales	B
AY997045	<i>Endogone lactiflua</i>	Endogonaceae	Endogonales	M
EU846311	<i>Elaphomyces decipiens</i>	Elaphomycetaceae	Eurotiales	A
EU784197	<i>Elaphomyces granulatus</i>	Elaphomycetaceae	Eurotiales	A
AB180362	<i>Exobasidium vaccinii</i>	Exobasidiaceae	Exobasidiales	B
EU784234	<i>Geastrum lageniforme</i>	Geastraceae	Geastrales	B
EU784238	<i>Geastrum minimum</i>	Geastraceae	Geastrales	B
EU784242	<i>Geastrum quadrifidum</i>	Geastraceae	Geastrales	B
FM865605	<i>Glomus intraradices</i>	Glomeraceae	Glomerales	G
AF377069	<i>Gautieria chilensis</i>	Gautieriaceae	Gomphales	B

Tabela 1 - Relação do número de acesso das sequências de fungos no GenBank, com a espécie e família e ordem a que pertencem

				(conclusão)
GenBank	Espécie	Família	Ordem	Filo*
EU784367	<i>Hysterangium thwaitesii</i>	Hysterangiaceae	Hysterangiales	B
GQ149464	<i>Hydnотrya bailii</i>	Discinaceae	Pezizales	A
GQ149459	<i>Hydnотrya tulasnei</i>	Discinaceae	Pezizales	A
EU669383	<i>Balsamia nigrens</i>	Helvellaceae	Pezizales	A
FJ868976	<i>Leucangium</i> sp.	Helvellaceae	Pezizales	A
EU834194	<i>Cazia flexiascus</i>	Pezizaceae	Pezizales	A
DQ974734	<i>Hydnoplicata</i> sp.	Pezizaceae	Pezizales	A
AY927853	<i>Hydnотryopsis gilkeyae</i>	Pezizaceae	Pezizales	A
AY927852	<i>Hydnотryopsis setchellii</i>	Pezizaceae	Pezizales	A
DQ200843	<i>Sarcosphaera coronária</i>	Pezizaceae	Pezizales	A
AF276672	<i>Terfezia boudieri</i>	Pezizaceae	Pezizales	A
AF276671	<i>Terfezia clavaryi</i>	Pezizaceae	Pezizales	A
DQ206839	<i>Genea arenaria</i>	Pyronemataceae	Pezizales	A
DQ218285	<i>Genea harknessii</i>	Pyronemataceae	Pezizales	A
FM206455	<i>Geopora arenicola</i>	Pyronemataceae	Pezizales	A
FM206443	<i>Geopora cervina</i>	Pyronemataceae	Pezizales	A
AF501258	<i>Choiromyces alveolatus</i>	Tuberaceae	Pezizales	A
EU784184	<i>Choiromyces meandriformis</i>	Tuberaceae	Pezizales	A
EU807975	<i>Tuber magnatum</i>	Tuberaceae	Pezizales	A
EU555392	<i>Tuber melanosporum</i>	Tuberaceae	Pezizales	A
AF324171	<i>Phallus impudicus</i> (invertida)	Phallaceae	Phallales	B
AF324170	<i>Phallus rugulosus</i> (invertida)	Phallaceae	Phallales	B
FJ801732	<i>Phytophthora infestans</i>	Pythiaceae	Peronosporales	H
FJ644288	<i>Bondarzewia berkeleyi</i>	Bondarzewiaceae	Russulales	B
FJ872064	<i>Heterobasidion annosum</i>	Bondarzewiaceae	Russulales	B
EU019947	<i>Cystangium seminudum</i>	Russulaceae	Russulales	B
AY239347	<i>Gymnomyces abietis</i>	Russulaceae	Russulales	B
EU019946	<i>Macowanites luteiroseus</i>	Russulaceae	Russulales	B
AF230894	<i>Martellia pila</i>	Russulaceae	Russulales	B
DQ453696	<i>Zelleromyces gardneri</i>	Russulaceae	Russulales	B
AY344997	<i>Ustilago avenae</i>	Ustilaginaceae	Ustilaginales	B

* A = Ascomycotina; B = Basidiomycotina; G = Glomeromycota; H = Heterokontophyta e M = Mucoromycotina.

2.2.11 Análises *in silico*

Realizado um alinhamento dos *primers* gênero específico para *Gymnopilus* (Guzmán-Dávalos et al., 2003), o ITS1G (5'-CGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3') e o ITS4G (5'-GATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3') com as sequências obtidas para este táxon e realizado uma análise *in silico* com o programa BLASTn contra o banco de dados do NCBI para a especificidade dos iniciadores.

Para determinar a relação entre as sequências selecionadas foi usado o Blast bl2seq (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) obtendo-se a identidade máxima, a cobertura e o e-value.

O desenho de *primers* das seqüências foi realizado usando o software Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) obtendo-se 60 combinações de *primers* para *Cyathus*. A especificidade dos *primers* foi analisada *in silico* no BLASTn e a qualidade dos *primers* avaliado no programa NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>).

2.2.14 Meios de cultura

Na seleção dos meios de cultura de composição complexa foram avaliados cenoura ágar (CA), batata dextrose ágar (BDA), malte ágar (MA), aveia-ágar (AA), o V8-CaCO₃ (V8) e o completo de Pontecorvo (MC) (Pontecorvo et al., 1953). Os meios de cultura de composição definida foram o Czapeck (CZ) e o mínimo (MM).

O meio Czapek (NaNO₃ 3,0; K₂HPO₄ 1,0; KCl 0,5; MgSO₄.7H₂O 0,5; FeSO₄.7H₂O 0,01; sacarose 30; ágar 20 g/L) foi usado para os estudos de fontes de carbono e de nitrogênio e o meio cenoura-ágar (CA) como meio básico para os outros experimentos.

2.2.15 Comparação de isolados monocarióticos e dicarióticos

Os isolados monocarióticos foram obtidos de um único cogumelo de um viveiro comercial de mudas cítricas no município de Araras. O SN04 (do estipe) era o dicariótico, enquanto que os SN04M1, SN04M2, SN04M3, SN04M4 e SN04M5 (diluições sucessivas da suspensão de esporos) os monocarióticos. Crescidos em meio CA e mantidos a 28°C. As mensurações foram efetuadas em duas épocas (aos 6 e 9 dias) da média de duas leituras ortogonais com delineamento fatorial inteiramente casualizados (2x6) com 4 repetições.

Para o estudo da distribuição do crescimento das colônias nas populações foram usadas 90, 126 e 115 e culturas monospóricas comparadas com as dicarióticas de *L. birnbaumii* tipo LB e NTA e *L. brebissonii*, respectivamente.

2.2.16 Influência do pH

O meio CA foi alterado o pH antes da autoclavagem com HCl ou KOH, para 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0. Discos contendo micélio das bordas das colônias do isolado Lb dil (L.

birnbaumi tipo LB) foram acondicionados no meio das placas de Petri contendo o tratamento. A medição diária do diâmetro médio das colônias foi obtida de duas leituras ortogonais. O delineamento foi fatorial inteiramente casualizados (9x14) com quatro repetições.

2.2.17 Fontes de Carbono

O meio Czapek foi utilizado como meio básico para o estudo de fontes de carbono, sendo avaliados as fontes em substituição à sacarose. Os tratamentos foram com e sem complementação de dextrose a 0,05%, sendo as fontes de carbono: amido, maltose, sacarose, galactose, dextrose, glicerol, lactose, oxalato de sódio, ácido succínico e acetato de sódio, tendo como controles o tratamento com sacarose e o de sem fonte de carbono. O diâmetro das colônias foi avaliado periodicamente para ser determinadas a fase lag e a taxa de crescimento. O delineamento foi fatorial inteiramente casualizados (12x2) com três repetições.

2.2.18 Fontes de nitrogênio

O meio Czapek foi utilizado como meio básico para o estudo de fontes de nitrogênio, sendo avaliadas as fontes em substituição ao nitrato de sódio. Os tratamentos foram: nitrato de cálcio, nitrato de potássio, nitrato de sódio, nitrito de sódio, fosfato de amônio, cloreto de amônio, glutamina, glutamato de sódio, uréia e glicina. Os tratamentos com nitrato de sódio e sem fonte de nitrogênio foram utilizados como controles. O diâmetro das colônias foi avaliado periodicamente para ser determinadas a fase lag e a taxa de crescimento sendo usados dois isolados diferentes de *L. birnbaumii* do tipo LB. O delineamento foi fatorial inteiramente casualizados (12x2) com três repetições.

2.2.19 Experimento de controle em viveiro comercial

A área dos experimentos de controle consistiu de bancadas selecionadas contendo mudas cítricas colonizadas naturalmente pelo cogumelo amarelo (*L. birnbaumii*) em viveiro comercial localizado no município de Araras, no Estado de São Paulo.

2.2.19.1 Efeito de diferentes doses de leite e vinagre

As mudas que apresentavam emergência de cogumelos, foram separadas e os primórdios e os corpos de frutificação um dia antes da realização do experimento, foram retirados. Os tratamentos foram 0; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10% tanto para o experimento de leite como do vinagre, sendo aplicado 300mL por parcela experimental, com 10 repetições em blocos casualizados. Foram avaliados os números de cogumelos e primórdios maiores que 0,5 cm que ocorriam na superfície do substrato e na parte inferior das mudas cítricas, sendo retirados, e avaliados aos 2, 4, 11, 19 e 22 dias.

2.2.19.2 Experimento de controle biológico

Os tratamentos foram realizados para cada muda receber 10g ou 10mL dos produtos comerciais de três formas de aplicação, com gel (1g/L), com espalhante (1mL/L) e somente em água. Os produtos foram 1) Biotrich Premium SC (*Trichoderma* sp.); 2) Trichodermil SC (*Trichoderma harzianum*); 3) Trichonat CE (*Trichoderma* sp.); 4) Bionema (composto orgânico); 5) Fermento Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*); 6) Trichonat PM (*Trichoderma* sp.); 7) Humidibiol (*Pseudomonas* sp.); 8) Trichobiol PM (*Trichoderma* sp.); 9) Biotrich PM (*Trichoderma* sp.) e 10) testemunha. O experimento foi em delineamento fatorial 10 X 3 em blocos ao acaso com quatro repetições, consistindo de 14 mudas por parcela experimental. O número de primórdios e de cogumelos maiores que 0,5 cm foram contados.

2.2.19.3 Experimento de controle químico

Os tratamentos foram realizados para cada muda receber 1g ou 1mL dos produtos comerciais de três formas de aplicação, com gel (1g/L), com espalhante (1mL/L) e somente em água. Os produtos foram 1) Tecsacolor (50 g/L de dióxido de cloro); 2) Sporekill (120 g/L de cloreto de didecil dimetil de amônio); 3) Opera (50 g/L de epoxiconazol e 133 g/L de piraclostrobina); 4) Score (250 g/L de difenoconazol); 5) Ridomil (40 g/L de metalaxil-M e 640 g/L de mancozeb); 6) Comet (250 g/L de piraclostrobina); 7) Rovral SC (500 g/L de Iprodiona); 8) Quatermon (125 g/L de cloreto de benzalcônio); 9) testemunha. O experimento foi em

delineamento fatorial 9 X 3 em blocos ao acaso com quatro repetições, consistindo de 14 mudas por parcela experimental. O número de primórdios e de cogumelos maiores que 0,5 cm foram contados.

2.2.19.4 Experimento de controle alternativo

Os tratamentos foram realizados para cada muda receber 3g ou 3mL dos produtos comerciais de três formas de aplicação, com gel (1g/L), com espalhante (1mL/L) e somente em água. Os produtos foram 1) Nitrato de amônio; 2) Nitrato de cálcio; 3) Nitrito de sódio; 4) Uréia; 5) Leite pasteurizado; 6) Vinagre; 7) Acetato de amônio; 8) Oxalato de sódio; 9) testemunha. O experimento foi em delineamento fatorial 9 X 3 em blocos ao acaso com quatro repetições, consistindo de 14 mudas por parcela experimental. O número de primórdios e de cogumelos maiores que 0,5 cm foram contados.

2.2.20 Produção de inóculo

Para a produção do inóculo foram avaliados grãos de feijão, milho pipoca, soja e trigo. Os frascos foram esterilizados com 100mL de grãos a 120°C por 20 minutos com e sem 50mL de água por frasco, e adicionados 10 discos de 0,6cm contendo micélio das bordas das colônias de *Leucocoprinus birnbaumii* em fluxo laminar, para cada frasco e mantidos a 28°C durante o experimento. Foi avaliada a facilidade de desagregação dos grãos para homogeneização, consistência do inóculo e avaliação visual do crescimento micelial.

2.2.21 Crescimento em substratos

Os inóculos foram produzidos em sementes de milho pipoca. Um volume de 100mL de sementes de milho pipoca foram acondicionados em frascos de vidro com 50mL de água destilada, tampados, e autoclavados a 120°C a 1 atm por 20 minutos. Foram adicionados 10 discos de meio contendo micélio ativo das bordas colônias de cada fungo e incubados a 28°C por 30 dias. A quantidade de inóculo para a colonização do substrato, variando de uma semente a 20mL de sementes para um total de 200mL de substrato a base de casca de pinus.

2.2.21.1 Escala de notas

Para poder avaliar os experimentos de produção de inóculo e de colonização de substrato foi elaborada e utilizada a seguinte escala para quantificação.

0	Nenhum crescimento visual
1	Crescimento tênue localizado
2	Crescimento tênue boa parte do substrato
3	Crescimento tênue em todo o substrato
4	Crescimento bem visual
5	Crescimento denso
6	Crescimento com primórdios localizados
7	Crescimento primórdios na superfície e parte das bordas
8	Crescimento com primórdios generalizado

2.2.21.2 Influência da fase de compostagem e do ressecamento

Foram inoculadas 13 diferentes fases de compostagem de substrato a base de casca de pínus com *Leucocoprinus birnbaumii* em milho pipoca.

A produção do inóculo foi realizada como no item 2.2.21, sendo adicionado 20mL de sementes de milho pipoca colonizadas por *L. birnbaumii* para um total de 200mL de substrato a base de casca de pínus e mantidos a 28°C. As avaliações foram aos 7, 11, 15, 25, 35 dias, com 10 repetições. Após 15 dias, retirado o filme plástico de metade dos frascos e uma semana depois avaliada a capacidade de impermeabilização pela adição de água até a borda dos frascos.

2.2.21.3 Interação nitrito e ureia

A produção do inóculo foi realizada como no item 2.2.21, sendo adicionado 10mL de sementes de milho pipoca colonizadas por *L. birnbaumii* para um total de 200mL de substrato a base de casca de pínus e mantidos a 28°C. As concentrações foram 0, 1, 2, 3, 4 e 5 g/L do nitrito de sódio e da uréia e das combinações entre elas, num total de 27 tratamento com 6 repetições. As avaliações da colonização do substrato foram realizadas aos 21 dias.

2.3 Resultados e discussão

A avaliação da cadeia produtiva de mudas cítricas quanto à ocorrência de macrofungos foi realizada desde a produção do substrato até o plantio nos pomares comerciais. As macroestruturas fúngicas foram observadas tanto nas fábricas de produção de substratos como nos viveiros comerciais de mudas cítricas, seja nas estufas de produção de porta-enxertos, borbulheiras e mudas cítricas. Nas fábricas de substrato foi observada uma maior diversidade de corpos de frutificação (Figura 1 J-Y), mas ocorrendo em menor frequência e densidade, enquanto nos viveiros foi observado o contrário, um menor número de corpos de frutificação diferentes, mas alguns deles com alta frequência e densidade de ocorrência. Após o plantio não foram constatadas visualmente a presença de macrofungos associados ao solo ao redor das mudas, somente o efeito sobre as plantas da colonização do substrato e a sua impermeabilização, pela presença prévia do cogumelo amarelo; mas o contrário não era recíproco, isto é, a presença de evidências do cogumelo amarelo nem sempre leva a restrição de desenvolvimento da planta cítrica após plantio.

2.3.1 Fábricas de substrato

Nas fábricas (Figura 1A-1D), os macrofungos são observados mesmo em toras de madeira (Figura 1I-M), cascas intactas (Figura 1O), no solo (Figura 1V-1Y), como em substratos prontos e velhos (Figura 1E e 1N-1Q). Frequentemente encontrados em restos de substratos ao redor das pilhas ou da fábrica (Figura 1R-1Y), sendo mais rara a presença dos corpos de frutificação nas pilhas de compostagem (Figura 1P). No substrato, algumas vezes foi observado a olho nu a colonização micelial (Figura 1G), principalmente quando associado ao cogumelo amarelo (Figura 1E-1I).

O sistema de produção do substrato à base de casca de pinus influi na detecção dos corpos de frutificação dos macrofungos, mas não implica que os fungos deste grupo não ocorram colonizando o substrato. Isto é, quanto maior a movimentação das pilhas de compostagem e limpeza da área de produção e aos redores, menor a frequência de visualização dos corpos de frutificação. A não ocorrência de formação de corpos de frutificação leva a uma colonização

limitada, mas não deixando de ser importante para o próximo componente do agronegócio, os viveiros cítricos.

Figura 1 - Aspecto geral de uma fábrica de substrato a base de casca de pinus e diversidade de macrofungos existentes no local. Aspecto geral da fábrica (A-D); Cogumelo amarelo (E-I); diversidade de basicarpes em madeira (J-M); no substrato (N-Q), restos de substrato (R-U) e no solo (V-Y)

Para a formação dos corpos de frutificação parece ser importante a não desestruturação do substrato, pelo revolvimento das pilhas ou similar. Isto explicaria porque da predominância nos restos ou acúmulos de substrato nas fábricas. Para os cogumelos (macrofungos predominantes) a manutenção da integridade da massa micelial é extremamente importante para poder translocar nutrientes e permitir o rápido crescimento destas estruturas.

Os fungos observados podem ser separados em função da relação trófica que possuem com o substrato presente nas fábricas de produção do composto. Eles podem ser lignícolas (em madeira ou restos dela, Figura 1I-1M), humícolas (no substrato, habitat rico em húmus ou da decomposição de restos vegetais, Figura 1N-1U) e nitrófilos (solo enriquecido com a lixiviação de nutrientes das pilhas, tornando um habitat rico em nitrogênio, Figura 1V-1Y). No geral, eles são humícolas, isto é, decompositores finos que utilizam a matéria orgânica residual da ação de organismos decompositores primários como bactérias e/ou outros fungos como fonte de energia. Como pode ser observado na Figura 1, a grande maioria dos macrofungos são basidiomicetos da ordem Agaricales, sendo que na madeira também ocorrem Polyporales (Figura 1J e 1K). O cogumelo amarelo foi observado em madeira e casca ainda não decomposta; no composto pronto e em restos ao redor da fábrica (Figura 1E-1I). O cogumelo branco foi observado em cascas no início da compostagem (Figura 1O). Estes dois cogumelos predominantes nos viveiros possuem hábitos lignícolas e humícolas.

2.3.2 Viveiros de mudas cítricas

Nos viveiros, os macrofungos podem ser encontrados nas áreas de armazenamento de substrato, ao redor das estufas e nos três ambientes de produção, isto é, nas estufas de porta-enxertos, de borbulheiras e de mudas cítricas. Nos substratos quando contaminados o mais frequente é observar o crescimento micelial e em alguns casos a formação de corpos de frutificação, principalmente quando armazenados por vários meses. Ao redor das estufas podem ser observados em locais onde há restos de substrato. Nas estufas de porta-enxertos, eles podem ser observados sob as bancadas que crescem no substrato que cai, nas bancadas de madeira são observados decompositores lignolíticos, enquanto que nos tubetes podem ser observadas pequenas estruturas e a massa micelial que coloniza o substrato. Nas borbulheiras e na produção de mudas é comum observar os primórdios e os basidiomas na superfície do substrato e nos furos

para drenagem dos sacos plásticos da muda, mesmo na parte inferior. Debaixo das bancadas também são observados os corpos de frutificação sob o substrato que cai e se mistura à camada de brita. A ocorrência dos cogumelos foi menor no inverno.

Quanto à frequência e densidade de ocorrência, as populações de macrofungos foram observadas em alguns casos com baixa frequência enquanto outras com alta frequência e em alguns casos também alta densidade. Estes últimos provocam preocupação pelos viveiristas, pelos quais estas espécies são descritas individualmente nas diferentes condições observadas, suas características macroscópicas, microscópicas, culturais e moleculares.

2.3.3 Cogumelo vermelho (*Gymnopilus dilepis*)

Este tipo de cogumelo está sendo observado em mudas cítricas com substrato a base de fibra de coco e denominado pelos produtores de cogumelo vermelho (Figura 2). Ele vem sendo observado em diferentes viveiros cítricos do Estado de São Paulo, ocorrendo o ano todo, mesmo no inverno. Como o cogumelo amarelo vem provocando perdas econômicas, este novo fungo associado à fibra de coco vem provocando preocupação no setor.

Este fungo desenvolve cogumelos sobre a superfície do substrato das mudas e pelos orifícios de drenagem das sacolas plásticas das mudas (Figuras 2A, 2B, 2D e 2E), isto é, em locais que há exposição à luz, sendo que rapidamente expõem as suas lamelas e liberam grande quantidade de esporos, deixando esporadas de coloração marrom avermelhada ou ferruginosa sobre o substrato, folhas ou outros basidiomas que estão abaixo das lamelas expostas (Figura 2F e G); o seu micélio pode ser visível por um micélio fino e branco, principalmente próximo dos primórdios ou corpos de frutificação onde há incidência de luz. A alteração na qualidade da fibra de coco é visual (Figura 2C) porque o micélio degrada o substrato, deixando as fibras com um aspecto de fios e de coloração mais clara. Esta modificação vem sendo o aspecto típico da colonização, não ocorrendo impermeabilização do substrato das mudas, mas diminuindo a capacidade de retenção de água, pelo consumo da parte responsável pela retenção de água. Este fungo consegue uma rápida colonização do substrato e normalmente nos primeiros focos com corpos de frutificação, o micélio já se espalhou nas mudas de forma agregada, isto é, quando se observa uma muda com o cogumelo vermelho encontramos mudas ao redor já com sintomas da colonização do substrato, com um raio de duas a três mudas, equivalendo de 30 a 60 cm de raio.

Figura 2 - Ocorrência de cogumelo vermelho (*Gymnopilus dilepis*) em viveiro comercial de mudas cítricas e microscopia da esporada sobre folha de laranja. A) Aspecto na superfície da muda dos cogumelos vermelhos; B e C) Aspecto no substrato na parte lateral da muda; D e E) emergência dos cogumelos pelos orifícios da sacola da muda; Aspecto dos esporos em microscopia eletrônica de varredura. F) Esporada com escala de 20 µm; Esporos G e H) com escala de 10 µm e I) de 2 µm

Este fungo possui um cogumelo típico possuindo píleo e estipe, os quais podem ser encontrados desde isolados, agrupados a cespitosos. Os píleos são de formato convexo, umbonado, aplanado, plano-convexo a plano-campanulado, medindo de 9 a 67 mm de diâmetro e

25 a 88 mm de altura. A cor varia em função do desenvolvimento do corpo de frutificação. Em píleos não expandidos a cor é homogênea e em expansão ocorre uma diluição das regiões pigmentadas, à semelhança do aspecto do mármore, variando da cor marrom avermelhado ao roxo com fundo branco a ligeiramente creme. As lamelas são amarelas e com o tempo vão tornando-se ferruginosas pelos esporos. Elas são decorrentes, isto é, se fundem com o estipe. O estipe não é reto e apresenta estrias.

Na microscopia ótica foram observados esporos ornamentados de cor marrom a ferruginoso. Na MEV, o comprimento dos basidiósporos variou de 6,2 a 7,4 μm com média de $6,64 \pm 0,32 \mu\text{m}$ (Figura 2H e 2I). A largura foi de 4,4 a 5,1 μm com média de $4,83 \pm 0,19 \mu\text{m}$. A ornamentação dos esporos foi bem observada pela MEV dando uma aparência semelhante aos cravos das chuteiras de futebol ao redor da superfície, com uma altura de 0,15 a 0,32 μm com média de $0,21 \pm 0,05 \mu\text{m}$ (Figura 2I).

Para o cumprimento dos postulados de Koch foi realizado o isolamento do fungo do estipe do cogumelo vermelho, apresentando colônias brancas de rápido crescimento em meio cenoura-ágar, sem formação de nenhuma estrutura visível; após 30 dias da inoculação em fibra de coco (isolado Roxo-MAP em milho pipoca) ocorreu a formação dos primórdios dos corpos de frutificação (Figura 3) e alteração do substrato, à semelhança nos viveiros. A colônia reisolada teve o mesmo aspecto da colônia original, assim conseguindo a associação do cogumelo vermelho aos sintomas observados no substrato à base de fibra de coco.

Figura 3 - Início de formação de basidiomas de *Gymnopilus dilepis*, com irrigação duas vezes à semana em casa-de-vegetação após 35 dias da inoculação, veiculado em milho pipoca em substrato a base de fibra de coco

Na identificação molecular, o sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do isolado dicariótico roxo-MAP do município de Araras obteve-se uma região consenso de 412 nt, de dois sequenciamentos bidirecionais. A sequência consenso ao ser comparada com as disponíveis por alinhamento simples no GenBank, com auxílio do BLASTn, teve similaridade com espécies do

gênero *Gymnopilus* e outras da mesma família Cortinariaceae, variando de 90% a 99% de identidade e E-value de 0 a 8×10^{-156} . As 93 sequências de espécies de *Gymnopilus* alinhadas pelo apresentaram identidade de: 99% (*G. cerasinus*; *G. dilepis*; *G. lepidotus*; *G. medius*; *G. norfolkensis*; *G. ochraceus*; *G. subearlei*); 98% (*G. luteofolius*); 97% (*G. aeruginosus*; *G. hispidellus*; *G. hispidus*; *G. mullaunius*; *G. purpuratus*; *G. purpureosquamulosus*; *G. suberis*; *G. subpurpuratus*); 96% (*G. cyanopalmicola*); entre 93 e 95% (*G. allantopus*; *G. anomalus*; *G. decipiens*; *G. eucalyptorum*; *G. fulvosquamulosus*; *G. hybridus*; *G. moabus*; *G. odini*; *G. penetrans*; *G. sapineus*; *G. turficola*; *G. tyallus*; *G. underwoodii*; *G. validipes*). 90 a 92% (*G. arenophilus*; *G. flavus*; *G. imperialis*; *G. junonius*; *G. pampeanus* e *G. spectabilis*). Entretanto houve similaridade com sequências de outros gêneros como *Hebelomina neerlandica* (AY320399 com 94%), *Galerina autumnalis* (AM901901 com 90 %) e *G. calyptrata* (AJ585465 e AJ585466, as duas com 90%) e três sem identificação (AM901901, AM905093, FM999638, com 93, 94 e 90%, respectivamente).

No caso do isolado monospórico obtido de um cogumelo vermelho do município de Cordeirópolis, foi obtida uma região consenso de 657 nt, de um sequenciamento bidirecional. O consenso teve similaridade com espécies do gênero *Gymnopilus*, pelo BLASTn, variando de 88% a 99% de identidade e um e-value de zero para todas as sequências. As 96 sequências de *Gymnopilus* tiveram identidade de: 99% (*G. dilepis*; *G. lepidotus*; *G. subearlei*); 98% (*G. cerasinus*; *G. medius*; *G. norfolkensis*; *G. ochraceus*); 97% (*G. purpuratus*); 96% (*G. aeruginosus*; *G. hispidellus*; *G. hispidus*; *G. purpureosquamulosus*; *G. suberis*; *G. subpurpuratus*) entre 92 e 95% (*G. allantopus*; *G. anomalus*; *G. cyanopalmicola*; *G. decipiens*; *G. eucalyptorum*; *G. fulvosquamulosus*; *G. hybridus*; *G. junonius*; *G. luteofolius*; *G. moabus*; *G. nevadensis*; *G. odini*; *G. penetrans*; *G. spectabilis*; *G. turficola*; *G. tyallus*; *G. underwoodii*; *G. validipes*); 88 a 91% (*G. arenophilus*; *G. crociphyllus*; *G. flavus*; *G. imperialis*; *G. pampeanus*; *G. robustus*; *G. sapineus*). Com relação a outros táxons, houve similaridade com as mesmas sequências do isolado de Araras para *Hebelomina neerlandica* (AY320399 com 91%) e duas sem identificação (AM901901 e AM905093; com 91 e 90% respectivamente), além de uma *Galerina* dita não cultivável (FJ152497 com 88%).

O gênero *Gymnopilus* possui poucos estudos sobre a região ITS (REES; ZUCCARELLO; ORLOVICH, 2002; GUZMÁN-DÁVALOS et al., 2003), inicialmente considerado molecularmente como monofilético quando usado como grupo externo *Galerina eucalyptorum* e

Pyrrhoglossum pyrrhum (REES; ZUCCARELLO; ORLOVICH, 2002), mas estes foram incluídos no próprio gênero como *G. anomalus* e *G. pyrrhum*, respectivamente. O uso de *Galerina autumnalis* também demonstrou um comportamento monofilético deste táxon, sendo considerada a mais próxima e adequada para os trabalhos de filogenia de *Gymnopilus* (GUZMÁN-DÁVALOS et al., 2003). Os estudos moleculares com 28 espécies levaram a cinco sub-clados ou grupos dentro do gênero *Gymnopilus* (Guzmán-Dávalos et al., 2003): 1) *spectabilis-imperialis*; 2) *nevadensis-penetrans*; 3) *underwoodii-validipes*; 4) *aeruginosus-luteofolius*; e 5) *lepidotus-subearlei*.

Para a análise filogenética escolheu-se sequências representantes dos gêneros presentes no GenBank da família Cortinariaceae, dos grupos moleculares de *Gymnopilus* e de *G. picreus* e *G. pyrrhum*, de espécies representantes dos grupos moleculares de *Galerina* (GULDEN et al., 2005) e a associada a mudas cítricas (Figura 4). Os grupos de *Galerina* foram: 1) *tubariopsis* (*G. clavata* AY281021 e *G. pseudocamerina* AJ585508); 2) *mycenopsis* (*G. calyptrata* AJ585466 e *G. hypnorum* AJ585470); 3) *galerina* (*G. atkinsoniana* AJ871572 e *G. vittiformis* AJ585487) e 4) *naucoripsis* (*G. marginata* AY228347 e *G. pseudomycenopsis* AJ585503). Da família Cortinariaceae, os gêneros *Aroramycetes*, *Auritella*, *Flammulaster*, *Leucocortinarius*, *Phaeosolenia* e *Stagnicola* não possuíam sequências da região ITS ou não possuíam qualidade ou comprimento de pelo menos 400 nucleotídeos pelo qual não foram incluídos.

O gênero *Mycolebis* (*M. siccigleba* AY963567) esteve agrupado no clado com *Gymnopilus* (não mostrado), mas com um ramo muito longo, tendo uma cobertura de apenas 30 a 40 % com as sequências da região ITS dos representantes dos gêneros da família Cortinariaceae, mas com uma identidade de 88 a 100% e um e-value de $1e^{-75}$ a $3e^{-85}$. Ao comparar a sequência com as do GenBank houve maior similaridade com os gêneros *Leucophleps* (ordem Boletales, com 100% de cobertura, $1e^{-172}$ e 87% de identidade), *Albatrellus* e *Polyporoletus* (ordem Russulales, com 99 e 98% de cobertura, $4e^{-135}$ e $9e^{-144}$, e 82 e 83% de identidade, respectivamente), e *Byssoporia* (ordem Atheliales, com 99% de cobertura, $6e^{-133}$ e 82% de identidade). Assim, ele foi retirado das subseqüentes análises, em concordância com a sua inclusão na família Albatrellaceae da ordem Russulales, junto com *Albatrellus*, *Leucogaster*, *Leucophleps* e *Polyporoletus* (ALBEE-SCOTT, 2007).

Na árvore filogenética foram observados vários clados (Figura 4) em concordância com os obtidos para a região ribossomal 26S por Moncalvo et al. (2002). O gênero *Pellidiscus* foi o

mais externo ao clado da família Cortinariaceae pela região ITS, seguido de *Inocybe* (clado inocybe) e subsequentemente sendo formados dois sub clados principais, que excluem estes dois gêneros. Um deles constituído pelos representantes dos gêneros *Alnicola*, *Anamika*, *Galerina*, *Gymnopilus*, *Hebeloma*, *Hebelomina*, *Naucoria* e *Phaeocollybia*; enquanto o outro (clado “cortinariod”) por *Cortinarius*, *Cuphocybe*, *Dermocybe*, *Gymnopilus pyrrhum*, *Mallocybe*, *Phaeosolenia*, *Protoglossum*, *Quadrispora* e *Thaxterogaster*.

G. pyrrhum está num grupo bem distante do clado “gymnopilus” no clado “Cortinariod”, com *Cortinarius*, *Cuphocybe*, *Dermocybe* e com os gasteromicetos *Protoglossum*, *Quadrispora* e *Thaxterogaster*; pelo qual seria mais adequado rever a não inclusão do gênero *Pyrrhoglossum* dentro do gênero *Gymnopilus*, já que *G. pyrrhum* era *P. pyrrhum* antes da sugestão de Rees; Zuccarello e Orlovich (2002); sendo necessário um estudo específico para ser adequadamente reclassificado.

No caso de *G. picreus* ele está próximo do clado “gymnopilus”, num clado com várias espécies de *Galerina*, no já referido clado “gymnopiloid” que inclui estes dois gêneros e *Hebelomina* (MONCALVO et al., 2002), pelo qual há necessidade de ser revista a classificação de *G. picreus* e se realmente a característica de presença do pigmento estirilpirona é sinapomórfica para o gênero *Gymnopilus*, característica considerada diferencial (REES; ORLOVICH; MARKS, 1999). Mesmo assim, o clado “gymnopilus” demonstra que o gênero *Gymnopilus* é parafilético devido *Hebelomina neerlandica*. Se for considerado *G. pyrrhus* e *G. picreus* o gênero deveria ser considerado polifilético como *Galerina* (GULDEN et al., 2005), diferente da consideração de Guzmán-Dávalos et al. (2003) que o considerou um táxon monofilético, mas não incluíram *H. neerlandica* nas análises, nem outras espécies de gêneros próximos. O clado “gymnopilus”, por encontrar-se na extremidade do clado “gymnopiloid” mostra uma possível evidência de que o gênero *Gymnopilus* tenha se originado de *Galerina*.

O gênero *Hebelomina* foi criado para táxons que se assemelham a *Hebeloma*, mas não possuem esporos hialinos, entretanto no presente trabalho encontra-se junto com as espécies de *Gymnopilus*, confirmando trabalhos anteriores que a similaridade de *Hebelomina* com *Gymnopilus*, tanto por 26S (MONCALVO et al. 2002) como por ITS (BOYLE et al., 2006), pertencendo ao clado “gymnopilus”, em vez de estarem perto de *Hebeloma* (clado “Hebelomatoid”). Assim, *H. neerlandica* está mais próximo de ser uma espécie do gênero *Gymnopilus* pela região ITS, ou ter se originado dele.

Figura 4 - Árvore filogenética por máxima verossimilhança de sequências de gêneros da família Cortinariaceae, com a amostra de *Gymnopilus* associada à mudas cítricas, com os fungos da ordem Russulales *Heterobasidium annosum* e *Bondarzewia berkeleyi* como grupos externos, baseado nas sequências da região ITS

Como os fungos isolados de mudas cítricas encontram-se no clado “*gymnopilus*” foram selecionadas sequências dentro do clado. No GenBank houve 53 espécies de *Gymnopilus* das quais somente 50 possuem sequências da região ITS (120 sequências), sendo que 31 possuem sequências únicas. Entretanto, algumas são muito curtas ou de baixa qualidade, como de *G. fulgens* (EU518417), pelo qual somente foram usadas de 41 táxons diferentes, referentes ao clado “*gymnopilus*”. Uma premissa para poder direcionar a análise filogenética é que o grupo externo tem que estar o mais próximo do grupo em estudo, mas ele deve possuir maior diferença em relação a todos os indivíduos do grupo, do que quando comparado entre os indivíduos do grupo em estudo. Se esta premissa não for contemplada, podemos ter baixa sensibilidade ou mesmo erros de interpretação, pela diminuição do número de bases úteis para a análise filogenética.

Usados como grupos externos *G. paludosa* e *G. hipnorum* espécies de *Galerina* do grupo molecular “mycenopsis” (GULDEN et al., 2005) por esta combinação ter maior discriminação, não sendo usado *Galerina autumnalis* como realizado por Guzmán-Dávalos et al. (2003 e 2009).

Na análise filogenética houve a formação de grupos dentro clado “gymnopilus” (Figura 5), entretanto nem todos iguais ao do Guzmán-Dávalos et al. (2003 e 2009). Os grupo formados foram o de spectabilis-imperialis, o de nevadensis-penetrans, o de eucalyptorum-tyallus e um grande grupo contendo outros subgrupos (aeruginosus-luteofolius, lepidotus-subearlei, underwoodii-validipes e decipiens-turficola). As espécies não agrupadas foram *G. allantopus*, *G. anomalus*, *G. maritimus*, *G. punctifolius* e *G. robustus*. O agrupamento adicional aos citados por Guzmán-Dávalos et al. (2003 e 2009) é o grupo eucalyptorum-tyallus. O grupo decipiens-turficola foi renomeado para fulgens-decipiens por Guzmán-Dávalos et al. (2009), entretanto a sequência disponível de *G. fulgens* possui baixa qualidade e é externo ao grupo o que o torna vulnerável de estar em certos casos agrupado em outros não, como ocorre no caso de *G. nevadensis* e *G. flavus* no grupo nevadensis-penetrans, pelo qual o mesmo autor alterou a denominação do grupo para somente “penetrans” (GUZMÁN-DÁVALOS et al., 2009).

Hebelomina neerlandica está dentro do grupo de nevadensis-penetrans, ao ser realizada a mesma análise com várias sequências, houve uma diferença de apenas uma a duas bases em relação a *G. penetrans* (99% de identidade) e de duas a quatro em relação a *G. sapineus* (98 a 99%) considerando a região ITS. Se *H. neerlandica* for reclassificada no gênero *Gymnopilus*, a sua identificação molecular pela região ITS será a mesma de *G. penetrans*, tornando o clado “gymnopilus” monofilético. Para poder testar a hipótese da origem de *H. neerlandica* de alguma espécie do grupo há necessidade de um número maior de sequências, à semelhança do que foi realizado para determinar a origem de *Plasmodium falciparum*, uma das espécies de protozoários agentes causais da malária, de *P. reichhenowi*, um patógeno de chimpanzés (RICH et al., 2009). No genbank há três sequências que se agruparam com o grupo decipiens-turficola [duas de *G. sapinius* (AF501560 E AF501559) e uma de *G. penetrans* (AF325663)], o que demonstra um possível erro de identificação para estas sequências depositadas, como vem sendo constatado para outros fungos, como em *Cyathus* (ZHAO et al., 2008).

Figura 5 – Árvore filogenética da análise por máxima verossimilhança de 41 amostras do clado “*Gymnopilus*”, com a amostra de *Gymnopilus* associada a mudas cítricas, com *Galerina hypnorum* e *G. paludosa* como grupo externo, baseado nas sequências da região ITS

A espécie associada às mudas cítricas está dentro do grande grupo (*aeruginosus*-*luteofolius*, *lepidotus*-*subearlei* e *underwoodii*-*validipes*,) ou mais especificamente no sub-grupo *lepidotus*-*subearlei* (GUZMÁN-DÁVALOS et al., 2003). Assim, não se podendo sugerir uma identificação molecular porque está junto com 22 espécies, das quais sete possuem de 98 a 99%

de identidade (*G. dilepis*; *G. lepidotus*; *G. subearlei*; *G. cerasinus*; *G. medius*; *G. norfolkensis*; *G. ochraceus*).

Para tentar caracterizar melhor molecularmente o grupo lepidotus-subearlei, onde se encontram os isolados das mudas cítricas, foi previamente realizada uma simulação das espécies que permitiriam um maior número de bases informativas por parcimônia quando usadas como grupo externo. *G. moabus* foi escolhido por não ser tão próximo do grupo lepidotus-subearlei e por ter fornecido 589 bases informativas com um tamanho de alinhamento de 739 bases, enquanto que *G. purpureosquamulosus* e *G. underwoodii* tiveram 566 e 567 úteis de um total de 740 e 742 bases, respectivamente. Um maior número de sequências das espécies foram adicionadas para poder ter uma estimativa do polimorfismo que pode ocorrer dentro do grupo e dentro das espécies, e quanto da variação estar relacionada ao próprio processo da PCR, do sequenciamento e da manipulação das sequências (Figura 6).

Figura 6 – Árvore filogenética resultante da análise de máxima verossimilhança do grupo "lepidotus-subearlei", com a amostra de *Gymnopilus* associada à mudas cítricas, com *Gymnopilus moabus* como grupo externo, baseado nas sequências da região ITS

Molecularmente o grupo lepidotus-subearlei é diferenciado internamente unicamente por uma transversão entre uma citocinina e uma adenina, respectivamente na posição 471 da sequência de *Gymnopilus-CitrusC*. As outras variações são esperadas pelo polimorfismo intra-específico ou mesmo a erros inerentes ao PCR/sequenciamento. Molecularmente pela região ITS,

o isolado citrus deve corresponder a uma única espécie, denominado aqui de *G. dilepis*, que corresponderia a *G. dilepis*, *G. lepidotus* e as estirpes que vem sendo encontradas em mudas cítricas com substrato a base de fibra de coco. Enquanto que *G. subearlei* representa molecularmente *G. subearlei*; *G. cerasinus*; *G. medius*; *G. ochraceus*. Assim, estes clados não possuem variabilidade suficiente para serem denominados de espécies, podendo estar em processo de especiação, mas não de diferenciação molecular sensível de ser avaliada pela região ITS1-5.8S-ITS2, pelo qual deveriam ser agrupadas e serem denominadas de morfoespécies ou morfogrupos. Esta pressuposição é como a realizada em *Boletus* na seção *Boletus*, onde somente foram reconhecidas molecularmente quatro espécies (*B. aereus*, *B. edulis*, *B. pinophilus* e *B. reticulatus*), sendo que o clado *B. edulis* é pertencente a uma única espécie morfologicamente variável, agrupando *B. betulicola*, *B. edullis*, *B. quercicola* e *B. venturi* (BEUGELSDIJK et al, 2008). Entretanto, também pode ser o caso da necessidade de avaliar outras regiões que possam discriminar estas espécies como ocorre para as leveduras do filo Basidiomycotina que algumas são idênticas para a região D1/D3 de 25S e somente são diferenciadas pelo uso das sequências da região ITS (FELL et al.; 2000).

Os corpos de frutificação de *Gymnopilus* associados a mudas cítricas correspondem a *G. dilepis*, sendo que as diferenças existentes correspondem a variação normalmente encontrada nestas espécies deste gênero. Diferenças na região ITS vem sendo determinadas de até 3 bases em *G. purpuratus* e de 6 em *G. dilepis* (REES; MARCHANT; ZUCCARELLO, 2004).

O gênero *Gymnopilus* P. Karst é um importante componente da biodiversidade fúngica na decomposição da madeira com mais de 200 espécies lignícolas, pertencendo à família Cortinariaceae da ordem Agaricales, possuindo ampla distribuição e sendo classificado por Petter Adolf Karsten em 1879 (KIRK et al, 2001). Esta família possui como características esporos marrom ferrugem, as lamelas com o tempo tornam-se ferruginosas pelos esporos, a estipe possui base mais larga ou bulbosa, sendo que os basidiomas ocorrem em solos com presença de madeira, quando jovens formam uma teia fina antes de abrir o píleo, o qual é carnudo, arredondado e frequentemente saliente (GLICK, 1991). Os basidiomas são de cores brilhantes de cor laranja ferrugem ao amarelado, o que facilita a sua detecção, os quais crescem na madeira ou de madeira enterrada, mas não são comestíveis. Píleo arredondado e achatado com a idade, com lamelas ligadas ou estendendo para baixo com o estipe, a qual é central. Algumas espécies contêm toxinas que causam tonturas e considerados alucinógenos (GLICK, 1991). O gênero *Gymnopilus* vem

sendo estudado para suas aplicações biotecnológicas, como produtor de polissacarídeos com atividade antitumoral e imunomodulador (WASSER, 2002) e produção de antifúngicos (AQUEVEQUE et al., 2006; VAHIDI; MOJAB; TAGHAVI, 2006); além de produtor de lacase e melhora da digestibilidade da palha de trigo (CAPELARI; ZADRAZIL, 1997).

Os basidiomas de *Gymnopilus* são descritas as espécies como de ocorrência tanto em florestas temperadas como tropicais úmidas (LODGE; CANTRELL, 1995), sendo que algumas espécies estão relacionadas a algum tipo de floresta enquanto outras possuem ampla distribuição. Por exemplo, as espécies tropicais de *Gymnopilus* podem ser encontradas em (GUZMÁN-DÁVALOS, 2002): florestas tropicais (*G. hemipenetrans*, *G. lateritius*, *G. medius*, *G. robustus*, *G. cf. subdryophilus*, *G. subearlei* e *G. tuxtlense*), em florestas subtropicais (*G. rugulosus* e *G. subgeminellus*) e independentes do tipo de floresta (*G. fulvosquamulosus*, *G. lepidotus*, *G. palmicola* e *G. subpurpuratus*), isto é, em florestas tropicais, subtropicais e temperadas. Entretanto, vem sendo descritas novas espécies, como *G. maritimus* que está associada a solos arenosos em solos costeiros (GUZMÁN-DÁVALOS et al., 2009).

No Brasil vêm sendo citadas 41 espécies de *Gymnopilus* (PUTZKE 1994; SOBESTIANSKY, 2005; ALBURQUERQUE, 2006), entretanto somente cinco espécies possuem sequências no GenBank. Este gênero vem sendo encontrado em levantamento realizado na mata atlântica, como *Gymnopilus* cf. *areolatus* no Estado de Minas gerais e *G. aureobrunneus* no Estado de São Paulo (ROSA et al., 2009). Em Santa Catarina, *Gymnopilus* cf. *chrysopellus* foi observada em florestas ombrofilas densas, mas não em florestas de *Pinus* (KARSTEDT; STÜRMER, 2008). Na Amazônia foi encontrado junto com *Galerina* (AGUIAR, 1984 e SINGER, 1984), mas não encontrado no levantamento realizado por Souza e Aguiar (2004). No pantanal foi encontrado *G. earlei* (BONONI et al., 2008). No Rio Grande do Sul, *G. earlei* (CORTEZ; COELHO, 2005); *Gymnopilus pampeanus* em plantações de eucalipto (SOBESTIANSKY, 2005) e mata nativa (DRECHSLER-SANTOS et al., 2007); *Gymnopilus subtropicus* em madeira de árvore morta de floresta mista (SOBESTIANSKY, 2005). Na Argentina, no parque do Iguaçu *Gymnopilus earlei* e *Gymnopilus lepidotus* (WRIGHT; WRIGHT, 2005).

A classificação de um grande número de espécies neste gênero pode ter ocorrido pelas alterações ocorridas nos corpos de frutificação nos diferentes herbários e no tempo até a sua descrição como vem sendo sugerido para muitas espécies de *Gymnopilus* na Austrália (REES;

STRID, 2001). O uso da identificação molecular é para auxiliar nestes problemas, entretanto ela vem sofrendo um impasse talvez pela superestimação da importância de caracteres morfológicos e ecológicos, os quais entram em conflito com a nova sistemática, que apesar de provocar inúmeras dúvidas taxonômicas, está trazendo grandes benefícios para ambos os lados. As dúvidas deverão diminuir ou serão resolvidas com o aumento de genes seqüenciados, aumentando o número de bases informacionais, e a avaliação não somente de um ou outro gene, mas de grandes volumes de informação pelas ômicas (genômica, proteômica ou metagenômica) na filogenômica nascente e irreversível.

O gênero é dividido em duas seções morfológicas (SINGER, 1986): 1) *Annulatae* contendo espécies com um anel persistente e membranoso, e 2) *Gymnopilus* com um véu aracnóide (cortina) ou sem. Uma outra subdivisão do gênero foi sugerida em função do tamanho dos basidiósporos (GUZMÁN-DÁVALOS, 1995): *Microspori*, *Gymnopilus* e *Macrospori* (sem anel e com esporos grandes). Entretanto, os dados moleculares evidenciam que o tamanho dos basidiósporos e a presença do véu devem ser características homoplásticas neste táxon, pelo qual estes agrupamentos são artificiais e não consistentes para a taxonomia moderna (GUZMÁN-DÁVALOS et al., 2003).

A caracterização das coleções associara dados morfológicos, moleculares ecológicos e de comportamento para a determinação real das espécies fúngicas, que apesar da dificuldade de termos na sua delimitação e definição, é de importância generalizada nos estudos evolutivos, filogenéticos e conservacionistas.

A identificação de *G. dilepis* associado à mudas cítricas, representa a primeira constatação desta espécie no Brasil e traz um questionamento como teria sido introduzida no país, já que considerasse como originária da Oceania e associada a coco. Uma introdução recente foi sugerida na Inglaterra que teria ocorrido da Austrália. É necessário investigar se ela veio do continente Europeu ou da Oceania e a forma de introdução se ocorreu com germoplasma de coco ou por outros meios. Desvendar qual o caminho de introdução é de extrema importância, tanto de vista evolutivo e ecológico, como agrícola. Direcionando as medidas de exclusão porque a introdução de microrganismos com características mesmo saprofíticas e aparentemente sem grandes impactos, podem se comportar completamente diferentes do esperado e trazer graves prejuízos nos ambientes naturais como nos agrícolas.

O gênero *Gymnopilus* não vem sendo associado a problemas agrícolas como vem ocorrendo na produção de mudas cítricas por *G. dilepis*, levando a uma nova interação antagônica pela sua capacidade de rápido crescimento com diminuição da matéria seca, associada à redução da capacidade de retenção de água no substrato. O qual precisa de maiores estudos epidemiológicos para conhecer seu ciclo e necessidades, para poder determinar seu controle e manejo na produção de mudas cítricas ou outra cultura que venha utilizar este substrato para a multiplicação de mudas ou produção plantas ornamentais.

2.3.4 Ninho-de-passarinho (*Cyathus stercoreus*)

Foram detectados corpos de frutificação do tipo ninho-de-passarinho, tanto em viveiros comerciais como na fábrica de substrato, crescendo aderidos aos fragmentos de casca de pinus (Figura 7). Apesar da inicial preocupação pelos produtores, observou-se que não provocavam nenhuma alteração perceptível, seja de alteração de retenção da água ou impermeabilização, nem no desenvolvimento das plantas.

Eles possuíam basidiomas com formato afunilado, externamente ao perídio a cor era marrom claro a marrom avermelhado, internamente um cinza prata e brilhante sendo mais claro no interior da gleba, medindo de 11 a 13 mm de altura, com abertura de 6 a 9 mm e uma base de 2mm. O ectoperídio possui hifas de cor marrom avermelhado que lembram cabelos desarrumados. Os peridiólos eram lenticulares de cor cinza brilhante mais escuros do que a parte interna do perídio, medindo entre 2-2,5mm por 2mm, com espessura menor que 1 mm.

O isolamento foi facilmente realizado dos peridiólos, com baixa frequência de contaminação, produzindo colônias brancas com ligeira tonalidade amarronzada, que aumenta com a idade da colônia.

A família Nidulariaceae é composta dos gêneros *Crucibulum*, *Cyathus*, *Nidula*, *Nidularia* e *Mycocalia*, sendo que anteriormente era considerada uma ordem (Nidulariales), esta alteração ocorreu pela sistemática molecular, que observou que este táxon estava dentro da ordem Agaricales (HIBBETT et al, 1997).

Morfologicamente o gênero *Nidularia* está mais próximo de *Cyathus*, os quais possuem peridiólos cinza para escuros, o qual os diferencia dos outros três gêneros (*Crucibulum*, *Nidula* e *Mycocalia*), sendo que *Crucibulum* é separado de *Cyathus* pela parede grossa do perídio

consistindo de uma única camada de hifas e por uma estrutura única do funículo, e de *Nidula* pela presença do funículo (BASEIA; MILANEZ, 2001a).

Figura 7 - Aspecto dos ninhos-de-passarinho de *Cyathus stercoreus* encontrado na superfície do substrato, a base de casca de pinus, em mudas cítricas. Barra = 1 cm

A amplificação de região ribossomal ITS-1, 5.8S e ITS2 teve um produto de aproximadamente 750pb, e obtida uma sequência consenso de 649nt. Ao ser avaliada pelo BLASTn as 24 primeiras sequências foram do gênero *Cyathus*, com e-value de zero, em concordância com os dados morfológicos. Após as sequências de *Cyathus*, as sequências com maior similaridade foram da família Tricholomataceae da ordem Agaricales, como *Laccaria laccata* (FJ596857) e *Termitomyces* sp. (AB073504). As sequências de *Cyathus stercoreus* tiveram de 98 a 100% de cobertura e um e-value de zero, mas uma identidade somente de 95%; enquanto que as outras espécies foram de 85 a 95% de identidade e de 81 a 98% de cobertura; com exceção de *C. triplex* que teve a menor cobertura com 69% mas uma identidade de 100% e um e-value de $9e^{-158}$, entretanto esta sequência é pequena. Pelas informações moleculares do alinhamento simples podemos apenas citar que o ninho-de-passarinho observado na produção de substrato e mudas cítricas pertence ao gênero *Cyathus*, mas não podemos determinar a espécie pela escolha das primeiras sequências com maior similaridade do alinhamento simples realizado pelo BLASTn com o genBank, já que em geral é esperado que a similaridade ser no mínimo de 97%, talvez ocorrendo pelo baixo número de sequências disponíveis para a família Nidulariaceae, pela baixa representatividade das espécies do gênero *Cyathus*, pela própria variabilidade da região ITS em este gênero ou espécies como *C. stercoreus*, pelo tamanho e/ou qualidade das sequências disponíveis no GenBank.

A posição taxonômica do isolado citros pode ser vista na Figura 8, em função da região ITS de representantes das famílias da ordem Agaricales e dos gêneros de Nidulariaceae, encontrando-se dentro do clado do gênero *Cyathus*, em concordância com as características morfológicas. A família Nidulariaceae apresenta-se como polifilética, sendo que os gêneros *Nidula* (*N. niveotomentosa* DQ463358) e *Mycocalia* (*M. denudata* DQ911596) não se encontram nem mesmo próximo do clado do gênero *Cyathus*, com exceção de *Crucibulum* (*C. laeve* DQ463357), o qual é o táxon mais próximo de *Cyathus*, enquanto que *Nidula* e *Mycocalia* estão mais próximos entre si. Não sendo incluído *Nidularia* devido que a sequência ser de baixa qualidade, com muitas bases com “n” (*Nidularia deformis* EU784377). Na região ITS não foi encontrado o clado “nidulariaceae” sugerido por Moncalvo et al. (2002) para *Cyathus* e *Crucibulum*, por sequências da subunidade maior do ribossomo da região do 25S (domínios D1-D3), o qual possui baixa consistência (<40%).

O táxon *Cyathus* é monofilético, mas forma alguns grupos intragênericos. Molecularmente são reconhecidos três grupos, que podem ser separados por algumas características morfológicas: Ollium, Pallium e Striatum (ZHAO et al., 2007); enquanto que anteriormente eram considerados sete grupos morfológicos, mas não foram sustentados pelas análises moleculares (ZHAO et al., 2008). Na análise do clado “cyathus” podem ser observados os grupos moleculares (Figura 9). O grupo Ollium não formou nenhum clado dentro do gênero *Cyathus*, sendo constituído por *C. africanus*, *C. colensoi*, *C. hookeri*, *C. jiayuguanensis* e *C. olla*. O grupo Pallium formou um clado constituído por *C. berkeleyanus*, *C. pallidus* e *C. pygmasus* (= *C. gansuensis*). O Striatum constituído por três agrupamentos: o primeiro constituído por *C. crassimurus*, *C. setosus* e *C. triplex*; segundo por *C. annulatus*, *C. renweii*, *C. striatus* e *C. subglobisporus*; e o terceiro por *C. stercoreus* e *Cyathus-Citrus*.

O isolado citros ficou no grupo “striatum” próximo de *C. stercoreus*, mas distante o suficiente para poder se tratar de uma outra espécie. As diferenças entre as sequências de uma mesma espécie para a região ITS para *C. stercoreus* foi de no máximo 6 nucleotídeos ou 0,82% e para *C. striatus* foi de apenas dois nucleotídeos ou 0,33%; mesmo sendo de origens geográficas bem distantes como no caso de *C. stercoreus*, que eram provenientes de China e do Reino Unido, ambas espécies abaixo do limite de 1,00% considerado como variação normal para o polimorfismo intra-específico. A porcentagem de bases diferentes entre o isolado obtido de mudas cítricas e as sequências de *C. stercoreus* foi de 2,55 a 2,74% e os “gaps” variaram de 4,78

a 4,94%, enquanto que ao comparar com as de *C. striatus* foi de 6,60 a 8,29% para bases e de 3,88 a 5,52% para gaps. O qual também é apoiado pela identidade das sequências ser menor que 95% e pelas diferenças morfológicas comparado com as chaves para as espécies de ocorrência no Brasil (BASEIA; MILANEZ, 2001b).

Figura 8 - Árvore filogenética por máxima verossimilhança de 21 famílias da ordem Agaricales, representantes dos gêneros de Nidulariaceae, com os fungos da ordem Russulales *Heterobasidium annosum* e *Bondarzewia berkeleyi* como grupos externos e a sequência da *Cyathus* associada à produção de mudas cítricas, baseado nas sequências da região ITS

Figura 9 - Árvore filogenética do gênero *Cyathus* inferida pela análise das sequências da região ITS do rDNA por máxima verossimilhança, com *Cystoderma amianthinum* e *Crucibulum laeve* como grupos externos e o *Cyathus* associado à mudas cítricas

No Brasil, a família Nidularaceae possui poucos levantamentos e estudos sobre a sua identificação, biologia e aproveitamento biotecnológico, sendo descritas 12 espécies de *Cyathus* das 44 espécies descritas, uma de *Crucibulum* e de *Nidularia*. No gênero *Cyathus* ocorrem *C. ambiguus* Tul. & C. Tul.; *C. byssisedus* (Jungh.) Tul.; *C. berkeleyanus* (Tul. & C.Tul.) Lloyd; *C. limbatus* Tul. & C.Tul. (sin. *C. cheliensis*), *C. montagnei* Tul. & C.Tul., *C. olla* (Batsch & Pers.) Pers., *C. pallidus* Berk & Curt., *C. poeppigii* Tul. & C.Tul. (sin. *C. megasporus*), *C. stercoreus* (Schwein & De Toni) De Toni, *C. striatus* (Huds & Pers.) Pers., *C. triplex* Lloyd e *C. vernicosus* (Bull.)DC. (Baseia & Milanez, 2001b; Cortez et al., 2006). Para *Crucibulum* só foi identificado *C. laeve* no Estado de São Paulo (BASEIA; MILANEZ, 2001a) e para *Nidularia* no Rio Grande do Sul foi *N. pulvinata* (Schwein.) Fr. (CORTEZ; BASEIA; GUERRERO, 2006). Entretanto não há sequências da região ITS para espécimes que ocorrem no país, e no caso de *C. ambiguus*, *C. byssisedus*, *C. montagnei* e *C. vernicosus* nem possuem sequências disponíveis no GenBank.

O isolado citros pode ser considerado como *C. stercoreus*, pelas pequenas diferenças morfológicas, mas molecularmente distante o suficiente para poder se tratar de uma outra espécie. Esta é a primeira descrição de *Cyathus stercoreus* associado a mudas cítricas e a fábricas de

substrato a base de casca de pínus, crescendo saprofiticamente e nos fragmentos maiores a formação dos corpos de frutificação, mas não sendo detectado nenhum efeito antagônico sobre o desenvolvimento das plantas cítricas nos viveiros comerciais.

Os levantamentos recentes de ninho-de-passarinho vêm encontrando novas espécies, como ocorreu nas no norte da Tailândia com a descoberta de uma nova espécie de *Cyathus*, descrita como *C. subglobisporus* baseado nas características morfológicas e moleculares (ZHAO et al, 2008). Esta espécie se distingue pela cor marfim dos corpos de frutificação recobertos com hifas com um aspecto de cabelos desgrenhados, dobras sobre a superfície interna do perídio e basidiósporos subglobosos e molecularmente associado ao grupo *Striatum* (ZHAO et al., 2008).

A facilidade de isolamento do fungo a partir dos peridíolos pode ser devido à própria produção de antibióticos das hifas ou presentes nas próprias estruturas, como ocorre em *C. striatus* que produz vários antibióticos como as “striatins” (A, B, e C) que possuem ampla atividade contra fungos e bactérias, tanto gram negativas como positivas (ANKE et al., 1977), o qual explicaria a facilidade de isolamento dos peridíolos sem contaminações, apesar da exposição ao ar das estruturas, já que eles excretam vários metabólicos antimicrobianos (LIU; ZHANG, 2004).

Um dos potenciais de aplicação de *C. stercoreus* é sua capacidade de tornar a palha de milho mais digerível quando comparado a outros fungos (*Dichomitus squalens* e *Phanerochaete chrysosporium*), além de levar a uma mínima perda de matéria seca (KARUNANANDAA et al., 1995). Esta ultima informação explicaria a não percepção de perda de peso quando este fungo está colonizando o substrato nos viveiros ou nas fábricas de substrato. Nas aplicações na área farmacêutica, a descoberta de três novos policetídios, cyathuscavins A, B e C de *Cyathus stercoreus*, com atividade antioxidante comparável aos de referência como BHA e Trolox. As Cyathuscavins A-C protegeram o DNA plasmidial do Fe^{2+} e da água oxigenada (H_2O_2), os quais induzem quebra da dupla fita (KANG et al, 2008).

Para um real aproveitamento biotecnológico futuro é importante a realização de levantamentos associados a isolamentos, não somente a trabalhos descritivos e sujeitos a subjetividade, necessitando de se apoiar na caracterização molecular para conhecer melhor a biodiversidade da família Nidulariaceae.

2.3.5 Falsa Trufa (*Agaricaceae incertae sedis*)

Este tipo de macrofungo foi observado somente em um viveiro de citros (Figura 10A-C), semelhante a trufas (*Tuber* spp.) que são iguarias de alto valor econômico (ZAMPIERI, et al., 2009) e que se associam às espécies de carvalho, sendo cultivadas até em mudas em casa de vegetação (PRUETT; BRUHN; MIHAIL, 2009). A presença dos corpos de frutificação levaram a um menor desenvolvimento das mudas cítricas, podendo ser detectadas em função da altura, quanto menor o tamanho das plantas maior o número de falsas trufas no substrato das mudas (Figura 10D). Os corpos de frutificação podiam ser observados na superfície das mudas, mas eles encontram-se semi-imersos a completamente no interior do substrato, isto é, são semi-hipógeos a hipógeos. Eles apresentam coloração clara que com o tempo vá tornando-se escura, tanto externamente como internamente (Figura 10E-J). A forma é bastante variada predominando as ligeiramente esféricas, mas as dobras ocorrendo pelas limitações de crescimento encontradas no substrato, o qual leva a formação de quinas. As falsas trufas quando ainda com coloração clara, se cortadas e apertadas ocorre liberação de líquido, o que demonstra a grande capacidade de absorção de água na fase de rápido crescimento. O peso das trufas varia de 0,2 g a 22,0 g, em média com 5,6 g, tendo como dimensões de 0,6 a 3,6 cm para altura, de 0,7 a 5,2 cm para o comprimento e 0,7 a 4,0 cm para a largura (Tabela 2).

Este fungo aparentemente sem nenhuma associação com as raízes de citros. O substrato colonizado exala um cheiro forte que lembra um pouco hipoclorito. O sistema radicular das mudas aparenta ser bem menor e apresenta radículas podres. Estas radículas não são colonizadas por *Phytophthora*, e assemelha-se às queimaduras que ocorrem quando o substrato não está estabilizado pela falta de compostagem. Esta falsa trufa pode estar associada com a compostagem final do substrato, com aumento da temperatura que levaria à morte das radículas e explicaria o efeito sobre o desenvolvimento das mudas.

O micélio possui um rápido crescimento em meio de cultura e ocorre formação das falsas trufas *in vitro* (Figura 10K e 10L), principalmente na borda das placas de Petri, mas geralmente menores que 10 mm de comprimento. Os corpos de frutificação ao serem cortados apresentam uma coloração escura (Figura 10M) e avermelhada.

Figura 10 – Aspecto dos basidiomas da falsa trufa associada à mudas cítricas, externamente como internamente em viveiro comercial como *in vitro*. A-C) Aspecto dos corpos de frutificação na superfície do substrato das mudas; D) aspecto do lote de mudas afetado; E-G) Variação morfológica e de coloração externa e H-J) interna da gleba das falsas trufas coletadas das mudas, K e L) em meio cenoura-ágar produzida *in vitro* e M) cortada para visualizar a gleba. Barra=2cm

Tabela 2 - Dimensões e peso fresco das falsas trufas encontradas nas mudas cítricas

	PESO FRESCO	COMPRIMENTO	LARGURA	ALTURA
	(g)	(cm)	(cm)	(cm)
Média	5,6	2,6	2,2	2,0
Máximo	22,0	5,2	4,0	3,6
Mínimo	0,2	0,7	0,7	0,6

Os esporos encontram-se revestindo superficialmente o sistema de dobras interno dentro do corpo de frutificação fechado (Figura 11B e 11C), os quais são unicelulares e ornamentados de coloração marrom (Figura 11A). A ornamentação lembra um retículo (Figura 11A), que pode ser melhor observado pela MEV (Figuras 11D e 11G), no qual se apresenta como coberto por um envoltório, que vá se desfazendo e sob o qual há a ornamentação propriamente dita. Não foram observadas nem basídios nem ascos típicos, somente esporos. Estes esporos são formados por estruturas que podem ser basídios, mas que formam apenas um basidiósporo por vez, em alguns casos parecem até dois (Figuras 11E e 11F).

Uma das primeiras suspeitas recaía sobre *Diehliomyces microsporus* (Diehl & Lamb.) Gilkey, pelo aspecto dos corpos de frutificação e por se tratar de substrato à base de casca de pinus, já que este fungo coloniza substratos e a cobertura usada para produção do champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) e o cogumelo do sol (*Agaricus brasiliensis* Wasser et al.), provocando perdas na produção (Nascimento & Eira, 2003); mas morfologicamente são facilmente diferenciados pelos esporos, neste caso sendo hialinos, lisos, sem ornamentação e com presença de ascos.

Figura 11 - Aspecto em microscopia ótica e de varredura do interior da falsa trufa associada à mudas cítricas. A) esporos em microscopia ótica; B e C) interior da gleba com reentrâncias e esporos; D) esporos; E) corte lateral do himênio; F) detalhe de possíveis basídios e G) detalhe da ornamentação do esporo. Escalas de 2µm (G), 10 µm (A, D), 20 µm (D e E) e 200 µm (B e C)

Os esporos da falsa trufa das mudas são muito semelhantes aos ascósporos das trufas verdadeiras (gênero *Tuber*) de coloração vermelho-amarronzado com ornamentação reticulada, mas não foram observados ascos, os esporos estando na superfície das reentrâncias internas da gleba. Nas chaves encontradas para corpos de frutificação fechados para basidiomicetos não conseguimos uma que se adequasse para a identificação nem ao nível de gênero, pelo qual suspeitasse de tratar-se de um gênero ainda não descrito.

No caso dos isolados do município de Araras, de mudas com substrato a base de casca de pínus, houve uma região consenso de 757 nt, de um sequenciamento bidirecional. O consenso não teve alta similaridade com nenhuma espécie nem gênero específico pelo BLASTn, variando de 73% a 93% de identidade e um e-value de 4×10^{-93} a 4×10^{-125} . O gênero *Agaricus* variou de 73 a 88% com 24 sequências (*A. bitorquis*, *A. tollocanensis*, *A. boisseletti*, *A. moelleri*, *A. phaeolepidotus*, *A. menieri*, *A. aruensis*, *A. maskae*, *A. romagnesii*, e *A. pseudopratensis*); *Bovista* com 82% e duas sequências (*B. minor*); *Allopsalliota* com 84% e uma sequência (*A. geesterani*); *Chamaeota* com 1 sequência (*C. sinica*); *Chlorophyllum* com 81 a 85% e 21 sequências (*C. agaricoides*, *C. alborubens*, *C. globosum*, *C. hortense*, *C. molybdites*, *C. nothorachodes*, *C. olivieri*, e *C. rachodes*); *Endoptychum* com 5 sequências, *Lepiota* com duas sequências; *Leucoagaricus* com 4 sequências e *Macrolepiota* com 33 sequências; 5 da subfamília Lepiotaceae sem identificação e duas de fungos não cultiváveis.

A determinação taxonômica do isolado citros foi realizado inicialmente com representantes dos principais gêneros dos filos ascomycotina e basidiomycotina que produzem corpos de frutificação fechados em função da região ITS (Figura 12). Os ascomycotina foram separados dos basidiomycotina em clados independentes. A formação de corpos de frutificação fechados e com hábito semi-hipógeos a hipógeos ocorre em diferentes momentos da evolução dos fungos, podendo ser observados três grupos nos ascomycotina e três nos basidiomycotina pela região ITS (Figura 12).

Nos ascomycotina, há formação de dois clados um que subdivide em dois subgrupos. O clado que se subdivide representa parte da ordem Pezizales, sendo que o primeiro grupo representa a família Tuberaceae, tendo como representantes *Choiromyces* e *Tuber*, além dos gêneros *Dingleya*, *Eremiomyces*, *Labyrinthomyces* e *Reddellomyces*. O gênero *Tuber* é o mais estudado e conhecido pela sua importância econômica, constituindo associações micorrízicas com árvores perenes como o carvalho; entretanto não cultivável em laboratório.

Figura 12 - Árvore filogenética da falsa trufa associada à mudas cítricas em relação a gêneros de macrofungos fechados presentes nos filos basidiomycotina e ascomycotina inferida pela análise das sequências da região ITS do rDNA pela máxima verossimilhança, com *Endogone lactiflua* e *Phytophthora infestans* como grupos externos

A árvore filogenética demonstra bem que apesar de ser muito semelhantes com os esporos do gênero *Tuber*, a falsa trufa associadas à mudas cítricas nem pertencem ao mesmo filo. Mas, o gênero *Tuber* está próximo de *Choiromyces* denominados de trufas de porco, os quais exalam um cheiro desagradável e aparentemente semelhante ao observado no substrato das mudas cítricas, entretanto esta característica não servindo para identificação, porque táxons tão diferentes possuem a mesma característica. No segundo sub-grupo da ordem Pezizales representa a família Pezizaceae tendo como representantes *Cazia*, *Hynoplicata*, *Hydnotryopsis*, *Sarcosphaera* e *Terfezia*.

O segundo clado não consegue uma diferenciação taxonômica adequada, representando também gêneros da ordem Pezizales com exceção do gênero *Elaphomyces* (denominadas de hart's truffles) que pertence à ordem Eurotiales (da família Elaphomycetaceae), mas devido ao comprimento do ramo na árvore, era previsto que fosse mais distante do que os outros integrantes do clado. As famílias da ordem Pezizales neste grupo são: *Hynotrya* da Discinaceae; *Balsamia* e *Leuconium* da família Helvellaceae; e *Genea* e *Geopora* da família Pyronemataceae. *Diehliomyces* está junto de *Genea* e *Geopora* pelo qual deve pertencer à família Pyronemataceae da ordem Pezizales, apesar de estar classificada como Ascomycota *incertae sedis* (LUMBSCH; HUHNDORF, 2007), além de ser um gênero monotipo, isto é, com apenas uma única espécie (*D. microsporus*).

Nos basidiomycotina, o primeiro grupo formado por *Phallus* e *Gaeastrum*, da subclasse Phallomycetidae, mas das ordens Phallales e Geastrales, respectivamente. Anteriormente estes dois gêneros estavam na mesma ordem Phallales, possuindo estratégias peculiares para a dispersão dos esporos, mas nenhum deles forma estruturas hipógeas. O corpo de frutificação na fase final de maturação expõe os esporos externamente, como um atrativo pegajoso para moscas (*Phallus*) ou pela abertura em forma de estrela e bombeando os esporos como um sifão (*Gaeastrum*). O segundo grupo é da ordem Boletales constituído pelos gêneros *Astraeus*, *Octavianina*, *Pisolithus*, *Rhizopon* e *Scleroderma*, todos apresentando corpos de frutificação fechados, alguns semi-hipógeos e formadores de ectomicorrizas com espécies arbóreas. O último grupo não houve uma diferenciação em um clado, mas representam os gêneros da ordem Agaricales, como da família Lycoperdaceae (*Bovista*, *Calvatia* e *Lycoperdon*), da Nidulariaceae (*Crucibulum*) e da Mycenastraceae (*Mycenastrum*), além da falsa trufa associada às mudas cítricas, a qual estava mais próxima da família Lycoperdaceae. Na ordem Agaricales considera-se

que ocorreram dois eventos de gasterização dos quatro ocorridos nos Ascomycotina, isto é, formação de corpos de frutificação fechados, sendo um na família Nidulariaceae e outro na Lycoperdaceae/Agaricaceae (HIBBETT et al., 1997), embora pelas evidências este processo parece ter ocorrido mais frequentemente, como ocorreu também na família Cortinariaceae dentro do clado cortinaroid (*Protoglossum*, *Quadrispora* e *Thaxterogaster*) da ordem Agaricales. Os cogumelos do gênero *Agaricus* possuem características bioquímicas em comum com membros da família Lycoperdaceae, sendo que a gasteromicetação parece ter ocorrido mais frequentemente em certos clados, em especial na família Agaricaceae e nos grupos de esporos escuros (MONCALVO et al., 2002).

Figura 13 - Árvore filogenética com os gêneros formadores de corpos de frutificação fechados e hipógeos do filo basidiomycotina, a falsa trufa associada à mudas cítricas, *Exobasidium vaccinii* e *Ustilago avenae* como grupos externos

A reavaliação dos resultados apenas usando os gêneros dos macrofungos do filo basidiomycotina de habito hipógeos (Figura 13), demonstra também a associação com a ordem

Agaricales com as famílias Agaricaceae (*Endoptrichum* e *Podaxis*), Bolbitiaceae (*Gastrocybe* e *Setchelliogaster*), Hymenogastraceae (*Hymenogaster*), Phelloriniaceae (*Phellorinia*) e Strophariaceae (*Nivatogastrium* e *Weraroa*).

A falsa trufa associada a citros foi reanalisada com os representantes das famílias da ordem Agaricales e gêneros da família Lycoperdaceae, entretanto ela está em um clado próximo, mas diferente da família Lycoperdaceae (Figura 14); enquanto que os representantes das famílias Agaricaceae e Micenastraceae estão no mesmo clado. O gênero *Podaxis* pertencia à família Podaxaceae, mas esta família foi incluída na Agaricaceae (KIRK, et al., 2001).

Figura 14 - Árvore filogenética da falsa trufa associada à mudas cítricas em relação às famílias da ordem Agaricales e gêneros da família Lycoperdaceae, pela análise das sequências da região ITS do rDNA pela máxima verossimilhança. Os fungos da ordem Russulales *Heterobasidium annosum* e *Bondarzewia bekeleyi* como grupos externos

A análise com os representantes dos gêneros de Agaricaceae (Figura 15) mostra que a falsa trufa está mais próxima do gênero *Macrolepiota*. Apesar de se encontrar como da família agaricaceae no GenBank, retiramos o gênero *Leucopholiota* por ser muito diferente, apresentando um braço muito grande, em concordância com Miller, Volk, Bessette (1996), que inclui este táxon na família Tricholomataceae da ordem agaricales.

Figura 15 – Árvore filogenética da falsa trufa associada à mudas cítricas em relação aos gêneros da família Agaricaceae e *Podaxys pistillaris* da Podaxaceae pela análise das sequências da região ITS do rDNA por máxima verossimilhança, com *Gymnopilus junonius* e *Pleurotus ostreatus* como grupos externos

Na análise com as espécies de *Agaricus*, *Chlorophyllum* e *Macrolepiota*, a falsa trufa associada às mudas cítricas encontra-se externamente ao clado *Agaricus* (Figura 16), formado um braço independente, hora associando-se com *Agaricus* ora com *Macrolepiota*. Ele representa um novo táxon, provavelmente um novo gênero que precisa ser melhor estudado em todos os seus aspectos para o entendimento da sua biologia, relações ecológicas e potenciais biotecnológico. A identificação deve ser Agaricaceae *incertae sedis*, já que conseguimos determinar a família a qual a falsa trufa pertence, devendo se realizar um estudo detalhado para poder dar consistência para a classificação de um novo gênero na família agaricaceae.

Figura 16 - Árvore filogenética da falsa trufa associada à mudas cítricas em relação a espécies dos gêneros *Agaricus*, *Chlorophyllum* e *Macrolepiota*, outros gêneros da família Agaricaceae pela análise das sequências da região ITS por máxima verossimilhança

2.3.6 Cogumelo marrom (*Gymnopus luxurians*)

Um outro corpo de frutificação encontrado com basidiomas pequenos, com hábito cespitoso, píleo de cor marrom escuro brilhante, laminas e estipe de cor branco, com basidiósporos hialinos. As colônias são brancas de aspecto radial e micélio fino no meio cenoura.

Na identificação molecular, o sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do isolado do município de Rio Claro mostrou uma região consenso de 638 nt, de dois sequenciamentos bidirecionais. A sequência consenso ao ser comparada com as disponíveis por alinhamento simples no GenBank, com auxílio do BLASTn, teve similaridade com espécies do gênero *Gymnopus* da família Tricholomataceae da ordem Agaricales, variando de 81% a 99% de identidade e E-value de 0 a 4×10^{-156} . As 71 sequências de espécies de *Gymnopus* apresentaram identidade de: 98 a 99% (*G. luxurians*); 93 a 96% (*G. brunneigracilis*; *G. gibbosus*; *G. fibrosipes*; *G. luxurians* e *G. trogioides*); 87 a 91% (*G. dichrous*; *G. polygrammus*; *G. readii*; *G. subpruinosis* e *G. villosipes*); 81 a 86% (*G. biformis*; *G. nonnullus*; *G. indoctus*; *G. melanopus*; *G. parvulus*; *G. cylindricus*; *G. peronatus*; *G. subnudus*; *G. iocephalus*). Entretanto houve similaridade com outras sequências de outros gêneros; como *Collybia* (*C. butyracea*; *C. polygramma* e *C. subnuda* de 81 a 88%) e *Rhodocollybia* (*R. butyracea* de 81 a 86%) da família Tricholomataceae; e *Marasmiellus* (*M. juniperinus*; *M. ramealis* e *M. stenophyllus* de 84 a 87%) da família Marasmiaceae da ordem Agaricales.

O gênero *Gymnopus* pertence à família Tricholomataceae da ordem Agaricales, possuindo 300 espécies, muitas das quais foram incluídas de *Collybia* e possuem ampla distribuição geográfica (KIRK et al, 2001). Este táxon é polifilético, sendo que está dentro do clado “lentinuloid” (MONCALVO et al., 2002 e MATA; HUGHES; PETERSEN, 2004), com *Lentinula*, *Marasmiellus*, *Marasmius*, *Micromphale*, *Rhodocollybia* e *Setulipes*, sendo que *Gymnopus* se divide em dois grupos principais, denominados de “marasmiellus” e “gimnopus” (WILSON; DESJARDIN, 2005). Para a análise filogenética escolheu-se sequências das espécies do gênero presentes no GenBank (Figura 17). O clado “marasmiellus” está dividido em dois, sendo que o isolado de *Gymnopus* associado às mudas cítricas encontra-se dentro de um deles.

No Brasil não vem sendo relatado especificamente o gênero *Gymnopus*, mas há 32 espécies de *Collybia* (PUTZKE, 1994), entre as quais *Collybia collybioides* que atualmente é *G. collybioides*, mas não há referência a *C. luxurians*, pelo qual seria o primeiro relato no país.

Figura 17 - Árvore filogenética do *Gymnopus* associado à mudas cítricas em relação às espécies do gênero, pela análise das sequências da região ITS por máxima verossimilhança. Os fungos da ordem Russulales *Heterobasidium annosum* e *Bondarzewia bekeleyi* como grupos externos

2.3.7 Cogumelo Amarelo (*Leucocoprinus birnbaumii*) e Branco (*L. brebissonii*)

Os cogumelos do gênero *Leucocoprinus* são os mais frequentemente observados sobre substratos de casca de pinus sendo um “branco” (*L. brebissonii*) e dois tipos de cogumelos “amarelos” (*L. birnbaumii*), denominações adotadas pelos produtores de mudas cítricas (Figura 18A, 18B, e 18C, respectivamente).

O cogumelo branco é menos frequente, entretanto pode predominar em alguns viveiros dependendo da origem e lotes do substrato a base de casca de pinus. Ele produz predominantemente basidiomas na superfície do substrato nas mudas cítricas, podendo ser produzidos pelos orifícios de drenagem ou mesmo pela parte inferior da muda (Figura 18 E), medindo de 3 até 6 cm. O micélio que cresce no substrato além do corpo de frutificação geralmente não é visível a olho nu, tanto na parte superior, nos orifícios ou no interior do substrato. Os basidiomas possuem píleo e estipe típicos normalmente com presença do anel (Figura 18A). O píleo é predominantemente de cor branca principalmente na borda e gradualmente colorido semelhante ao mármore, tornando-se mais escuro na parte central, variando de um marrom-avermelhado para ligeiramente roxo (Figura 18A), sendo de consistência mais firme do que o cogumelo amarelo. O tamanho varia de 2 a 6 cm de diâmetro e o formato é cilíndrico antes da abertura, passando para cônico, para o campanulado e para o umbunado quando aberto. O estipe é do tipo clava para bulboso, sendo que a partir do terço médio mantém as mesmas dimensões, sendo reto, a relação entre o diâmetro da base e o da parte central pode chegar entre 2,3 e 2,7. Entretanto, a base dilata do estipe pode não ser observada, saindo do substrato com um diâmetro constante, aparentando ser cilíndrica. Não há uma visualização da volva. No início de formação, quando já há diferenciação entre a parte que ira formar o estipe e o píleo, este último tem uma coloração uniforme, mas só ira ficar com coloração branca ao iniciar a expansão do crescimento.

O cogumelo amarelo (*L. birnbaumii*) se apresenta de dois tipos, o comum (LB- Figura 18B) e o novo tipo amarelo (NTA-Figura C), os quais produzem basidiomas na superfície do substrato, mas nos furos para drenagem dos sacos plásticos da muda (Figuras 18 F e G, respectivamente) e até mesmo na parte inferior (Figura 18N). As bancadas que contém as mudas estão a 40 cm do chão e o aspecto sob elas é de um grande número de cogumelos pendurados

(Figura 18N), lembrando pequenos guarda-chuvas, sendo que, quando não se realizam coletas periódicas muitos deles tornam-se secos em poucos dias.

Figura 18 - Aspecto dos principais cogumelos do gênero *Leucocoprinus* observados em mudas e nos viveiros cítricos. A) Cogumelos brancos (*L. brebissonii*); Cogumelos amarelos (*L. birnbaumii*) B, F e I) comum (tipo LB) e C, G, J, L, M e N) o novo tipo amarelo (tipo NTA); D e H) aspecto da impermeabilização do substrato e aspecto micelial em muda com substrato a base de casca de pinus; E, F, G e I) início de formação dos basidiomas na superfície do substrato da muda e pelos furos para drenagem do saco plástico; H) aspecto em tubetes com fibra de coco e N) aspecto por baixo da bancada M) do micélio do tipo NTA e N) dos píleos abertos

Na superfície das mudas podem ser formados poucos corpos de frutificação ou pode ser formada uma grande quantidade (Figuras 18J e 18K), tanto aglomerados (estipes individuais) como cespitosos (estipes unidos pela base), sendo comum um elevado número de primórdios dos basidiomas que podem levar à formação de um grande número de cogumelos, parecendo um pequeno manto (Figura 18I).

A emergência dos cogumelos ocorre por fluxos e está bastante associado às condições ambientais, iniciando na primavera até metade do outono, no inverno dificilmente são observados mesmo em lotes altamente contaminados, reaparecendo quando aumenta a temperatura. Os corpos de frutificação possuem tecidos moles, com apodrecimento rápido, de cor creme para amarelo, produzindo micélio de igual cor, formando uma malha no substrato, que confere o ressecamento, aparentando uma camurça no tipo NTA (Figura 18M), o qual possui uma maior capacidade de colonização do substrato.

A principal característica nas mudas, além da presença dos cogumelos, é tornarem-se mais leves e mesmo com irrigação não recuperam o peso normal, pela água não ficar retida no substrato. Ao retirar o plástico destas mudas, observam-se áreas ressecadas com áreas úmidas (Figura 18D), e a produção de pequenas estruturas ocorre em menor quantidade nas áreas mais secas. Estas áreas mais secas são hidrofóbicas e perdem parcialmente a capacidade de reter água. Esta indisponibilidade afeta as raízes da planta, o qual explica o seu não desenvolvimento quando levada ao campo. Esta característica vem sendo associada quando presente o cogumelo amarelo (*L. birnbaumii*), mas não o branco (*L. brebissonii*).

Na fábrica de produção de substrato a base de casca de pínus, o cogumelo amarelo foi observado em cascas intactas, em substratos prontos e velhos, sendo mais raro ser observados os cogumelos nas pilhas propriamente ditas, mas normalmente são encontrados em restos de substratos ao redor das mesmas ou em acúmulos de restos da fábrica. Na fibra de coco, apesar de passar por um processo que deveria torna-lo isento do problema, foram encontrados em mudas e porta-enxertos (Figura 18H), e mesmo nas embalagens (BAG's) não abertas, mas que apresentavam furos.

Nos viveiros comerciais, a ocorrência do cogumelo amarelo foi independente do porta-enxerto, sendo observado em mudas em porta-enxertos de limão Cravo, tangerina Cleópatra, citrumelo Swingle e trifoliata. No caso da copa, também foi observada em laranja como Folha murcha, Natal, Pêra e Valência; em tangerinas como Ponkan e na lima ácida Tahiti. Sendo um

problema associado ao substrato e não ao porta-enxerto, ou copa ou interação copa e porta-enxerto na muda cítrica.

O corpo de frutificação inicia a sua diferenciação visual de três mm podendo alcançar até atingir aproximadamente 100 mm (Figura 19A), formando um píleo (“chapéu”) com haste, com anel, e ao expandir é do tipo “guarda-sol”, expondo lamelas radiais (Figura 18L). Nas lamelas encontram-se basídios típicos, geralmente com quatro basidiósporos ou esterígmias (Figura 19B-E). Nas medições usando o microscópio ótico, os basidiósporos são hialinos, sem septos, lisos (Seção leucóspora), com a presença de um bico em uma das extremidades, com média de 9,1 μm de comprimento e 6,0 μm de diâmetro (Tabela 3 e Figura 19E), sendo estimada a produção de 2,5 a 3,0 x 10⁶ esporos por cm² de lâmina (himênio fértil). As colônias isoladas são brancas para creme, com crescimento lento (Figura 21).

Tabela 3 - Dimensões de basidiósporos de *Leucocoprinus birnbaumii* de cogumelos obtidas no substrato de mudas de citros, produzidas em ambiente protegido, em microscópio ótico

	Diâmetro (μm)	Comprim. (μm)	Relação d/c	sem bico (μm)	Bico (μm)	Relação dsb/c
máximo	7,32	10,70	0,75	10,42	1,41	0,83
mínimo	5,35	7,89	0,59	7,32	0,00	0,63
média	6,01	9,11	0,66	8,39	0,72	0,72
desvio	0,60	0,74	0,05	0,77	0,37	0,05

As diferentes fases do desenvolvimento do cogumelo amarelo podem ser vistas na Figura 19. Ao observar o material com o microscópio eletrônico de varredura (MEV) somente houve formação de basidiósporos quando não ocorreu a expansão do píleo Figura (20A-G). Nesta fase pode ser observada a formação inicial dos esterígmias, por onde passarão os núcleos que irão formar os basidiósporos (Figura 20G). Presença de cistídios nas extremidades das lamelas, pela sua posição são denominados de queilocistídios, de formato ligeiramente filiforme (Figura 20C). Após a expansão há uma grande produção de esporos, tendo predominância de quatro por basídio (Figuras 20H-J), os quais apresentam superfície lisa, com 6,8 a 8,4 μm de comprimento e de 5,6 a 5,8 μm de largura. Estas dimensões sendo um pouco inferiores às obtidas pela medição na microscopia ótica para os basidiósporos.

Figura 19 - Diferentes fases do desenvolvimento de corpos de frutificação de *Leucocoprinus birnbaumii* (A) e observação de basídios e basidiósporos (B, C, D e E) em microscopia ótica. Barra representa escala de 4 cm

Os basidiósporos apresentam um apêndice que representa o local por onde estava ligado ao esterígmas, este podendo ser terminal ou ligeiramente lateral (Figura 20). Algumas vezes, a subida dos núcleos e a formação dos basidiósporos não ocorrem simultaneamente, podendo ser observados sobre o basídio, esporos maduros e alguns em formação, observado pelas pontas dos esterígmas bem dilatadas, demonstrando que está em processo de formação do basidiósporo (Figura 20H-I).

A liberação de basidiósporos somente ocorre após a abertura do píleo ou “chapéu”. Após a maturação dos basidiósporos e liberação dos mesmos, os basídios perdem turgescência e apresentam-se enrugados (Figura 20J). Os basidiósporos germinam formando tubos germinativos, mesmo na massa de esporos, o que evidencia não haver inibidores de germinação, como ocorre em outros gêneros de fungos.

Figura 20 – Estruturas de *Leucocoprinus birnbaumii* antes e após a abertura do píleo (“chapéu”). A) Basidioma expondo as lamelas; B-G) píleo fechado e H-J) aberto; B) Aspecto geral da lamela; C) Visualização do queilocistidio e D) do basidiolo; E) aspecto geral do himênio antes da formação dos basidiósporos; F) Vista lateral do início de formação dos basidiolos; G) Início de formação do basidiósporo; H) Basídios com basidiósporos e esterigmas; I) Formação não sincronizada dos basidiósporos e J) Basídio após liberação dos basidiósporos, perdendo turgescência

Os cogumelos mais frequentemente observados sobre substratos de casca de pínus foram identificados pelas características morfológicas como *Leucocoprinus birnbaumii* (Fr.) Nf. (sinonimia de *Lepiota lutea* (Bolt.) Locq) para o cogumelo amarelo e *L. brebissonii* (Godey) Locq. para o cogumelo branco.

O isolamento de *L. brebissonii* é mais difícil devido ao menor diâmetro do estipe do que *L. birnbaumii*, tendo menor quantidade de tecido firme para fazer o isolamento. O transporte deve ser rápido pela facilidade da degradação dos tecidos, principalmente em dias de altas temperaturas, o qual foi mais adequado em caixas de isopor com suportes de gelo. Não cortar o estipe nem usar hipoclorito na desinfecção superficial, devido à sensibilidade ao produto e os tecidos internos absorver os desinfetantes, levando à morte do micélio e não se conseguir o isolamento. A lavagem dos estipes e desinfecção com álcool é suficiente para realizar o isolamento do micélio interno. Para isolamento de colônias monospóricas, a viabilidade dos basidiósporos é alta após a abertura do píleo e conseguindo-se colônias isoladas na diluição 10^{-4} a 10^{-5} .

No meio de cultura, *L. birnbaumii* possui crescimento uniforme, sendo de cor creme para amarelo (Figura 21A), ocorrendo formação de estruturas menores de 1 mm sobre a superfície do meio de cultura (Figuras 21B e 22A-B), as quais se distribuem na superfície das colônias de forma homogênea, em faixas ou agrupados. Estas estruturas são primórdios dos basidiomas, mas encontram-se sem algum estímulo para iniciar o desenvolvimento, entretanto houve diferenciação e formação dos cogumelos *in vitro* em meio de cultura (Figura 22B) e em substrato (Figura 22C) quando deixados na temperatura da sala, podendo estar relacionada à indução de formação dos corpos de frutificação com a oscilação de temperatura. As colônias de *L. brebissonii* possuem crescimento mais lento que *L. birnbaumii*, com colônias brancas e em alguns isolados apresentam primórdios recobertos por hifas brancas, mas que tornam-se de cor amarronzada com o processo de formação.

Na microscopia eletrônica de varredura, as hifas de *L. birnbaumii* possuem diâmetro de 1,7 a 2,1 μm , nem sempre observamos presença de fíbulas (Figuras 22D), mas apresentam uma espessura de 3,0 μm na região que ocorrem e uma extensão de 2,1 μm (Figuras 22E). Os primórdios formados não apresentam hifas soltas na superfície (Figura 22A), diferentes das estruturas menores (figura 22B), o seu interior apresentam-se oco com uma camada espessa da parede (Figura 22D-E), sendo que próximo da superfície há uma faixa de cimentação das hifas com uma espessura de 5,9 a 7,1 μm (Figura 22F).

Figura 21 - Aspectos da colônia de *Leucocoprinus birnbaumii* em meio de cultura cenoura-água, formação de cogumelos *in vitro* e em substrato, e visualização das hifas por microscopia eletrônica de varredura. A) Colônia em meio cenoura-água; B) Formação de basidiomas em meio de cultura e C) em substrato, após exposição à temperatura da sala. D) Visualização das hifas e E) presença de fibulas ou grampos-de-conexão. Escalas de D) 20 µm e E) 10 µm

Figura 22 - Primórdios de corpos de frutificação (CF) de *Leucocoprinus birnbaumii* em meio de cultura A) Aspecto geral e agregado dos primórdios; B) Enovelamento de hifas nas estruturas em formação; C) corte do primórdio do CF mostrando a região central oca e D) da parede espessa; E) estrutura da parede e F) da região próxima da superfície. Escalas de 1mm (A); 100µm (B-D); 20 µm (E) e 10 µm (F)

Na identificação molecular, para o isolado do cogumelo branco foi obtida uma sequência consenso de 624 nucleotídeos, no BLASTn apresentou uma identidade de 95% e uma cobertura de 98% com *Leucocoprinus brebissonii* (AF482859), enquanto que outras espécies de *Leucocoprinus* (como *L. birnbaumii*, *L. cf. zamurensis*, *L. cf. fragilissimus*) e *Leucoagaricus* (*L. fragilissimus*, *L. nymphaeum*, *L. naucinus* e *L. leucothites*) apresentavam de 84 a 86% de identidade e uma cobertura de 97 a 99% com e-value igual a zero. Além dos gêneros *Apterostigma* (AF079673, 85 e 98%), *Trachymyrmex* (AF079754, 84 e 98%), *Mycetarotes* (AF079725, 83 e 98%), *Mycocephalus* (AF079704, 83 e 98%), *Myrmicocrypta* (AF079720, 91 e 71%), *Cyphomyrmex* (AF079677, 91 e 71%), e *Chamaeota* (DQ182505, 90 e 71%) com e-value de $4e^{-168}$ até zero. A sequência mais próxima ao BR-MAP foi de um Lepiotaceo não identificado com 98% de identidade originada do Estado do Pará, no Brasil, provavelmente devendo-se tratar de *L. brebissonii* (Figura 23).

Para o isolado do cogumelo amarelo foi obtida uma sequência consenso de 640 nucleotídeos, no BLASTn apresentou uma identidade de 96 a 98% e uma cobertura de 99 a 100% com *Leucocoprinus birnbaumii* (AY534115 e U85323), enquanto que somente com cinco sequências de outras espécies de *Leucocoprinus*, além dos gêneros *Lepiota* (82 a 83% e de 95 a 99%), 25 sequências do gênero *Leucoagaricus*, 7 sequências de *Leucocoprinus*; *Trachymyrmex* (AF079754, 84 e 98%), 1 de *Mycetarotes* (AF079725, 83 e 98%), *Mycocephalus* (AF079704, 83 e 98%), 6 sequências de *Myrmicocrypta*, e *Chamaeota* (DQ182505, 87 e 97%). Havia 49 sequências de Lepiotaceos.

Ao construir a árvore filogenética das espécies de *Leucocoprinus* e de algumas espécies de gêneros próximos (Figura 23) este gênero se apresenta como polifilético, estando *L. birnbaumii* e *L. brebissonii* em clados separados.

Para detectar locais prováveis de futuros problemas com o cogumelo amarelo, houve uma coincidência de o diagnóstico de isca, usado para a detecção de *Phytophthora*, há a formação de primórdios e até início de desenvolvimento sobre a superfície da água após os 7 dias de incubação sobre luz constante (Figura 24), pelo qual este mesmo teste pode ser usado para o monitoramento destes dois problemas dos viveiros de mudas cítricas.

Figura 23 - Relação filogenética das espécies de *Leucocoprinus* associados à mudas cítricas (Limeira e BR-MAP) em relação a outros gêneros de agaricales inferida pela análise das seqüências da região ITS do rDNA por máxima verossimilhança.

Figura 24 - Desenvolvimento de primórdios de corpos de frutificação de *Leucocoprinus birnbaumii* nos testes de isca para detecção de *Phytophthora*

O gênero *Leucocoprinus* é considerado um decompositor secundário, isto é, a maioria das espécies cresce em matéria orgânica residual, após a ação de bactérias e fungos decompositores primários, excetuando-se *L. birnbaumii*, *L. citrinellus* e *L. rivulosus*, que são encontrados em madeira em decomposição, sendo também lignícolas facultativos por serem encontrados em substrato húmico e sendo ainda encontrados em estufas e vasos (ALBUQUERQUE; VICTORIA; PEREIRA, 2006). Este gênero pertence à família Agaricaceae possuindo 40 espécies, sendo muitas tropicais e ocorrendo em casa-de-vegetação em regiões temperadas (KIRK et al., 2001).

A mudança de manejo de solo por substratos orgânicos trouxe várias características benéficas para a citricultura, entretanto, temos a convivência com um novo problema que é o cogumelo amarelo (*L. birnbaumii*), o qual afeta os principais substratos, sejam à base de casca de pínus ou fibra de coco. Uma medida de controle para evitar o aumento do potencial de inóculo, quebrando o ciclo e consequentemente o dano, é a coleta dos cogumelos amarelos antes da sua abertura, visto que, mesmo quando iniciando a abertura do píleo, ainda não foram formados os basidiósporos (Figura 20).

Nas fábricas de substrato, a contaminação primária chega pela matéria prima, isto é da própria casca de pínus, onde os basidiomicetos são importantes como decompositores e na reciclagem de nutrientes nas florestas naturais ou reflorestadas. Entretanto, a contaminação mais importante é a ocorrência de cogumelos amarelos abertos próximos das pilhas prontas ou do local de embalagem ou carregamento, porque seria a condição apropriada para o crescimento, ao ponto que estes substratos também são usados para a produção de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). O monitoramento e eliminação de substratos contaminados e de cogumelos amarelos antes da abertura do píleo são essenciais para diminuir a contaminação dos lotes de substrato antes de chegarem aos viveiros. A limpeza da área, não deixando restos de substrato antigo, é

essencial para não servir de focos para os próximos lotes, senão torna-se um processo cíclico e de difícil controle. Mesmo no caso da fibra de coco o importante é evitar a contaminação antes do seu uso, sendo importante manter em locais bem limpos e longe das estufas contaminadas, principalmente durante a fase de abertura dos cogumelos.

Nos viveiros, como quase não são observados a partir de maio os produtores não realizam medidas de controle, mas é nesse período que o fungo continua colonizando o substrato, sem ser evidenciado pela falta de formação dos cogumelos. Quando ocorre a primeira emergência dos corpos de frutificação as mudas já estão afetadas tendo um menor peso e a impermeabilização do substrato já aconteceu. Entretanto a impermeabilização, associado ao menor peso pela menor retenção de umidade, não ocorre igualmente nos viveiros, pelo qual ela é dependente do manejo.

O controle químico nem sempre está sendo eficiente e difícil de confirmar devido à dificuldade de determinar lotes contaminados, heterogeneidade e ocorrência de resistência. O monitoramento da ocorrência de lotes e bancadas pode ser realizado pelo método da isca, determinando as bancadas que poderão ter problema e a determinação de lotes de substratos muito contaminados.

2.3.8 Meios de cultura

2.3.8.1 Composição complexa

Ao avaliar a influência dos diferentes meios de cultura no crescimento de diferentes isolados de *L. birnbaumii*, com crescimento prévio em um único meio, demonstrou diferenças significativas na taxa de crescimento (Tabela 4) e na fase lag (Tabela 5).

Na taxa de crescimento houve diferenças significativas entre os diferentes isolados dicarióticos de *L. birnbaumii*, mesmo entre fábrica de substrato (LbiF1A e LbiF1B) e viveiro (LbiV1A, LbiV1B) e dentro deles (Tabela 4). De forma geral os isolados apresentaram a seguinte ordem decrescente de taxa de crescimento nos meios de cultura: LbiF1A, LbiV1A, LbiV1B e LbiF1B. O meio de cultura que melhor discriminou significativamente a taxa de crescimento entre os diferentes isolados foi o V8-CaCO₃, diferenciando todos; enquanto que o meio completo e o meio malte somente discriminaram dois grupos, um de crescimento lento e o outro rápido. O meio cenoura-água diferenciou os de crescimento lento e o meio aveia-água os de crescimento rápido. O meio BDA foi o único que inverteu significativamente o comportamento dos isolados do viveiro.

Tabela 4 - Influência do meio de cultura sobre a taxa de crescimento de diferentes isolados de *Leucocoprinus birnbaumii*, originados de estipes de cogumelos de diferentes procedências e do mesmo local, a 28°C, plaqueados previamente em meio cenoura-água

Taxa crescimento (cm/dia)														
Isolados	AA		BDA		CA		MC		MA		V8		média	
LbiF1A	0,83	Aa	0,69	Ab	0,70	Ab	0,51	Ac	0,56	Ac	0,58	Bc	0,64	Aa
LbiV1A	0,65	Bab	0,66	Ba	0,71	Aa	0,47	Ac	0,58	Ab	0,67	Aa	0,62	Aa
LbiV1B	0,40	Cab	0,45	Aab	0,47	Ba	0,38	Bb	0,44	Bab	0,43	Cab	0,43	Bb
LbiF1B	0,34	Ca	0,40	Ba	0,33	Ca	0,36	Ba	0,39	Ba	0,33	Da	0,36	Cb
Média	0,56	a	0,55	a	0,55	a	0,43	c	0,50	b	0,50	b	0,51	a

Médias com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%). Maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha. CV(%)=5,84.

Os meios de cultura formaram três grupos significativos: um de melhor crescimento (AA, BDA e CA); outro de crescimento intermediário (V8 e MA) e um de crescimento lento (MC). As respostas entre os isolados foram bem diferentes aos meios de cultura. Para o LbiF1B não houve diferença entre os meios. Para o LbiF1A houve quatro grupos de crescimento, diferenciando-se pelo meio AA ter sido significativamente o melhor. Para o LbiV1A foi decrescentemente CA, V8, BDA, AA, MA e MC, enquanto que para o LbiV1B foi CA, BDA, V8, MA, AA e MC. O meio CA teve o mesmo comportamento geral dos diferentes isolados nos outros meios de cultura.

No caso da fase lag houve diferenças significativas entre os isolados (Tabela 5), mas não diferenciou os isolados de viveiros, apresentando a seguinte ordem decrescente: LbiF1A, LbiV1B, LbiV1A e LbiF1B. Os meios de cultura que não tiveram diferenças significativas da fase lag entre os isolados foram o meio CA, MC e MA. O meio BDA formou dois grupos, o LbiV1A com 13 horas dos outros com média de 27 horas. O meio aveia-água formou três grupos, mas não diferenciou os isolados do viveiro. O V8 teve diferenças estatísticas, mas não conseguiu separar nenhum dos isolados.

Tabela 5 - Influência do meio de cultura sobre a fase lag de diferentes isolados de *Leucocoprinus birnbaumii*, originados de estipes de cogumelos de diferentes procedências e do mesmo local, a 28°C, plaqueados previamente em meio cenoura-água

Isolados	Fase lag (horas)												média	
	AA		BDA		CA		MC		MA		V8			
LbiF1A	39,2	Aa	27,4	Aab	13,0	Ad	18,8	Acd	22,8	Abcd	30,8	Aab	25,3	A
LbiV1B	17,5	Bab	29,1	Aa	10,9	Ac	20,4	Aabc	27,9	Aab	22,3	ABab	21,4	B
LbiV1A	21,3	Bb	13,2	Bb	17,6	Aab	16,0	Aab	24,2	Aa	18,9	BCab	18,5	BC
LbiF1B	3,0	Cc	25,0	Aa	10,3	Abc	17,7	Aab	23,4	Aa	10,8	Cbc	15,0	C
Média	20,2	ab	23,7	a	13,0	c	18,2	bc	24,6	a	20,7	ab	20.06	

Médias com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%). Maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha. CV(%)= 21.8%

Os meios de cultura apresentaram a seguinte ordem crescente da fase lag: CA, MC, AA, V8, BDA e MA. As respostas entre os isolados foram bem diferentes aos meios de cultura, mas não houve formação de nenhum grupo significativo. Entretanto o LbiF1A teve as maiores diferenças da fase lag nos diferentes meios. O meio CA teve a menor fase lag, o qual era esperado porque as colônias já estavam adaptadas para seu crescimento prévio nele.

Ao avaliar a influência dos diferentes meios de cultura para o crescimento de diferentes isolados de *L. birnbaumii*, com crescimento prévio no mesmo meio, demonstrou de forma geral diferenças significativas na taxa de crescimento (Tabela 6), mas não na fase lag (Tabela 7).

Na taxa de crescimento houve diferenças significativas entre os diferentes isolados dicarióticos de *L. birnbaumii*, mesmo entre fábrica de substrato (LbiF1A e LbiF1B) e viveiro (LbiV1A, LbiV1B) e dentro deles. De forma geral os isolados apresentaram a seguinte ordem decrescente de taxa de crescimento nos meios de cultura: LbiF1A, LbiV1A, LbiV1B e LbiF1B. Esta diferenciação foi igual à obtida quando foi realizado o crescimento prévio em meio cenoura-água. Os meios de cultura que melhor discriminaram significativamente a taxa de crescimento entre os diferentes isolados foi o BDA e o MA, diferenciando todos; enquanto que o meio completo discriminou dois grupos, um de crescimento lento e o outro rápido. O meio cenoura-água diferenciou os de crescimento rápido e o meio aveia-água e o V8 os de crescimento lento.

Tabela 6 - Influência do meio de cultura sobre a taxa de crescimento de diferentes isolados de *Leucocoprinus birnbaumii*, originados de estipes de cogumelos de diferentes procedências e do mesmo local, a 28°C, plaqueados previamente no mesmo meio de cultura

Taxa crescimento (cm/dia)													
Isolados	AA		BDA		CA		MC		MA		V8		média
LbiF1A	0,60	Ab	0,63	Ab	0,72	Aa	0,49	Ac	0,52	Bc	0,61	Ab	0,60
LbiV1A	0,66	Aa	0,55	Bb	0,63	Bab	0,44	Ac	0,59	Aab	0,65	Aa	0,59
LbiV1B	0,36	Bbc	0,39	Cb	0,48	Ca	0,30	Bc	0,37	Cbc	0,42	Bab	0,39
LbiF1B	0,28	Cbc	0,30	Dbc	0,41	Ca	0,36	Bab	0,25	Dc	0,26	Cc	0,31
Média	0,48	B	0,47	bc	0,56	a	0,40	d	0,43	cd	0,49	b	0,47

Médias com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%). Maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha. CV(%)= 9,4 %

Os meios de cultura formaram três grupos significativos: um de melhor crescimento (meios AA, BDA e CA); outro de crescimento intermediário (Meios V8 e MA) e um de crescimento lento (MC). As respostas entre os isolados foram bem diferentes aos meios de cultura. Para o LbiF1B não houve diferença entre os meios. Para o LbiF1A houve quatro grupos de crescimento, diferenciando-se pelo meio AA ter sido significativamente o melhor. Para o LbiV1A foi decrescentemente CA, V8, BDA, AA, MA e MC, enquanto que para o LbiV1B foi

CA, BDA, V8, MA, AA e MC. O meio CA teve o mesmo comportamento geral dos diferentes isolados nos outros meios de cultura.

No caso da fase lag não houve diferenças significativas entre os isolados em cada meio de cultura, o qual era esperado, porque eles haviam crescido previamente nos meios que iriam crescer.

Tabela 7 - Influência do meio de cultura sobre a fase lag de diferentes isolados de *Leucocoprinus birnbaumii*, originados de estipes de cogumelos de diferentes procedências e do mesmo local, a 28°C, plaqueados previamente no mesmo meio de cultura

Isolados	Fase lag (horas)												
	AA		BDA		CA		MC		MA		V8		média
LbF1B	25,2	Aab	29,9	Aa	12,5	Abcd	18,0	Aabc	5,9	Bcd	0,6	Bd	15,3 A
LbV1A	19,6	Aa	16,5	ABa	8,9	Aab	-7,8	Bb	24,4	Aa	18,3	Aa	13,3 A
LbV1B	21,8	Aa	18,0	ABa	11,9	Aa	9,2	Aa	6,8	Ba	7,6	ABa	12,6 A
LbF1A	15,3	Aa	6,6	Bab	10,4	Aa	-7,5	Bb	15,7	ABa	22,2	Aa	10,5 A
Média	20,5	a	17,8	ab	10,9	bc	3,0	c	13,2	ab	12,2	ab	12.9

Médias com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%). Maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha. CV(%)= 14,4 %

Para os componentes do crescimento das colônias de diferentes isolados de *L. birnbaumii* as respostas são variáveis, sendo isolado dependente. Na fase lag há uma menor precisão experimental, tendo sempre coeficientes de variação superiores ao estimados para a taxa de crescimento, além de maior dependência do meio de cultura onde for realizado o crescimento prévio. O meio CA apresentou taxas de crescimento mais estáveis entre os dois experimentos, sendo que as colônias não apresentam limitações de crescimento pelo qual foi usado na manutenção e como referência nos experimentos posteriores. Estes resultados demonstram a alta variabilidade existente nesta espécie fúngica, que pode ser expressa na sua capacidade metabólica, na sua adaptação aos substratos, compostos xenobióticos ou estresses ambientais.

2.3.8.2 Composição definida

Houve necessidade de selecionar um meio de cultura de composição definido para determinar os requerimentos nutricionais como estudos de fisiologia de *L. birnbaumii* (Tabela 8 e Figura 25). Ao comparar os meios Czapeck e Mínimo em relação a outros foi observado que o Czapeck teve a mesma taxa de crescimento do que o meio CA, o mínimo teve uma menor taxa de crescimento, mas superior ao do meio completo de Pontecorvo. A fase lag foi diminuindo na seguinte ordem: Mínimo, Czapeck, CA e completo de Pontecorvo. O meio Czapeck pode ser usado para os estudos de fisiologia de *L. birnbaumii*, tendo um crescimento satisfatório, apesar de não possuir nenhuma fonte de cálcio, o que reforça que o cálcio é um micronutriente para esta espécie.

Tabela 8 - Influência dos meios de cultura sobre a taxa de crescimento e a fase lag de *Leucocoprinus birnbaumii*, mantidos a 28°C

Meios de cultura	Taxa de crescimento		fase lag
	(cm/dia)		(dias)
Cenoura-ágar	0,58	A	0,59
Czapeck	0,56	A	0,92
Mínimo	0,48	AB	1,44
Completo de Pontecorvo	0,36	B	-0,51
Média	0,50		0,61

Médias com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

O crescimento no meio Czapeck também demonstra que não há um requerimento de suplementação com vitaminas para *L. birnbaumii*.

Figura 25 – Curvas de crescimento de *Leucocoprinus birnbaumii* em diferentes meios de cultura a 28°C

2.3.8.3 Espécies de macrofungos

Ao comparar os macrofungos quanto ao seu crescimento nos meios de cultura, o meio CA e o BDA tiveram a mesma capacidade de diferenciar os fungos (Tabela 9). Assim, decrescentemente foram: falsa-trufa, *Gymnopilus dilepis* (Roxo), *L. birnbaumii* (NTA-MAP), *L. brebissonii* (BR-MAP), *L. birnbaumii* (LB-MAP).

De forma geral, não houve diferenças entre o meio BDA e CA, mas entre os isolados teve diferenças significativas, com exceção da falsa-trufa. Os isolados de *L. birnbaumii* possuem variabilidade detectada no seu crescimento em meios de cultura diferentes, para os diferentes grupos morfológicos (LB e NTA), o que já havia sido detectado no experimento anterior com a comparação de isolados do mesmo grupo morfológico (LB) de *L. birnbaumii*.

Tabela 9 - Influência dos meios de cultura sobre a taxa de crescimento de colônias de macrofungos, isolados de viveiros comerciais de mudas cítricas, mantidos a 28°C

Macrofungos	Taxa de crescimento (cm/dia)					
	BDA		CA		Média	
Falsa Trufa	1.26	Aa	1.23	Aa	1.25	A
Roxo	0.76	Bb	0.85	Ba	0.81	B
NTA	0.63	Ca	0.51	Cb	0.57	C
BR	0.37	Da	0.32	Db	0.35	D
LB	0.20	Eb	0.26	Ea	0.23	E
Média	0.64	a	0.63	a		

Médias com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%). Maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha. CV(%) = 3,69%

2.3.8.4 Culturas monocarióticas e dicarióticas

A diferença no crescimento entre isolados dicarióticos levou ao questionamento sobre como se comportariam os isolados monocarióticos em relação ao dicariótico que os deu origem. Para tanto, realizou-se um novo experimento avaliando esta situação para *L. birnbaumii*. O crescimento médio em diâmetro das colônias sempre foi superior para o SN04 (dicariótico) e, entre os homocarióticos (SN04M0X), houve diferenças significativas entre eles (Tabela 10), alguns tendo crescimento estatisticamente igual ao SN04.

Não houve interação significativa entre isolados e tempos de avaliação do crescimento, sugerindo-se assim que para diferenciação entre os isolados pode ser utilizado simplesmente um único tempo de avaliação, enquanto as colônias não atinjam 1 cm da borda das placas, situação esta onde a taxa de crescimento começa a diminuir pela limitação de nutrientes. Ao avaliar a porcentagem, vemos que o comportamento foi muito homogêneo nos dois períodos avaliados, permitindo assim uma melhor compreensão do nível de resposta e comparações com períodos diferentes.

Um maior número de isolados monospóricos e o seu dicário original necessitam serem avaliados assim como as diferenças culturais, morfológicas e genéticas para melhor compreensão dessa menor capacidade de crescimento das colônias monospóricas. Também, avaliar a vantagem do micélio heterocariótico em relação ao monocariótico, na sobrevivência ou capacidade adaptativa de *L. birnbaumii*.

Tabela 10 - Diâmetro médio das colônias em meio cenoura-ágar, aos 6 e 9 dias, taxa de crescimento e fase lag de isolados originados de basidiósporos e do estipe de um cogumelo de *Leucocoprinus birnbaumii*, a 28°C

	6 dias (cm)	9 dias (cm)	Média (cm)	Taxa de crescimento (cm/dia)	Fase lag (dias)
SN04	3,99	6,05	5,02 A	0,69 A	1,35
SN04M5	3,80	5,81	4,81 A	0,67 A	1,53
SN04M4	3,40	5,20	4,30 AB	0,60 AB	1,67
SN04M2	3,24	4,60	3,92 B	0,45 BC	0,28
SN04M3	2,29	3,49	2,89 C	0,40 BC	2,14
SN04M1	2,04	2,86	2,45 C	0,28 C	0,85
Média	3,13 b	4,67 a		0,54	1,30

* Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste Tukey (5%), maiúsculas em coluna e minúsculas na linha.

Ecologicamente é importante avaliar, se isto ocorre em outros cogumelos do mesmo ou diferentes distantes de origem, de maior crescimento de heterocarióticos e se estas diferenças dependem da combinação de núcleos, visto que o crescimento dos monospóricos foram 96%, 86%, 79%, 58% e 49% respectivamente para o SN04M5, SN04M4, SN04M2, SN04M3 e SN04M1 (Figura 26).

Ao transformar os dados em porcentagem em relação ao SN04, não houve diferença entre as épocas de avaliação, nem interação (Figura 26). Duvidas surgiram como: Será que a distribuição do crescimento é continua entre os isolados, possuindo uma distribuição normal e também no genoma? Para isto, o mapeamento e o uso de uma população maior de monospóricos seriam necessários.

Figura 26 - Crescimento relativo dos isolados monocarióticos e dicarióticos de *Leucocoprinus birnbaumii* em meio cenoura-água, aos 6 e 9 dias

2.3.8.5 Populações de *Leucocoprinus*

Ao avaliar as populações de *L. birnbaumii* (LB-MAP e NTA-MAP) e *L. brebissonii* (BR-MAP), nota-se que possuem comportamentos diferentes que dependem da constituição genética de cada núcleo que irá formar o cogumelo (Figura 27), havendo segregação para as colônias resultantes dos basidiósporos.

Como há grandes diferenças no crescimento dos isolados monospóricos, sugere-se que os núcleos dos heterocários possuam grandes diferenças genéticas. Esta maior variabilidade pode ocorrer ao limitar as formações de anastomoses entre indivíduos semelhantes, ou ainda, ocorrem grupos de compatibilidade, que inicialmente deve restringir a variabilidade, a qual deve ser avaliada.

No caso da população de LB-MAP, o crescimento das colônias teve uma distribuição ligeiramente bimodal à semelhança da população de BR-MAP (*L. brebissonii*), o que leva a supor que possam existir dois genes principais com efeitos similares na taxa de crescimento, mas não se consegue separar as duas populações adequadamente somente pela distribuição de frequências.

A

B

C

Figura 27 - Frequência do tamanho das colônias de populações de culturas monospóricas de *Leucocoprinus birnbaumii* (LB-MAP e NTA-MAP) e de *L. brebissonii* (BR-MAP) em meio cenoura-ágar, a 28°C. A) *L. birnbaumii* tipo LB e B) tipo NTA e C) *L. brebissonii*

Na população de NTA-MAP (*L. birnbaumii*) houve uma distribuição bimodal, que leva a supor que possam existir dois genes principais para o crescimento, principalmente porque houve uma relação de 3:1 entre o número de monospóricos de taxa de crescimento lento comparado com os de crescimento rápido.

A grande variabilidade detectada permite sugerir a realização de um mapeamento genético de apenas único cogumelo, principalmente o NTA-MAP, desde que poderiam ser localizados, dentro de um grupo de ligação, os genes de efeitos principais relacionados ao crescimento em meio de cultura, além de poder localizar as diferentes características culturais observadas em associação com marcadores moleculares.

2.3.8.6 Influência do pH

As curvas de crescimento baseadas no diâmetro das colônias de *L. birnbaumii* (Figura 28) foram muito similares no intervalo de pH de 4,5 a 8,0. Entretanto houve diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos do pH na taxa de crescimento e duração da fase lag (Tabela 11), sendo que houve uma correlação entre eles de 0,564.

Figura 28 - Influência do pH no crescimento em diâmetro de colônias de *Leucocoprinus birnbaumii*, a 28°C, em meio cenoura-água

Tabela 11 – Influência do pH na taxa de crescimento e fase lag de *Leucocoprinus birnbaumii* em meio cenoura-ágar (CA), a 28°C

pH	taxa de crescimento (cm/dia)	fase lag (dias)
4,5	0,74 AB	1,36 BC
5,0	0,78 AB	1,87 A
5,5	0,77 AB	1,69 AB
6,0	0,74 AB	1,46 ABC
6,5	0,80 A	1,56 ABC
7,0	0,72 B	1,25 BC
7,5	0,71 B	1,21 C
8,0	0,71 B	1,29 BC
Média	0,75	1,46
CV(%)	3,73	11,27

Médias com letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (5%).

O pH do meio de cultura não foi restritivo ao crescimento e, assim, não há necessidade do seu ajuste no meio cenoura-ágar (CA) desde que normalmente o pH se encontra entre 6,2 e 6,3, para uso na conservação, isolamento e manutenção de *L. birnbaumii*.

2.3.8.7 Fontes de Carbono

A disponibilidade de carboidratos assimiláveis é essencial ao crescimento dos fungos, mas a capacidade de uso das diferentes fontes é dependente do metabolismo de cada espécie fúngica, podendo ocorrer diferenças intra-específicas mesmo ao nível de população ou de indivíduos.

A resposta de *L. birnbaumii* a diferentes fontes de carbono (FC) foi estimada pela taxa de crescimento das colônias (Tabela 12). De forma geral, a suplementação de glicose não teve efeito significativo na diferenciação da utilização de fontes de carbono, com exceção da sacarose e do ágar-água (sem sais nem fonte de carbono). Na sacarose, a glicose aumentou significativamente a taxa de crescimento, provavelmente facilitando a produção da invertase e tendo assim um efeito sinérgico. No ágar-água, a glicose diminuiu o crescimento da colônia, o micélio se mostrou ligeiramente mais denso e não houve produção de primórdios de corpos de frutificação (CF).

A adição de sais (Czapeck sem FC) tornou o micélio mais visível, lembrando rizomorfos, mas não teve crescimento contínuo nem denso e houve produção de primórdios de corpos de frutificação. Os sais são importantes mesmo com disponibilidade de fontes de carbono, devendo ser limitante para uma eficiente translocação de carboidratos no micélio, o que reforça a necessidade de estudos da influência dos nutrientes em *L. birnbaumii* e na impermeabilização das mudas, principalmente para o efeito do nitrogênio (N), o fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), enxofre (S) e magnésio (Mg). Neste experimento, os micronutrientes devem ter tido uma menor influência, porque na composição do meio Czapeck só é adicionado ferro (Fe) e sódio (Na). O cálcio não é adicionado ao meio Czapeck o que demonstra que este elemento, deve ser requerido em pequenas quantidades por *L. birnbaumii* e apesar de ser encontrado em grandes quantidades na composição dos cogumelos é considerado como micronutriente em fungos, ao contrário das plantas onde é requerido em grandes quantidades (macronutrientes).

As taxas de crescimento listadas decrescentemente foram (Tabela 12): amido, maltose, galactose, glicerol, sacarose, sem fonte de carbono, glicose, ágar água, ácido succínico, lactose, oxalato de sódio e acetato de amônio. Assim, a dextrose, a galactose, a maltose, a sacarose e o amido foram as fontes de carbono com utilização satisfatória por *L. brebissonii*. O amido teve a maior taxa de crescimento, único polissacarídeo testado e havendo, portanto a necessidade de avaliar outros polissacarídeos. Os dissacarídeos maltose, sacarose e lactose tiveram respostas bem diferentes. A lactose teve menores taxas de crescimento e inibiu o efeito da glicose na promoção

de crescimento do fungo, sugerindo haver algum mecanismo que é ativado ou reprimido que impede o uso da glicose. O leite pode inibir a ocorrência de doenças como em pepino, onde uma das causas poderia ser a repressão catabólica pela lactose para a assimilação de outras fontes de carbono no caso o *Oidium*, pelo qual poderia ser avaliado o controle deste basidiomiceto em viveiros cítricos com o uso do leite, o qual possui lactose na sua composição.

Tabela 12 - Influência da fonte de carbono no meio de cultura básico Czapeck sobre a taxa de crescimento de *Leucocoprinus birnbaumii*, a 28°C

Fonte de Carbono (FC)	Taxa de crescimento (cm/dia)					
	Sem Glicose		Com Glicose		Média	
Amido	0,74	Aa	0,69	Aa	0,71	A
Maltose	0,65	ABa	0,70	Aa	0,68	AB
Galactose	0,66	ABa	0,62	Aa	0,64	AB
Glicerol	0,63	ABa	0,52	ABa	0,57	ABC
Sacarose	0,47	Bb	0,64	Aa	0,55	BC
Czapeck sem FC	0,52	Ba	0,58	ABa	0,55	BC
Glicose	0,56	ABa	0,55	Aba	0,55	BC
Agar	0,55	ABa	0,39	BCb	0,47	C
Ácido Succínico	0,13	Ca	0,24	CDa	0,19	D
Lactose	0,05	Ca	0,07	DEa	0,06	DE
Oxalato de sódio	0,00	Ca	0,00	Ea	0,00	E
Acetato de amônio	0,00	Ca	0,00	Ea	0,00	E
Média	0,41	a	0,42	a	0,42	

Médias transformadas por $\sqrt{x+1}$ para realizar a análise estatística. Médias com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%), maiúsculas na coluna e minúsculas na linha.

Duas fontes de seis carbonos foram usadas, glicose e galactose, sendo que a suplementação levou à produção de maior número de CF's. A glicose teve quase a mesma taxa de crescimento do que o meio Czapeck sem FC, mas as diferenças de densidade de hifas foi bem visual. Isso explica que estes fungos na procura por substratos adequados no habitat natural, tentam manter a taxa de crescimento para poder explorar o maior volume possível, e à medida que encontra, aumenta a bifurcação das hifas e aumenta a densidade de entrelaçamento de hifas.

No ácido succínico e no glicerol não houve produção de CF's. O oxalato de sódio e o acetato de amônio não permitiram o crescimento do *L. birnbaumii*, mesmo suplementados com 0,1% de glicose, tendo efeito fungicida, porque ao ser retirado o disco e acondicionado em meio cenoura-ágar não houve crescimento.

As fontes de carbono menores que seis carbonos foram menos preferenciais para o crescimento em meio de cultura. Esta falta de capacidade de uso destas fontes de carbono pode estar relacionada à falta de vias anapleróticas que possam levar à síntese de glicose, pela produção de compostos do ciclo de Krebs e assim poderem ser utilizadas como precursores em todas as vias do anabolismo do fungo. O uso do glicerol é uma evidência de que possui as vias de neoglicogênese, as quais possuem como precursores o ácido láctico, o glicerol ou aminoácidos para produzir glicose, isto é, compostos de três carbonos para formar uma molécula final de seis carbonos.

2.3.8.8 Fontes de Nitrogênio

Os resultados das fontes de nitrogênio estão na Tabela 13, as taxas de crescimento decrescentemente foram: nitrato de potássio, glutamina, glutamato de sódio, nitrato de amônio, nitrato de sódio, glicina, fosfato de amônio, cloreto de amônio, sem fonte de nitrogênio, uréia e nitrito de sódio. As fontes de nitrogênio levaram a taxas de crescimento semelhantes, com exceção da uréia e o nitrito de sódio. A uréia teve uma resposta diferencial entre os dois isolados, um com crescimento satisfatório e o outro com uma taxa muito baixa, enquanto que, no nitrito de sódio os dois foram sensíveis. As fontes de nitrato promoveram maiores taxas de crescimento do que as de amônio, mas não estatisticamente significativas. A glutamina e a glicina tiveram taxas semelhantes aos sais de nitrato ou amônio no meio de cultura Czapeck. Estes resultados são de extrema importância, porque viabilizam a utilização do nitrito de sódio ou da uréia no controle do cogumelo amarelo em viveiros comerciais de citros.

A urease ao atuar sobre a uréia produz nitrito como primeiro passo, pelo qual está sensibilidade de *L. birnbaumii* a estas duas fontes de nitrogênio, deva-se ao nitrito, o qual é bem conhecido em altas concentrações a sua atividade antimicrobiana, como o seu uso na indústria de alimentos para conservação. A uréia é uma fonte de nitrogênio para plantas, mas devido haver a presença de biureto nas fontes agrícolas, houve uma diminuição do seu uso ou ainda pelo

aumento do seu custo pela necessidade de maior grau de pureza. Esta mudança na nutrição das mudas cítricas pode explicar em parte o aumento da ocorrência de cogumelos, devido à utilização de fontes nítricas ou amoniacais na adubação das mudas cítricas, em restrição do uso da uréia.

Tabela 13 - Influência da fonte de nitrogênio no meio de cultura básico Czapeck sobre a taxa de crescimento e fase lag de *Leucocoprinus birnbaumii*, a 28°C

Fonte de Nitrogênio (FN)	Taxa de crescimento (cm/dia)					
	R4		R1		Média	
Nitrato de potássio	0,55	ABCa	0,56	ABa	0,56	A
Glutamina	0,57	ABa	0,54	ABa	0,55	A
Glutamato de sódio	0,55	ABCa	0,56	ABa	0,55	A
Nitrato de amônio	0,49	BCb	0,61	Aa	0,55	A
Nitrato de sódio	0,58	Aa	0,50	Ba	0,54	A
Glicina	0,52	ABCa	0,56	ABa	0,54	A
Fosfato de amônio	0,49	BCa	0,50	Ba	0,50	A
Cloreto de amônio	0,47	Cb	0,53	Ba	0,50	A
Sem fonte de nitrogênio	0,29	Da	0,31	Ca	0,30	B
Uréia	0,07	Ea	0,00	Db	0,03	C
Nitrito de sódio	0,00	Ea	0,00	Da	0,00	C
Média	0,42	a	0,43	a	0,43	

Médias transformadas por $\sqrt{x+1}$ para realizar a análise estatística. Médias com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%), maiúsculas na coluna e minúsculas na linha.

2.3.8.9 Composição

A composição dos macro-nutrientes não foram muito diferentes para os três tipos de cogumelos (Figura 29 e Tabela 14), sendo a sequência decrescente na composição de nitrogênio, potássio, fósforo, cálcio, enxofre e magnésio. Nos elementos com concentrações de micronutrientes (Tabela 14) a sequência decrescente foi do sódio, ferro, zinco, cobre, manganês e boro, entretanto o sódio não podemos considerar que seja um micronutriente, somente sendo provado para um fungo aquático e o boro é para plantas.

Tabela 14 - Características físico-químicas e composição de macronutrientes e micronutrientes nos três tipos de cogumelos encontrados na produção de mudas cítricas do gênero *Leucocoprinus*.

Características físico químicas	Lb	NTA	BR	Média
pH em CaCl ₂ 0,01M	7,70	7,40	7,30	7,47
Densidade (g/cm ³)	0,96	0,96	0,74	0,89
Umidade total (%)	91,57	90,41	78,40	86,79
Matéria orgânica total (combustão) (%)	81,61	83,52	81,53	82,22
Carbono orgânico (%)	13,64	39,31	30,60	27,85
Relação C/N (C total e N total)	8,00	8,00	8,00	8,00
Macronutrientes	Lb	NTA	BR	Média
Nitrogênio total (%)	53,4	56,3	55,1	54,9
Fósforo (P ₂ O ₅) total (%)	4,63	4,17	4,07	4,29
Potássio (K ₂ O) total (%)	9,02	7,92	8,89	8,61
Cálcio (Ca) total (g/kg)	5,9	6,3	6,9	6,4
Magnésio (Mg) total (g/kg)	3,6	3,1	3,7	3,5
Enxofre (S) total (g/kg)	4,7	5,2	4,2	4,7
Micronutrientes	Lb	NTA	BR	Média
Sódio (Na) total (mg/kg)	807	751	815	791
Ferro (Fe) total (mg/kg)	320	323	718	454
Zinco (Zn) total (mg/kg)	166	594	185	315
Cobre (Cu) total (mg/kg)	130	219	139	163
Manganês (Mn) total (mg/kg)	36	42	65	48
Boro (B) total (mg/kg)	12	10	5	9

Os macro-nutrientes considerados para os fungos são o carbono (C), o enxofre (S), o fósforo (P), o magnésio (Mg), o nitrogênio (N) e o potássio (K) (GRIFFING, 1994). Eles são considerados essenciais para o crescimento dos fungos e requeridos em maiores quantidades do que os outros elementos. No geral, N>K>P>S>Ca>Mg entretanto no trabalho foi N>K>P>Ca>S>Mg, havendo uma maior proporção de enxofre na composição. O Na também é encontrado em quantidades semelhantes, mas não é considerado essencial, com exceção para o fungo marinho *Thraustochytrium roseum*, que é requerido para o transporte de fosfato, não sendo

substituído por outro cátion monovalente (BELSKY; GOLDSTEIN; MENNA, 1970) e substituí parcialmente o potássio em algumas funções (GRIFFING, 1994). A média detectada em é de 400 ug/kg, sendo encontrada para os três tipos de *Leucocoprinus*, neste trabalho, o dobro, entretanto em *Agaricus bisporus* foi de 1474 ug/kg (LATIFF; DARAN; MOHAMEDB, 1996).

Figura 29 - Composição relativa na composição dos cogumelos associados a mudas cítricas, crescidas em substrato a base de casca de pinus. LB - *Leucocoprinus birnbaumii*; NTA - *L. birnbaumii* ; e BR - *L. brebissonii*

O cálcio é considerado importante na sinalização celular, na esporulação, na morfogênese, na formação de corpos de frutificação e na ramificação das hifas (JENNINGS; LYSEK, 1996), entretanto pode ser considerado não universalmente requerido e devido às baixas concentrações requeridas para sua essencialidade, considerado como micronutriente (GRIFFING, 1994).

Os corpos de frutificação são especialmente efetivos nos mecanismos de acúmulo de nitrogênio, potássio (RUDAWSKA; LESKI, 2005) e sódio, visto o baixo conteúdo de esses elementos nos solos/substratos.

As concentrações de cobre detectadas em *Agaricus* spp., *Macrolepiota procera*, *M. rhacodes* são entre 10 e 70 mg.kg⁻¹ de matéria seca (KALAC; SVOBODA, 2000), entretanto em espécies acumuladoras encontram-se entre 100-300 mg.kg⁻¹ de matéria seca. Assim, as espécies de *Leucocoprinus* associadas à mudas cítricas podem ser consideradas acumuladoras deste elemento, principalmente no caso de NTA. Os níveis de cobre em cogumelos são maiores do que das plantas, mas estes não são considerados de risco para a saúde. Entretanto, podem ocorrer formas que disponibilizam com maior facilidade, como foi identificado em *Grifola frondosa* um peptídeo ácido, o qual aumenta a proporção da absorção do cobre solúvel pelo intestino (SHIMAOKA et al., 1993 citado por KALAC; SVOBODA, 2000).

2.3.9 Controle em viveiros

2.3.9.1 Experimento com leite

O tratamento com leite não apresentou diferenças significativas no controle do cogumelo amarelo nas condições experimentais (Tabela 15), mas houve uma tendência de redução nas concentrações mais baixas de 0,1 e 0,5% (Figura 30). De forma geral a parte inferior da muda, apresentou maior número de primórdios e cogumelos do que a parte superior (Tabela 15), entretanto não houve correlação entre eles ($R^2=0,0077$).

A produção dos primórdios e dos cogumelos não ocorreu de forma contínua, mas em fluxos, tendo ocorrido as maiores produções aos dois e aos 11 dias do início do experimento (dados não mostrados).

O uso de mudas individuais como repetições levaram a uma grande variação experimental, diminuindo o poder de discriminação dos tratamentos na análise estatística. A seleção preliminar de mudas com cogumelos não evitou a ocorrência de mudas com nenhuma produção de cogumelos na testemunha, o que dificultou muito a discriminação de tratamentos, mesmo transformando os dados e com número elevado de repetições. O uso de várias mudas cítricas por parcela experimental poderia melhorar a discriminação dos tratamentos em condições de colonização natural pelo cogumelo amarelo.

Tabela 15 - Número médio de primórdios e cogumelos de *Leucocoprinus birnbaumii* em mudas de laranja Pêra enxertadas em limão Cravo, tratadas com 400mL de diferentes concentrações de leite, em viveiro comercial

Leite (%)	Superior	inferior	Total
0	66,3	85,8	152,1
0,1	20,2	48,3	68,5
0,5	20,0	70,2	90,2
1	54,8	82,0	136,8
5	44,1	91,8	135,9
10	50,3	39,8	90,1
Média	42,6 c	69,7 b	112,3 a

Dados transformados em $\sqrt{(x+1)}$ para realizar as análises estatísticas. Médias com letras iguais não diferem pelo teste de Tukey (5%).

Figura 30 - Influência do tratamento de mudas de laranja Pêra, enxertadas em limão Cravo com diferentes concentrações de leite na produção de primórdios e cogumelos de *Leucocoprinus birnbaumii*, colonizadas naturalmente em viveiro comercial

2.3.9.2 Experimento com vinagre

O tratamento com vinagre não apresentou diferenças significativas no controle do cogumelo amarelo nas condições experimentais (Tabela 16), mas houve uma tendência de redução acentuada na parte superficial na concentração de 10%, havendo uma redução do número de mudas que não apresentaram cogumelos a partir do tratamento a 5% (dados não mostrados). Não houve correlação entre o número de primórdios e cogumelos que foram coletados na parte superior das mudas e na parte inferior ($R^2=0,0016$), à semelhança do que ocorreu no experimento do tratamento com leite.

A produção de primórdios e de cogumelos não foi contínua, mas ocorreu em fluxos, tendo ocorrido as maiores produções aos dois e aos 12 dias do início do experimento (dados não mostrados).

Tabela 16 - Número de primórdios e cogumelos de *Leucocoprinus birnbaumii* em mudas, de laranja Pêra enxertada em limão Cravo, tratadas com 400mL de diferentes concentrações de vinagre, em viveiro comercial

Vinagre (%)	superior	inferior	total
0	2,0 AB	30,1 AB	32,1 AB
0,1	2,0 B	16,6 B	18,6 B
0,5	10,8 A	25,9 A	36,7 A
1,0	20,5 AB	41,2 AB	61,7 AB
5,0	3,0 AB	32,2 AB	35,2 AB
10,0	0,1 B	13,3 B	13,4 B
Média	6,4 b	26,55 a	32,95 a

Dados transformados em $\sqrt{(x+1,0)}$ para realizar as análises estatísticas. Médias com letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5%, minúsculas dentro da mesma linha e maiúsculas dentro da mesma coluna.

Na avaliação do número de mudas que apresentavam primórdios ou cogumelos de *L. birnbaumii* nos experimentos da influência da concentração do leite e do vinagre, pode-se detectar diferenças estatísticas significativas para a parte superficial dos tratamentos com vinagre (Tabela 17). Ao avaliar estes resultados os produtores sugeriram a possibilidade de aplicação de maiores concentrações de vinagre sobre as superfícies dos primórdios e cogumelos, para diminuir a necessidade de mão-de-obra na coleta de cogumelos, medida recomendada para diminuir o potencial de inóculo dos viveiros (AGUILAR-VILDOSO et al., 2006b).

Tabela 17 - Número médio de mudas que apresentavam primórdios ou cogumelos de *Leucocoprinus birnbaumii* nos experimentos de influência da concentração do leite e do vinagre, em viveiro comercial

Avaliação	Leite	Vinagre	Geral
Total	9,0 Aa	8,2 Aa	8,6 A
Inferior	8,8 Aa	8,0 Aa	8,4 A
Superior	6,7 Ba	3,3 Bb	5,0 B
Geral	8,2 a	6,5 b	

Dados transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$ para realizar as análises estatísticas. Médias com letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5%, minúsculas dentro da mesma linha e maiúsculas dentro da mesma coluna.

Um resultado prático deste experimento foi o uso de uma solução de vinagre (15%), por pulverização, provocando uma reação quase imediata nos tecidos dos primórdios e dos cogumelos em formação (Figura 31). Como eles não se desenvolviam houve uma diminuição no trabalho de coleta, apesar de não ter tido um efeito significativo sobre o desenvolvimento do micélio do *L. birnbaumii* dentro do substrato das muda cítricas.

Figura 31 - Aspecto de primórdios e de cogumelos de *Leucocoprinus birnbaumii* ao contato com solução a base de vinagre A) antes e B) após o tratamento

2.3.9.3 Controle biológico

Os resultados dos tratamentos dos possíveis agentes do controle biológico de *L. birnbaumii* estão na Tabela 18. Os únicos tratamentos que tiveram um controle, não significativo, comparando com a testemunha, foram o Trichonat CE (16%) e o Biotrich PM (49%) ambos os tratamentos são à base de *Trichoderma*, mas não identificados pelos fabricantes quanto à espécie, normalmente sendo mistura de linhagens e/ou de espécies. As comparar as formulações de pó molhável (PM) e suspensão concentrada (SC) os resultados foram contraditórios desde que o Trichonat foi o mais eficiente na formulação concentrado emulsionável, enquanto que para o Biotrich foi o pó molhável.

As leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* são ditas com capacidade de controlar patógenos de plantas por induzir resistência ou por competir por sítios de infecção. Entretanto no experimento realizado foi o tratamento que mais favoreceu a produção de corpos de frutificação nas mudas cítricas. Talvez porque estas estratégias de controle não sejam importantes para esta interação, no qual o fungo não tenta colonizar o tecido vegetal, mas o substrato.

Tabela 18 - Número médio de corpos de frutificação de *Leucocoprinus birnbaumii* em mudas de laranja Pêra enxertadas em limão Cravo, após tratamento com produtos biológicos para o controle do cogumelo amarelo em viveiro comercial, no município de Araras

Posição (CF/ muda)*						
Tratamentos	Superior		Inferior		Geral	
Fermento Fleischmann	5,69	Aa	2,38	Aa	4,03	A
Biotrich premium SC	4,87	Aa	1,94	Aa	3,40	A
Trichonat PM	4,04	Aa	2,66	Aa	3,35	A
Trichobiol PM	4,13	Aa	1,96	Aa	3,04	A
Humidibiol	3,45	Aa	2,52	Aa	2,99	A
Bionema	3,61	Aa	2,32	Aa	2,97	A
Trichodermil SC	2,79	Aa	2,62	Aa	2,70	A
Testemunha	1,85	Aa	2,62	Aa	2,23	A
Trichonat CE	2,28	Aa	2,00	Aa	2,14	A
Biotrich PM	1,67	Aa	1,79	Aa	1,73	A
Geral	3,44	a	2,28	a	2,86	

* Médias transformadas por $\sqrt{(x+1)}$, as quais com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%). Maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha.

As condições experimentais variaram muito, dificultando a diferenciação entre os tratamentos, é importante ter um sistema de avaliação que homogenize a colonização do substrato por *L. birnbaumii* para os experimentos que avaliam os agentes do controle biológico, devendo ser desenvolvidos testes preliminares, porque nos viveiros comerciais ocupam grandes áreas e necessidade de infraestrutura. Entretanto, necessária à validação para poder ter condições de avaliar outros fatores específicos do manejo das mudas e da ocorrência de outros agentes de controle biológico naturalmente ocorrendo nestes ambientes, e muitas vezes sendo subestimados ou superestimados.

2.3.9.4 Controle químico

O experimento de controle químico teve um resultado não esperado, havendo um favorecimento da produção dos cogumelos amarelos em relação à testemunha (Tabela 19), com exceção da iprodiona, não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos e com um coeficiente de variação muito alto (81%), ocorrendo até escapes nas repetições da testemunha. Este efeito estimulante foi principalmente para os tratamentos do metalaxyl/mancozeb e do cloreto de benzalcônio, mas sem diferenças estatísticas (Tabela 19). Estes tratamentos são recomendados para o controle de oomicetos e bactérias, respectivamente. Estes resultados

demonstram que as bactérias e outros fungos, fora do Dykaria, podem estar sendo importantes no controle natural e não está sendo percebido simplesmente por que eles não estarem apresentando sintomas visuais sobre os corpos de frutificação de *L. birnbaumii*.

O uso de fungicidas pode ter algum controle em outras condições ou viveiros, mas em locais que haja comunidades microbianas benéficas e sensíveis aos princípios ativos usados no controle, podem levar há respostas antagônicas de controle e favorecer o basidiomiceto, aumentando os problemas de impermeabilização. Este comportamento vem sofrendo mudanças nos viveiros, que nos primeiros anos de acompanhamento estavam tendo resultados positivos com fungicidas a base de estrobilurinas e triazóis (anos de 2005 a 2006), mas após esse período, já havia uma mudança na eficiência de controle e as aplicações dos defensivos agrícolas levavam a uma maior severidade do problema.

Tabela 19 - Número médio de corpos de frutificação de *Leucocoprinus birnbaumii* em mudas de laranja Pêra enxertadas em limão Cravo, após tratamento com defensivos agrícolas para o controle do cogumelo amarelo em viveiro comercial, no município de Araras

Tratamento	Posição (CF/ muda)*		Geral	
	Superior	Inferior		
Metalaxyl/Mancozeb	4,21	4,36	4,29	A
Cloreto de benzalcônio	4,27	4,02	4,14	AB
Dióxido de cloro	2,72	3,88	3,30	AB
Cloreto de didecildimetil de amônio	1,70	4,59	3,15	AB
Piraclostrobina/ epoxiconazol	2,36	3,52	2,94	AB
Difeconazol	1,68	3,88	2,78	AB
Piraclostrobina	1,68	3,70	2,69	AB
Testemunha	1,77	2,84	2,30	AB
Ipradiona	1,35	2,48	1,92	B
Geral	2,42 b	3,70 a	3,06	

* Médias transformadas por $\sqrt{(x+1)}$, as quais com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%). Maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha.

A adaptação a xenobióticos dos basidiomicetos está muitas vezes associada a sua capacidade de produzir lignina peroxidase, lacase ou manganês peroxidase, as quais são capazes de quebrar anéis de benzeno/fenóis sem muita especificidade o que facilita o seu uso na bioremediação e resistência a princípios ativos usados na agricultura (HARITASH; KAUSHIK, 2009). Esta característica leva a procurar medidas de controle que não as de uso de defensivos agrícolas, principalmente evitando anéis aromáticos na sua composição.

A quebra de eficiência dos fungicidas leva a procurar novas medidas de manejo e maior importância aos programas de controle biológico para problemas agrícolas, o qual deve ser uma alternativa para a convivência e manejo do cogumelo amarelo em viveiros comerciais de mudas cítricas.

2.3.9.5 Controle alternativo

Os resultados da avaliação de fontes de carbono e de nitrogênio deram opção de novos tratamentos para o controle de *L. birnbaumii*, necessitando serem validados em condições comerciais. Nenhum dos tratamentos favoreceu a produção de cogumelos amarelos (Tabela 20), diferentemente dos defensivos agrícolas e da maioria dos *Trichoderma* avaliados nos experimentos anteriores (Tabelas 18 e 19), entretanto sem diferenças estatísticas, com coeficiente de variação muito alto (99%) e escapes nas parcelas da testemunha.

As fontes de nitrogênio quando aplicados levam a uma ligeira redução dos cogumelos, mas não significativa, mas não aumentando o seu número, pelo qual produtores vem tentando realizar aplicações de fontes de nitrogênio para o controle do problema. Ao comparar com os produtos normalmente usados para o controle pelos fabricantes (estrobilurinas e amônias quaternárias), esta prática parece adequada.

Tabela 20 - Número médio de corpos de frutificação de *Leucocoprinus birnbaumii* em mudas de laranja Pera enxertadas em limão Cravo, após tratamento com produtos alternativos para o controle do cogumelo amarelo em viveiro comercial, no município de Araras

Tratamentos	Posição (CF/ muda)*		Média
	Superior	Inferior	
Testemunha	4,13 A	1,83 A	2,98 A
Nitrato de amônio	2,96 A	2,73 A	2,85 A
Nitrato de cálcio	3,35 A	2,28 A	2,81 A
Acetato de amônio	2,80 A	2,69 A	2,75 A
Ureia	2,16 A	2,74 A	2,45 A
Oxalato de sódio	2,72 A	1,95 A	2,34 A
Leite	2,35 A	2,00 A	2,17 A
Vinagre	2,15 A	1,84 A	2,00 A
Nitrito de sódio	1,12 A	1,68 A	1,40 A
Geral	2,64 a	2,20 a	2,42

* Médias transformadas por $\sqrt{(x+1)}$, as quais com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%). Maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha.

Os produtos biológicos a base de *Trichoderma* possuem grande importância nas avaliações de novos problemas porque são uns dos poucos produtos para controle de doenças na agricultura orgânica (MARTINS et al., 2008), necessidade que a citricultura orgânica está tendo para o controle de *Phytophthora*, apesar dos resultados preliminares (MAY; GHINI; KIMATI, 2001). Além disso, a avaliação de eficiência agrônômica deve considerar tanto a formulação como as espécies e linhagens dos diferentes produtos comerciais, não podendo ser extrapolada para todos os produtos comerciais deste táxon fúngico.

Em *Agaricus blazei* o número de cogumelos é bem variável em experimentos com coeficientes de variação de 41%, não sendo significativos mesmo tratamentos com mais de 20% de diferença em relação à testemunha e com a avaliação da colheita por 167 dias (ANDRADE et al., 2007). A semelhança do que ocorre com *L. birnbaumii* a produção de cogumelos por *Agaricus blazei* não é contínua com produções em picos que ocorrem durante o período de 5 a 6 meses, podendo se distinguir de quatro a cinco, ocorrendo o primeiro após 40 dias (ANDRADE et al., 2007). Esta característica leva à necessidade de maior controle dos experimentos e pela natureza tão variável necessidade de diminuir o rigor estatístico nas seleções e avaliações dos fatores/tratamentos em estudo para *L. birnbaumii*.

2.3.9.6 Controle biológico natural

Os cogumelos presentes nos viveiros de mudas cítricas apresentaram naturalmente colonização por vários fungos, desde os primórdios dos corpos de frutificação até quando entravam em senescência (Figura 32). Estes fungos produzem grandes quantidades de esporos dando o aspecto pulverulento sobre a superfície dos basidiomas (Figura 32 A-E). Os fungos associados ao cogumelo amarelo (*L. birnbaumii*) foram os gêneros *Aspergillus* (Figura 32G), *Aureobasidium* e *Penicillium* (Figura 32 A-C e F) e ao cogumelo branco (*L. brebissonii*) foi o *Penicillium* (Figura 32D e E). Na falsa trufa foram observados *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* e no cogumelo vermelho (*G. dilepis*) foram *Aspergillus* e *Penicillium*.

Na caracterização morfológica, a espécie associada de *Aureobasidium* foi *A. pullulans* (de Bary) Arnaud var. *melanogenum* Hermanides-Nijhof (SAMSON et al., 2000). Esta espécie apresenta um crescimento cultural inicialmente claro e com a idade tornasse escura, devido à melanização das hifas. As hifas melanizadas sobrem septação formando clamidósporos ou artrósporos, enquanto que os conídios são claros e produzidos nas hifas sem melanina. Esta

espécie tem ampla distribuição no mundo e vem sendo isolada do solo, como epifítica, da pele e unhas de humanos, em bebidas de frutas, sendo comum em ambientes internos com umidade (SAMSON et al., 2000).

O isolamento de *A. pullulans* é importante para avaliação do potencial de controle contra *L. birnbaumii*, pois há evidências de controle de fungos e protozoários, pelos metabólitos desta espécie, como a aureobasidina A (AbA) (LIU et al, 2007). A aureobasidina A é um depsipeptídeo cíclico que atua contra espécies de *Penicillium*, *Botrytis* e *Monilinia*; inibindo a germinação e crescimento do tubo germinativo, podendo reduzir a incidência do bolor verde dos citros (*P. digitatum*) e do mofo cinzento do morango (*B. cinerea*), tendo como principal característica a atuação da AbA sobre o inositolfosforilceramida sintase (IPC), a qual está presente em fungos mas não em mamíferos (LIU et al., 2007).

Na caracterização morfológica, a espécie associada de *Penicillium* foi *P. olsoni* Bain. & Sartory (PITT, 1985). Em meio de cultura e sobre o micélio dos cogumelos, apresentavam penicílios terverticilares com grande número de fiálides (Figura 32F), com estipe liso, muito longo, com mais de 200 μm de comprimento e largura de 4,4 a 4,9 μm , sendo na extremidade multiramificado, com ramificações curtas. O penicílio é estruturado em fiálides, métula e ramos, pelo qual pertence ao subgênero *Penicillium*, não sendo observados “ramuli” (Figura 32F). Os ramos possuíam comprimento variando de 7,3 a 13,6 μm e diâmetro de 2,9 a 3,7 μm , havendo mais de quatro ramos por estipe. As métulas possuíam comprimento variando de 7,3 a 9,2 μm e diâmetro de 2,2 a 3,3 μm , com pelo menos três métulas por ramo. As fiálides se mostraram de formato ampuliforme, com comprimento variando de 7,0 a 8,8 μm e diâmetro de 1,8 a 2,6 μm , sendo pelo menos cinco fiálides por métula, assim tendo no mínimo 60 fiálides por estipe. Os conídios foram catenulados, lisos, com comprimento variando de 2,9 a 3,3 μm e diâmetro de 1,6 a 2,2 μm nos esporos ainda presos às fiálides e quando destacados ligeiramente rugosos, com comprimento variando de 2,7 a 3,9 μm e diâmetro de 2,0 a 2,4 μm .

P. olsoni é descrito como sendo encontrado no solo, em casa-de-vegetação, na água, no interior de habitações e em alimentos como tomates, salames e feijões (PITT, 1985 e SAMSON et al., 2000). Vem sendo isolado como endofítico em caupi (RODRIGUES; MENEZES, 2002) e de vários tecidos de café (VEGA et al., 2006). Recentemente o seu isolamento na Antártida o caracterizou como pertencendo aos extremófilos, com grande potencial biotecnológico (GOICHEVA et al., 2009).

Figura 32 - Aspecto dos cogumelos afetados por *Penicillium* em viveiros comerciais de mudas cítricas. *Leucocoprinus birnbaumii* tipo LB (A e B) e tipo NTA (C) e em *L. brebissonii* (D e E). Ultraestrutura de *Penicillium* (F) e *Aspergillus* (G) associados a cogumelos. Escalas de 20µm

No Brasil, a primeira citação de *P. olsoni* foi de amostras de solo no Estado da Paraíba (BATISTA et al., 1970) e mais recentemente, isolado como um fungo endofítico em sementes de caupi (*Vigna unguiculata*) no Estado de Pernambuco, numa frequência de 0,95% (RODRIGUES; MENEZES, 2002).

Uma quercetinasase de *P. olsonii* vem sendo sequenciada e caracterizada, a qual atua sobre um substrato específico, o flavonol do grupo dos flavonóides, quebrando uma dupla ligação do anel aromático, formando depside (TRARANCHIMAND et al., 2008). Estas depsides, compostos fenólicos composto por duas ou mais unidades monocíclica aromáticos ligados por um éster, são moléculas de grande valor farmacêutico por terem função de antibiótico (LV et al., 2009), anti-HIV (NEAMATI et al., 1997), atividade anti-proliferativa e potentes anti-inflamatórios não esteróides (KUMAR; MÜLLER, 2000). Há uma necessidade de estudos destes microrganismos quanto ao seu potencial como agente biológico de doenças de plantas, mas também na avaliação do seu potencial biotecnológico, principalmente para a produção de novos alimentos probióticos e farmacêuticos.

Os *Aspergillus* apresentaram dois grupos, um de esporos amarelos e o outro de esporos escuros. O de esporos amarelos foi identificado como *A. ochraceus* Wilherm e o de esporos escuros como sendo do complexo de *A. niger* van Tieghem, visto que por caracterização cultural ou morfológica não se conseguiu diferenciar de *A. tubigensis* (SAMSON et al., 2000).

O estudo das interações entre os fungos associados com cogumelos *Leucocoprinus* abre perspectivas para a realização de trabalhos tanto em nível de laboratório como de campo. A determinação dos mecanismos de interação será de grande importância, pois poderá levar a uma utilização simultânea de agentes de controle biológico contra este novo agente nocivo à produção de mudas cítricas. Fungos do gênero *Penicillium* são bem conhecidos pela sua capacidade de produção de antibióticos, aliado à sua grande capacidade de produção de esporos, importantes para a produção de inóculos comerciais. Os *Aspergillus* apesar da grande importância industrial, deve ser considerado com precauções desde que é responsável pela ocorrência de aspergiloses, o que pode levá-lo de uma categoria benéfica para um agente vetado, pela possibilidade de causar prejuízos à saúde humana.

O trabalho com substratos comerciais e em viveiros comerciais traz a perspectiva de menor uso de defensivos agrícolas consequentemente, menor impacto ambiental e qualidade de vida para o produtor.

2.3.10 Avaliação em substrato

2.3.10.1 Inóculo

A necessidade de uma inoculação eficiente foi confirmada pelos experimentos nos viveiros comerciais, no qual havia um inóculo desuniforme na distribuição, dificultando a diferenciação dos tratamentos pela falhas principalmente na testemunha. Assim, a seleção entre o tipo de semente para veicular *L. birnbaumii* foi necessária. Apesar de o fungo colonizar os grãos de feijão, milho pipoca, soja e trigo; houve uma melhor desagregação dos grãos e visualização da colonização dos mesmos pelo fungo no milho pipoca. Sem adição de água não houve colonização dos grãos pelo fungo. Os grãos de feijão não apresentaram consistência, desmanchando após a esterilização e dificultando a desagregação necessária para homogeneizar o crescimento do fungo nos frascos.

A seleção da quantidade necessária para usar como inóculo para uma boa colonização foi a proporção entre 2,5 e 10%, tendo uma boa colonização do substrato a base de casca de pínus (Figura 33). A escolha é de 5% para os experimentos posteriores foi para ter uma resposta mais estável e uma menor quantidade de inóculo gasto.

Na determinação da fase favorável da produção do substrato, observou-se que o fungo consegue colonizar todas as fases, sendo com maior crescimento nas dez últimas fases, isto é, após a terceira semana da compostagem. Estes dados demonstram que as fábricas devem estar monitorando durante toda a fase de produção e não somente na fase final a formação de cogumelos nas áreas de produção. À semelhança dos viveiros a coleta dos cogumelos deve ser efetuada antes da abertura do píleo e do substrato com micélio ao redor dos cogumelos para diminuir o potencial do inóculo.

Figura 33 - Colonização temporal do substrato a base de casca de pinus em função da quantidade de sementes de milho pipoca colonizados com *Leucocoprinus birnbaumii* a 28°C

2.3.10.2 Macrofungos

Ao comparar o crescimento de diferentes macrofungos no substrato de fibra de coco, observamos que cada isolado fúngico possui suas próprias características como pode ser observado pela Figura 34.

O *L. brebissonii* (BR) não apresentou nenhuma alteração visual do substrato; O *L. birnbaumii* tipo LB apresentou primórdios de corpos de frutificação mesmo no interior do micélio, enquanto que o tipo NTA apresentou somente na parte externa do substrato, mas não internamente. O *G. dilepis* (Roxo) apresentou uma alteração no substrato peculiar, fazendo com que somente sobrasse a fibra, pelo qual apresentou aspecto de mais seco, pela menor retenção de água.

Figura 34 - Crescimento de fungos basidiomicetos em fibra de coco, associados à produção de mudas cítricas. *Leucocoprinus birnbaumii* (LB e NTA), *L. brebissonii* (BR) e *Gimnopilus dilepis* (Roxo) e uma testemunha sem fungo, com irrigação duas vezes à semana em casa-de-vegetação após 35 dias da inoculação, veiculado em milho pipoca

2.3.10.3 Manejo e controle

A avaliação do tratamento de controle pelo uso do inóculo produzido em laboratório se mostrou viável pela utilização da mistura de diferentes proporções de nitrito de sódio e uréia.

Apesar de eles reagirem entre eles e produzirem N_2 e CO_2 quando aplicados simultaneamente, tiveram respostas sinérgicas (Figura 35 e Tabela 21). Estas duas fontes de nitrogênio podem ser usadas em condições de viveiros comerciais para o controle de *L. birnbaumii* e quando aplicados juntos, doses menores podem ser usadas evitando-se problemas de fitotoxidez e condutividade elétrica alta, principalmente no caso da fibra de coco, a qual já possui sódio em excesso.

Tabela 21 – Efeito da concentração de nitrito de sódio e de uréia no índice de colonização de substrato em frascos, inoculado com milho pipoca colonizado por *Leucocoprinus birnbaumii*, incubados a 28°C.

Concentração (g/L)		Índice de colonização
Nitrito	Ureia	
0	0	2,00 AB
1	0	2,75 A
2	0	1,83 ABC
3	0	1,33 BCD
4	0	0,17 F
5	0	0,17 F
0	1	1,25 BCDE
0	2	0,67 DEF
0	3	0,58 DEF
0	4	0,67 DEF
0	5	0,25 EF
1	1	1,25 BCDE
1	3	0,25 EF
1	5	0,08 F
3	1	0,75 CDEF
3	3	0,33 DEF
3	5	0,08 F
5	1	0,00 F
5	3	0,00 F
5	5	0,17 F
Média		0,73
CV (%)		14,5

* Dados transformados por $\sqrt{(x+1)}$ para ser realizada a análise estatística. Médias com mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

O nitrito de sódio teve resultados estatisticamente significativos que favorecem o seu uso (Tabela 21), já que é usado na indústria de alimentos, favorecendo a saúde dos funcionários dos viveiros. O seu uso na validação demonstrou que tem que ter algumas cautelas nos seus usos, como elevada condutividade elétrica, problemas de toxicidade em brotações novas até podendo provocar a morte da muda, sódio em excesso principalmente no sistema de produção em substrato a base de fibra de coco.

Figura 35 – Superfície de resposta das concentrações do nitrito de sódio e da uréia no índice de colonização de substrato a base de casca de pinus por *Leucocoprinus birnbaumii*

O uso do Nitrito a 3 quilos para 1000 litros de água possui uma E.C. de 4,80, enquanto que Nitrito 2 quilos + Uréia 2 quilos / 1000 litros de água é de 3,32 a E.C. Esta mudança facilita o emprego deste tipo de controle. Mas, como estes dois produtos reagem e liberam CO₂, devem ser misturados no momento da aplicação.

O manejo da irrigação demonstrou que quanto maior o intervalo da irrigação, maior a impermeabilização do substrato, principalmente a partir de intervalos de cinco dias em casa de vegetação, em concordância com o realizado a 28°C, onde o substrato começa a flutuar (quando saturado), pela impermeabilização quando deixado evaporar a umidade, enquanto que nos frascos fechados, isso não ocorreu.

2.3.11 Região ITS

2.3.11.1 Gênero *Gymnopilus*

Ao alinhar a sequência consenso com outras do gênero *Gymnopilus* podemos confirmar que a região amplificada pelos *primers* ITS1 e ITS4 foi adequada para cobrir toda a região ITS, sendo de 598 pb das 657 obtidas pelo sequenciamento (Tabela 22). O tamanho das regiões ribossomais foram: para a ITS-1 de 230 pb (da posição 17 a 246), para a 5.8S de 158 pb (da posição 247 a 404) e para a ITS-2 de 210 pb (da posição 405 a 614).

A região 5.8 apresenta 158 pb para todas as espécies de *Gymnopilus* e para *H. neerlandica*, a qual confirma a conservação em tamanho na ordem Agaricales, mas apresentou algumas bases modificadas na posição 120 (geral com C, com A em *G. fulvusquamulus* e T em *G. moabus*) na posição 133 (geral com G, com T em *G. fulvusquamulus* e A em *G. moabus*) e uma alteração consistente na posição 404 (geral com A e com T em *G. imperialis*, *G. spectabilis*, *G. junonius* e *G. pampeanus*). Esta última alteração representando o grupo *spectabilis-imperialis*, constituído pelas quatro espécies que possuem em comum a alteração na última base da região 5.8S.

A região ITS variou de 583 a 635 pb com uma média de 602 e uma amplitude de 53 (Tabela 22). A menor foi encontrada em *G. ferruginosus* e a maior em *G. punctifolius*. A correlação entre o comprimento da região ITS1 e ITS 2 foi de 0,4193 (Figura 36A), entretanto observa-se que há dois tipos de correlação entre as regiões espaçadoras internas da região ribossomal (ITS1 e ITS2), uma sendo linear (Figura 36B) e a outra com comportamento aleatório restritivo (Figura 36C).

Na correlação linear o coeficiente foi de 0,9572, o que demonstra que existe uma tendência de evolução compensatória, isto é, à medida que uma das regiões ITS aumenta ou diminui a outra o faz na mesma direção. A região ITS 1 variou de 230 a 250 pb e para a região ITS 2 de 216 a 227 pb, sendo que a cada variação de 10 nucleotídeos na região ITS1 há uma alteração de mesmo sentido de 6 bases na região ITS2. O desvio médio desta previsão é de apenas um nucleotídeo, tendo uma amplitude de +2 e -3 nucleotídeos.

Figura 36 - Relação entre o comprimento da região ITS1 e a ITS2 em *Gymnopus*. a) Comportamento geral; b) Comportamento linear e c) Comportamento aleatório restritivo

Tabela 22 - Variação no número de bases na região ribossomal ITS1-5.8S-ITS2 para as diferentes espécies de *Gymnopilus*

Espécie	Acesso	ITS1	5.8S	ITS2	Total	Espécie	Acesso	ITS1	5.8S	ITS2	Total
<i>G. aeruginosus</i>	AY280977	235	158	>211	>604	<i>G. moabus</i>	AF501551	229	158	207	594
<i>G. allantopus</i>	AF501542	230	158	210	598	<i>G. nevadensis</i>	AY280995	>199	158	212	>569
<i>G. anomalus</i>	AF501563	230	158	216	604	<i>G. norfolkensis</i>	AF501553	231	158	209	598
<i>G. arenophilus</i>	EU518422	231	158	216	605	<i>G. ochraceus</i>	EU401709	231	158	209	598
<i>G. arenophilus</i>	EU518421	232	158	184	574	<i>G. odini</i>	AF325659	230	158	206	594
<i>G. cerasinus</i>	AY280978	231	158	209	598	<i>G. pampeanus</i>	AY280997	236	158	205	599
<i>G. CitrusA</i>		231	158	>13	>402	<i>G. penetrans</i>	AY281000	232	158	217	607
<i>G. CitrusC</i>		230	158	210	598	<i>G. punctifolius</i>	EU834214	250	158	227	635
<i>G. cyanopalmicola</i>	EU401711	232	158	208	598	<i>G. purpureosquamulosus</i>	EU401714	>222	158	194	>574
<i>G. decipiens</i>	AF325660	231	158	207	596	<i>G. robustus</i>	AY281004	241	158	221	620
<i>G. dilepis</i>	AY280980	231	158	209	598	<i>G. sapineus</i>	AJ236079	235	158	216	609
<i>G. eucalyptorum</i>	AF501546	230	158	207	595	<i>G. spectabilis</i>	AY281010	236	158	205	599
<i>G. ferruginosus</i>	AF501547	217	158	208	583	<i>G. spectabilis</i>	AY281009	236	158	205	599
<i>G. flavus</i>	EU518420	238	158	219	615	<i>G. subearlei</i>	AY281013	231	158	209	598
<i>G. fulvosquamulosus</i>	AY280982	232	158	212	602	<i>G. suberis</i>	AY281015	232	158	206	596
<i>G. hispidellus</i>	AY280983	>220	158	206	>584	<i>G. subpurpuratus</i>	AY281016	232	158	206	596
<i>G. cf. hispidellus</i>	AY280984	236	158	205	599	<i>G. turficola</i>	AF325669	232	158	207	597
<i>G. hispidus</i>	AY280985	197	158	206	>561	<i>G. tyallus</i>	AF501562	230	158	207	595
<i>G. hybridus</i>	AF501548	>233	158	219	610	<i>G. underwoodii</i>	AY281017	230	158	207	595
<i>G. imperialis</i>	AY280986	234	158	209	601	<i>G. validipes</i>	AY281018	>227	158	207	>592
<i>G. junonius</i>	AY280988	236	158	205	599						
<i>G. lepidotus</i>	AY280991	232	158	209	599						
<i>G. luteofolius</i>	AF325668	232	158	206	596						
<i>G. maritimus</i>	EU518419	230	158	211	599	<i>G. sp</i>	FJ039687	>197	158	219	>574
<i>G. maritimus</i>	EU518418	>224	158	211	>593	<i>G. sp</i>	FJ039688	247	158	226	631
<i>G. medius</i>	AY280994	231	158	208	597	<i>G. sp.</i>	GQ159919	247	158	227	632
						<i>H. neerlandica</i>	AY320399	232	158	217	607

Na correlação aleatório restritivo o coeficiente foi de 0,1852, o que demonstra que não existe uma tendência de evolução compensatória à medida que uma das regiões ITS aumenta ou diminui, entretanto possui uma limitação de tamanho entre eles, dentro do qual podem variar. A região ITS 1 variou de 229 a 236 pb e a região ITS 2 de 205 a 212 pb, que coincide para ambas as regiões de uma variação de até oito nucleotídeos.

Estes resultados demonstram que pode estar ocorrendo dois tipos de comportamento das regiões ITS1 e ITS2 no gênero *Gymnopilus*, que não vem sendo descrito na literatura, e que pode ser uma característica auxiliar na identificação de espécies deste gênero, visto que as análises filogenéticas desconsideram as faltas (“gaps”) para estimar as árvores sendo então esta informação perdida ou inutilizada.

2.3.11.2 Gênero *Cyathus*

Ao alinhar a sequência consenso com a sequência de *C. stercoreus* (FJ478125) podemos estimar que a região amplificada pelos *primers* ITS1 e ITS4 deve ser de 746 pb, para o ninho-de-passarinho associado às mudas cítricas (Figura 37), faltando uma região de 44 nt “upstream” e 51 nt na “downstream”, totalizando 95 nt ou 85,4% da cobertura sequenciada. Os tamanhos das regiões ribossomais foram: para a ITS-1 de 261 pb (14 pb faltando + 247 da sequência consenso), para a 5.8S de 158 pb (da posição 248 a 405) e para a ITS-2 de 237 pb (da posição 406 a 642). O alinhamento das sequências de *Cyathus* apresentou uma região de 170 nt sem variabilidade, entre a posição 246 e 415, a qual é extremamente conservada na ordem Agaricales, que corresponde a região 5.8S.

Uma região duplicada de 30 bases foi localizada da posição 124 a 153 e da 462 a 491 da sequência consenso (Figura 37), uma repetição em cada região ITS. Na região ITS1-1 da posição 138 a 167, há 137 bases da região 18S e a 95 da região 5.8S, enquanto que na região ITS-2 da posição 58 a 87, há 57 bases da região 5.8S e a 152 da região 25S. Não estando equidistantes nas duas regiões, mas mais próximas da região 5.8S.

A sequência duplicada apresenta especificidade ao gênero *Cyathus*, sendo que está presente nas 24 sequências do gênero no GenBank, com 96% a 100% de cobertura e um identidade de 89 a 100%. Nos outros táxons da ordem Agaricales (26 famílias) e da família Agaricaceae (24 gêneros), que foram avaliados quanto à similaridade com a sequência duplicada foi no máximo de 14 bases (*Cystolepiota cystophora* U85332 e *Chamaemyces fracidus*

AY176343), sendo em média de 7 a 8 nucleotídeos ou 25%. Esta sequência não foi encontrada em outras espécies de gêneros da família Nidulariaceae disponíveis no GenBank, como *Crucibulum laeve* (DQ463357), *Mycocalia denudata* (DQ911596), *Nidula niveotomentosa* (DQ463358), sendo o pareamento de 7 a 10 nucleotídeos. No gênero *Cyathus*, a duplicação está presente em todas as espécies, mas com diferenças no tamanho e no número de bases conservadas, sendo nunca inferior a 19 bases. Algumas espécies de grupos intragenéricos de *Cyathus* estão associadas com as características das sequências repetidas (Tabela 23). Quando a sequência da segunda repetição é idêntica, ela está associada a espécies do grupo Striatum e quando há uma menor identidade do que 80% em uma das repetições, ela pertence ao grupo Ollum. Esta região pode servir como uma marca específica para o gênero *Cyathus*.

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTTAATAGTGGTAGTGCTGATGCTGGTGGTCAAA
CACATGTGCTCGCTCTGCCACTTATTATTACCTTTCCACCTGTGAACTATTGTAGATGTTGAAGGTCACC
TCTCAAGCTTCATTGCTTGGTCTGGCGTITGCGGGCTTCATTTCAGTTGAAGTCGGCTCTCGCTGCGAACT
TCAATGTCTATCTCTACATATACCCATTATTAAAAGTATCAGAAGGACTTGATTGGGCTTCATTGCCTAT
AAATCAATTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGC
GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCTTTGGTA
TTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATTCTCAACCCACTACATTTGTTTATTCAAGTGAAGT
GCGTGTTGGATGTGGGGITGCGGGCTTCATTTCAGTTGAAGTCGGCTCCCTGAAATGCATTAGCAGAA
ATCTTTGTTGTGCTGCTTCTATTGGGTGTGATAATTATCTACTCCTAGGAAGTGGCTGACACTAGGACTT
GGTCAAACAAGTCGGGGTTTTGCTTCTAATAGTCCATTCACTTGGACAATACTATTGACATTGACCTCA
AATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Figura 37 - Sequência da região ribossomal ITS1-5.8-ITS2 do isolado *Cyathus* associado a mudas cítricas, complementada com *Cyathus stercoreus* (FJ478125). Sequência dos primers ■; sequência faltando □, região repetida na região ITS1 e ITS2 ■ e região 5.8S XXX.

2.3.12 Primers da região ITS

2.3.12.1 Gênero *Gymnopilus*

As contaminações de substratos e matéria prima na produção das mudas cítricas precisam da detecção de *Gymnopilus dilepis* ou de espécies deste gênero, mesmo na fase que não produzam basidiomas, como em sacos de substratos onde não há incidência de luz. A análise *in silico* dos primers para o gênero *Gymnopilus* (Guzmán-Dávalos et al., 2003), mostraram-se inespecíficos. O ITS1G e o ITS4G possuem alinhamento completo, isto é, 100% de identidade, com sequências de oomicetos (*Phytophthora palmivora* e *Saprolegnia ferax*), ascomicetos como (*Penicillium chrysogenum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Epicoccum nigrum*), basidiomicotas

como ferrugens (*Melampsora*), boletales (*Astraeus asiaticus*), agaricales (*Inocybe maculata* e *Lepista sordida*), leveduras (*Cryptococcus adeliensis* e *Trichosporon loubieri*), e até mesmo ácaros como o piolho-de-galinha (*Dermanyssus gallinae*), insetos (*Cheirogenesisia edmundsi* e *Torymus sinensis*), algas (*Plagioselmis nannoplantica*) e plantas, como a espécie selvagem de bananeira *Musa balbisiana*. Estes resultados levam há uma necessidade de desenvolver este tipo de *primer* específico ou algum diagnóstico molecular para análise de rotina, porque os *primers* ITS1G e ITS4G não são validados adequadamente para esta nova condição.

Tabela 23 – Identidade e presença de “Gaps” da região de 30 nucleotídeos duplicada na região ITS de *Cyathus* associado a mudas cítricas em relação às seqüências disponíveis do GenBank e sua relação com os grupos intragenéricos de *Cyathus*

Acesso	Espécie	Primeira repetição			Segunda repetição			Grupo
		corresp	Gaps	ID	corresp	Gaps	ID	
	<i>Cyathus</i> Muda cítrica	30	0	100	30	0	100	S
DQ463354	<i>C. stercoreus</i>	30	0	100	30	0	100	S
EU784192	<i>C. stercoreus</i>	30	0	100	30	0	100	S
EU784193	<i>C. stercoreus</i>	30	0	100	30	0	100	S
FJ478125	<i>C. stercoreus</i>	30	0	100	30	0	100	S
DQ486697	<i>C. striatus</i>	30	0	100	30	0	100	S
EU784195	<i>C. striatus</i>	30	0	100	30	0	100	S
DQ463351	<i>C. annulatus</i>	29	0	97	30	0	100	S
DQ463352	<i>C. renweii</i>	29	0	97	30	0	100	S
DQ463350	<i>C. crassimurus</i>	26	0	87	30	0	100	S
EF613553	<i>C. subglobisporus</i>	26	0	87	30	0	100	S
EU784194	<i>C. striatus</i>	ND	ND	ND	30	0	100	S
DQ463353	<i>C. triplex</i>	ND	ND	ND	30	0	100	S
DQ463349	<i>C. setosus</i>	26	0	87	30	1	100	S
DQ463355	<i>C. berkeleyanus</i>	29	0	97	29	1	97	P
DQ463348	<i>C. pygmaeus</i>	27	0	90	29	1	97	P
DQ463356	<i>C. pallidus</i>	27	0	90	29	1	97	P
DQ463347	<i>C. africanus</i>	26	0	87	29	1	97	O
DQ463344	<i>C. colensoi</i>	26	0	87	30	2	100	O
DQ463346	<i>C. hookeri</i>	19	0	63	30	1	100	O
DQ463345	<i>C. olla f. olla</i>	19	2	63	30	1	100	O
DQ463343	<i>C. olla f. brodiensis</i>	19	2	63	30	2	100	O
DQ463340	<i>C. africanus</i>	26	0	87	19	1	63	O
	<i>C. africanus</i> var.							O
DQ463342	<i>latisporus</i>	26	0	87	19	1	63	
DQ463341	<i>C. jiayuguanensis</i>	26	0	87	19	1	63	O

ND- Seqüência pequena que não cobrindo a primeira repetição do fragmento de 30nt. Grupos: S- Striatum, P- Pallidum e O-Ollum.

2.3.12.2 Gênero *Cyathus*

As sequências geradas com potencial uso como *primers* variaram muito na especificidade, desde alinhamentos só com a sequência associada a citros até para diversos táxons no reino Fungi (Tabela 24). Vários dos *primers* selecionados encontram-se em parte da região duplicada existente nas regiões ITS, isto é, localizados entre as posições 124 e 153 da região ITS1 (7 *primers*) e dentre as posições 462 à 491 da região ITS2 (8 *primers*). Os *primers* somente estão em parte da sequência repetida porque se estivessem em toda a região, formariam um grampo, como discutido na caracterização desta região. A repetição de 30 pares de bases é também responsável pela especificidade a *Cyathus* na região ITS1, mas não na região ITS 2. Na região ITS 2 os *primers* específicos estão entre a região 582 e 606, principalmente com especificidade ao *Cyathus* associado à mudas cítricas.

Tabela 24 – Sequências de potenciais *primers*, analisadas *in silico* a especificidade e a qualidade a partir da sequência da região ITS de *Cyathus* associada à mudas cítricas

#	Especificidade	Sequência	bases	inicio	fim	Qualidade*	Tm (°C)
1	<i>C. stercoreus</i>	GCTTGGTCTGGCGTTTGCGG	20	110	129	---	59,4
2	<i>C. stercoreus</i>	TTGGTCTGGCGTTTGCGGGC	20	112	131	---	60,8
3	<i>C. stercoreus</i>	GGTCTGGCGTTTGCGGGCTT	20	114	133	---	60,5
4	<i>C. stercoreus</i>	GTCTGGCGTTTGCGGGCTTC	20	115	134	---	59,2
5	<i>C. stercoreus</i>	TCTGGCGTTTGCGGGCTTCA	20	116	135	---	59,6
6	<i>C. stercoreus</i>	AGTCGGCTCTCGCTGCGAAC	20	145	164	2H 2D	59,5
7	<i>C. stercoreus</i>	GTCGGCTCTCGCTGCGAACT	20	146	165	2H 2D	59,5
8	Agaricomycetes	GCAACGGATCTCTTGGCTCTCGC	23	257	279	D	60,2
9	Fungos	ACGGATCTCTTGGCTCTCGCA	21	260	280	D	57,7
10	Agaricales	GATGTGGGGGTTGCGGGCTT	20	452	471	---	59,6
11	Agaricales	ATGTGGGGGTTGCGGGCTTC	20	453	472	---	59,6
12	Agaricales	GTGGGGGTTGCGGGCTTCAT	20	455	474	---	59,6
13	Cyathus	TTTGCGGGCTTCATTTCAGTT ** 2	20	123	142	---	52,9
		loais					
14	Cyathus	CAGAAGGACTTGATTGGGCT **	20	205	224	---	51,3
15	Cyathus	TTCAGTTGAAGTCGGCTCCCCT ** 2	22	474	495	H D	57,6
		loais					
#	Especificidade	Sequência Reversa	bases	inicio	fim	Qualidade	
1	Cyathus Citrus	AGCAAAACCCCGACTTGTTTGACC	24	583	606	2H 2D	58,3
3	Cyathus Citrus	GCAAAACCCCGACTTGTTTGACC	23	583	605	2H 2D	57,3
2	Cyathus Citrus	AGCAAAACCCCGACTTGTTTGACCA	25	582	606	2H 2D	59,5
4	Cyathus Citrus	GCAAAACCCCGACTTGTTTGACCA	24	582	605	2H 2D	58,5
5	Agaricales	ATGAAGCCCGCAACCCCCAC	20	455	474	---	59,6
6	Agaricales	TGAAGCCCGCAACCCCCACA	20	454	473	---	61,0
7	Agaricales	GAAGCCCGCAACCCCCACAT	20	453	472	---	59,6
8	Agaricales	AAGCCCGCAACCCCCACATC	20	452	471	---	59,6
9	Agaricales	CCCGCAACCCCCACATCCAA	20	449	468	---	59,3
10	Agaricomycotina	ACCAAAGAGCGCAAGGTGCGT	21	352	372	H 2D	59,8
11	Agaricomycotina	CCAAAGAGCGCAAGGTGCGT	20	352	371	H 2D	58,5
13	Fungos	TGCGAGAGCCAAGAGATCCGT	21	260	280	D	57,7
14	<i>C. stercoreus</i>	TAGAAGCAGCACAAACAAAGATT **	22	512	533	---	50,7
15	<i>C. stercoreus</i>	ACACCCAATAGAAGCAGCAC **	20	522	541	---	52,4

* Formação de: H- grampos; D- dímeros e P- sequências palindrômicas. ** Selecionado visualmente.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As alterações climáticas que vem ocorrendo nas últimas décadas tem despertando o interesse da sociedade e da comunidade científica com relação a causas e consequências. As alterações de temperatura (aumento de $0,6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e de CO_2 (de 280 ppm para 379ppm) estão correlacionadas com o uso de combustíveis fósseis e mudança do uso da terra e da agricultura (IPCC, 2007). Na agricultura, trabalhos sobre o impacto do aquecimento global nas plantas e nas relações com suas pragas e patógenos (GHINI; HAMADA, 2008) tem despertado grande interesse. Entretanto, não podem ser deixadas de lado as alterações no manejo das culturas agrícolas e novas áreas de plantio porque podem levar a provocar importantes mudanças nas relações planta microrganismos.

Na produção de mudas cítricas houve uma mudança de utilização do solo por compostos a base da casca de pinus ou fibra de coco, e de produção em ambiente aberto para um ambiente protegido através de telas de plástico. Estas alterações levaram à ocorrência de macrofungos associados à compostagem final dos substratos com as mudas cítricas, despertando a atenção quando começou a ocorrer a impermeabilização do substrato e consequentemente o não desenvolvimento das mudas após o plantio. Com o presente trabalho pode-se observar que os problemas associados a mudas não se devem unicamente a uma única espécie fúngica, mas a várias espécies que possuem suas características próprias de colonização dos substratos. Apesar da maioria não apresentar limitação à produção de mudas cítricas, observou-se que pode ocorrer em todos os tipos de substratos, variando a sua intensidade, dependente da espécie do macrofungo considerado.

A impermeabilização dos substratos, tanto a base de casca de pinus como de fibra de coco, foi provocada por *Leucocoprinus birnbaumii*, entretanto a impermeabilização não ocorre em todas as situações de manejo nos viveiros, por isso a variação de danos observada entre os produtores de mudas cítricas, mas foi determinado que a frequência de irrigação está associado ao processo de impermeabilização, principalmente quando o intervalo é igual ou maior que cinco dias.

Na parte fisiológica, o trabalho de fontes de carbono evidencou que o *L. birnbaumii* possui rotas metabólicas da gliconeogênese por utilizar o glicerol, mas não de rotas anapleróticas para uso de fontes menores de três carbonos. Nas fontes de nitrogênio, não houve diferenças

significativas do uso de fontes nítricas, amoniacaís ou aminoácidos para o crescimento micelial. Destes trabalhos de fontes de carbono e nitrogênio há a possibilidade de novas estratégias de controle do cogumelo amarelo, como vem ocorrendo para o uso do vinagre, do nitrito e da uréia, o qual vem sendo validado pela prática em viveiros comerciais. Uma das explicações para o aumento do problema da impermeabilização do substrato por *L. birnbaumii* pode ter sido pela substituição da uréia na nutrição das mudas cítricas por fontes nítricas e amoniacaís. A uréia teve problemas de uso pelo biureto presente como impureza em fontes de má qualidade, que provocavam queimaduras e lesões nas mudas. Esta espécie fúngica possui grande variabilidade morfológica e fisiológica, pelo comportamento das culturas monocarióticas o qual deve permitir a realização do mapeamento genético aliando marcadores culturais, fisiológicos moleculares.

Nos trabalhos de controle em viveiro comercial, foi determinar que as parcelas experimentais usando mudas selecionadas ou grupos delas não foram satisfatórias para avaliar tratamentos em colonização natural pelo cogumelo amarelo, o qual possui coeficientes de variação maiores que 80%, impossibilitando a diferenciação. A resolução deste problema foi a produção de inoculo do fungo em milho pipoca autoclavado, para depois avaliar a colonização dos substratos para os diferentes tratamentos ou fatores em estudo, como foi realizado para a interação nitrito de sódio e uréia e para a determinação do efeito do intervalo de irrigação. Outro resultado foi a importância do controle biológico natural no controle do *L. birnbaumii* e outros basidiomicetos, pelo qual os potenciais agentes do controle devem ser avaliados como *Penicillium olsoni*.

Entre as espécies estudadas, observou-se que o *Leucocoprinus birnbaumii* está provocando prejuízos tanto em substratos à base de casca de pinus como de fibra de coco enquanto que *Gymnopilus dilepis* está restrito, no momento, à produção de fibra de coco. A detecção da falsa trufa (Agaricaceae *incertae sedis*) ocorreu em um único caso, demonstrando à grande diversidade de espécies que podem colonizar os substratos à base de casca de pinus ou fibra de coco, além de novas espécies que poderão ser detectadas causando problemas na produção de mudas cítricas. Por isso há uma necessidade de monitoramento e levantamento das espécies de macrofungos associados à produção de mudas e também nas áreas de produção de substrato; e que sejam realizados isolamentos e avaliando o potencial de risco deles, como foi observado para o cogumelo vermelho (*Gymnopilus dilepis*) e a falsa trufa.

Quanto à biodiversidade fúngica, ela é pouco conhecida e precisa ser avaliada quanto ao seu potencial biotecnológico, havendo várias espécies que não haviam sido confirmadas no Brasil (como *Gymnopilus dilepis* e *Gymnopus luxurians*) e no caso da falsa trufa até um novo gênero pode estar sendo descrito na família Agaricaceae e de hábito semi-hipógeo, com ocorrência natural. Nos levantamentos que vem ocorrendo há uma falta de associação com a caracterização molecular, pelo que podem ocorrer erros pela falta de material para comparação, como alterações de características que podem fazer identificações erradas ou mesmo levar a sugerir novas espécies, quando elas já foram descritas. A estimativa da diversidade dos fungos é amplamente discutida e acredita-se que os fungos são o segundo grupo com maior riqueza de espécies, atrás apenas dos insetos, sendo descritas 72.000 espécies fúngicas, porém acredita-se que esse número seja de 1,5 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 2001), sendo apenas conhecido 5% da diversidade. As micotecas devem iniciar a caracterização molecular com maior velocidade e com qualidade para aumentar o número de espécies caracterizadas pelo menos na região ribossomal, já que o GenBank possui uma grande falta de espécies, gêneros e até famílias em alguns casos, como no caso do Royal Botanic Gardens de Kew, no Reino Unido, onde 70% das sequências da região ITS disponíveis na micoteca eram novas ao serem depositadas (BROCK; DORING; BIDARTONDO, 2008). Assim, diminuindo as espécies redundantes e determinando o número de bases que podem ocorrer para cada espécie ou espécies de um gênero fúngico, facilitando a identificação molecular, principalmente nos trabalhos ambientais para ter uma melhor caracterização da diversidade fúngica existente nos diferentes habitats e ecossistemas tanto naturais como antrópicos. Este trabalho espera ter contribuído para o conhecimento dessa diversidade, enfatizando a taxonomia e os aspectos ecológicos dos representantes que ocorrem na produção de mudas cítricas a base de casca de pinus e fibra de coco.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, I.J.A. **Contribuição ao conhecimento da família Cortinariaceae Roze ex Heim (Agaricales) na Amazônia Brasileira**. 1984. 212 p. Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Universidade do Amazonas. Manaus, 1984.
- AGUILAR-VILDOSO, C.I.; ROSSI, M.L.; NOGUEIRA, N.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Associação de *Leucocoprinus birnbaumii* a problemas de desenvolvimento e viabilidade de mudas cítricas produzidas em viveiros telados. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, Supl., p. 82-82, Fev. 2006a.
- AGUILAR-VILDOSO, C.I.; ROSSI, M.L.; NOGUEIRA, N.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Caracterização de *Leucocoprinus birnbaumii* por microscopia de varredura. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 32, Supl., p. 82-82, Fev. 2006b.
- AGUILAR-VILDOSO, C.I.; ROSSI, M.L.; SASSERON, G.R.; NOGUEIRA, N.L. Isolamento, caracterização e patogenicidade de *Alternaria alternata citri* em tangerineiras. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, Supl., p. 109, Fev. 2004.
- AGUILAR-VILDOSO, C.I.; RIBEIRO, J.G.B.; FEICHTENBERGER, E.; GOES, A.; SPOSITO, M.B. **Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos citros**. Brasília: Ministério de Agricultura, Pecuária e abasteciemnto, 2002. 72 p.
- ALBEE-SCOTT, S. The phylogenetic placement of the Leucogastrales, including *Mycolevis siccigleba* (Cribbeaceae), in the Albatrellaceae using morphological and molecular data. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, n. 6, p. 653–662, June 2007.
- ALBUQUERQUE, M.P. de. **Fungos Agaricales em trechos de Mata Atlântica da Reserva Biológica do Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil**. 2006. 288 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) Escola Nacional de Botânica Tropical – ENBT/IPJBRJ. Rio de Janeiro, 2006.
- ALBUQUERQUE, M.P.de; VICTORIA, F.C.; PEREIRA, A.B. Ecologia e distribuição do gênero *Leucocoprinus* Pat. no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 28, n. 1, p. 11-16, Jan./Abr. 2006.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. New York:John Wiley & Sons, 1996. 868p.
- ALMEIDA, R.P.P.; BLUA, M.J.; LOPES, J.R.S.; PURCELL, A.H. Vector Transmission of *Xylella fastidiosa*: Applying Fundamental Knowledge to Generate Disease Management Strategies. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 98, n. 6, p. 775-786, Nov. 2005.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, Sept. 1997.

ANDRADE, M.C.N.de; KOPYTOWSKI FILHO, J.; MINHONI, M.T.A.; COUTINHO, L.N.; FIGUEIREDO, M.B. Productivity, biological efficiency, and number of *Agaricus blazei* mushrooms grown in compost in the presence of *Trichoderma* sp. and *Chaetomium olivacearum* contaminants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 243-247, Abr./June 2007.

ANISIMOVA, M.; GASCUEL, O. Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. **Systematic Biology**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 539-552, Aug. 2006.

ANKE, T.; OBERWINKLER, F.; STEGLICH, W.; HOFLE, G. The striatins – new antibiotics from *Cyathus striatus* (Hubs. ex PERS.) Willd. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 30, n. 3, p. 221-225, Mar. 1977.

AQUEVEQUE, P.; BECERRA, J.; PALFNER, G.; SILVA, M.; ALARCON, J.; ANKE, T.; STERNER, O. Antimicrobial activity of metabolites from mycelial cultures of Chilean Basidiomycetes. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Concepción, v.51, n.4, p.1059-1060, Dec. 2006.

BASEIA, I.G.; MILANEZ, A.I. *Crucibulum laeve* (Huds.) Kambly in cerrado vegetation of São Paulo, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 15, n. 1, p. 13-16, Jan./Abr. 2001a.

BASEIA, I.G.; MILANEZ, A.I. *Cyathus* (Gasteromycetes) in areas of the brazilian cerrado region, São Paulo State. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 80, n. 4, p. 493-502, Oct./Dec. 2001b.

BATISTA, A.C.; SOBRINHO, J.R.F.; MORAIS, J.O.F. de; BATISTA, O.C.; SILVA, E.; NETO, F.C. Micromicetos e *Streptomyces* da região do agreste e caatinga litorânea do estado da Paraíba, assinalados em 44 perfis de solos. **Publicações. Instituto de Micologia da Universidade de Pernambuco**, Recife, v. 527, p.1-11, 1970.

BELSKY, M.M.; GOLDSTEIN, S.; MENNA, M. Factors affecting phosphate uptake in the marine fungus *Dermocystidium* sp. **Journal of General Microbiology**, Stanford, v. 62, p. 399-402, 1970.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GOTTWALD, T.R.; LARANJEIRA, F.F. Spatial distribution of citrus canker in São Paulo, Brazil. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT DISEASE EPIDEMIOLOGY, 8., 2001, Ouro Preto. **Proceedings...**Ouro Preto: International Society of Plant Pathology, 2001. p. 28–29.

BEUGELSDIJK, D.C.M.; LINDE, S.VAN DER; ZUCCARELLO, G.C.; BAKKER, H.C.DEN; DRAISMA, S.G.A.; NOORDELOOS, M.E. A phylogenetic study of *Boletus* section *Boletus* in Europe. **Persoonia**, Utrecht, n.20, p.1–7, June 2008.

BONONI, V.L.R.; OLIVEIRA, A.K.M.DE; QUEVEDO, J.R.DE; GUGLIOTTA, A.M. Fungos macroscópicos do Pantanal do Rio Negro, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 489-511, Dez. 2008.

- BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. **In:** MATTOS JÚNIOR, D. DE; NEGRI, J.D.DE; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p.19-36.
- BOYLE, H.; ZIMDARS, B.; RENKER, C.; BUSCOT, F. A molecular phylogeny of *Hebeloma* species from Europe. **Mycological research**, Cambridge, v. 110. n. 4, p.369-380, Apr. 2006.
- BROCK, P.M.; DÖRING, H.; BIDARTONDO, M.I. How to know unknown fungi: the role of a herbarium. **New Phytologist**, London, v. 181, n. 3, p. 719–724, Feb. 2009.
- CAPELARI, M. **Agaricales do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (exceto Tricholomataceae)**. 1989. 356p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 1989.
- CAPELARI, M.; ZADRAZIL, F. Lignin degradation and *in vitro* digestibility of wheat straw treated with Brazilian tropical species of white rot fungi. **Folha microbiologica**, Secaucus, v. 42, n. 5, p. 481-487, Sept. 1997.
- CARVALHO, S.A. de; LARANJEIRA, F.F. Protótipo de viveiro de mudas certificadas e borbulheiras sob telado à prova de afídeos do Centro de Citricultura-IAC. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 15, p. 213-220, 1994.
- CARVALHO, S.A.; GRAF, C.C.D.; VIOLANTE, A.R. Produção de material básico e propagação. **In:** MATTOS JÚNIOR, D. DE; NEGRI, J.D.DE; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citrus**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. 2005. p.279-316.
- CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 540-552, Apr. 2000.
- CHAPELA, L.A. Evolucionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, Washington, v. 266, n. 5191, p.1691-1694, Dec. 1994.
- CHEVENET, F.; BRUN, C.; BAÑULS, A. L.; JACQ, B.; CHRISTEN, R. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of Trees. **BMC Bioinformatics**, London, v. 7, n. 439, p. 1-9, Oct. 2006.
- CLAMP, M.; CUFF, J.; SEARLE, S.M.; BARTON, G.J. The Jalview Java Alignment Editor. **Bioinformatics**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 426-427, Fev. 2004.
- COLETTA FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; MÜLLER, G.W.; SANTOS, F.A.; DORTA, S.O.; DE SOUZA, A.A.; ASTÚA-MONGE, G.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A. Citrus tristeza virus variant associated with citrus sudden death and its specific detection by RT-PCR. **In:** CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 16., 2005, Riverside. **Proceedings...** Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 2005. p. 499.

CORTEZ, V.G.; BASEIA, I.G.; GUERRERO, R.T. Additions to the mycobiota (Agaricales, Basidiomycetes) of Rio Grande do Sul, Brazil. II: The bird's nest fungus *Nidularia pulvinata* (Schwein.) Fr. **Biociências**, Porto Alegre, v. 14, n. 1, p. 15-18, June 2006.

CORTEZ, V.G.; COELHO, G. Additions to the mycobiota (Agaricales, Basidiomycetes) of Rio Grande do Sul, Brazil. **Iheringia**, Porto Alegre, v. 60, n. 1, p. 69-75, Jan./June 2005.

DERRICK, K.S.; TIMMER, L.W. Citrus blight and other diseases of recalcitrant etiology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 181-205, 2000.

DRECHSLER-SANTOS, E.R.; PASTORINI, L.H.; PUTZKE, J. Primeiro relato de fungos *Agaricales* em fragmento de mata nativa em Frederico Westphalen – RS. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 471-473, July 2007.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, Mar. 2004.

FAO Disponível em <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Acesso em: 10 de maio, 2009.

FAWCETT, H.S. **Citrus diseases and their control**. New York: McGraw-Hill, 1936. 656p.

FELL, J.W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 50, n. 3, p. 1351-1371, May 2000.

FEICHTENBERGER, E. Manejo ecológico de gomose de *Phytophthora* dos citros. São Paulo: Rhodia Agro, 1996. 42p.

FERRAREZI, R.S.; BATAGLIA, O.C.; FURLANI, P.R.; SCHAMMASS, E.A. Iron sources for citrus rootstock development grown on pine bark/vermiculite mixed substrate. **Scientia agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 5, p. 520-531, Sept./Oct. 2007.

FNP AGRIANUAL 2005. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo. 2005. 561p.

FNP AGRIANUAL 2009. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo. 2009. 495p.

FREEMAN, S.; HERRON, J.C. **Evolutionary analysis**. 4. ed. Boston: Pearson Benjamin Cummings. 834p. 2007.

FUNDECITRUS. MSC é doença transmissível: Fundecitrus consegue comprovação científica da transmissão e alerta para alastramento. **Revista do Fundecitrus**, Araraquara, v. 19, n. 116, p. 8-13, 2003.

GAMS, W.; AA, H.A. VAN DER; PLAATS-NITERINK, A.J. VAN DER; SAMSON, R.A.; STALPERS, J.A. **CBS course of mycology**. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 1987. 139p.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 113-118, Apr. 1993.

GHINI, R.; HAMADA, E. **Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 331p.

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R.B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, p. 93, 2001.

GLICK, P.G. **The mushroom trailguide**. New York: Henry Hold and Company. 1991. 247p.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; VIEIRA, M. L. C.; BARROSO, P. A. V.; AZEVEDO, J. L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 251-255, Abr. 2002.

GOCHEVA, Y.G.; TOSI, S.; KRUMOVA, E.TZ.; SLOKOSKA, L.S.; MITEVA, J.G.; VASSILEV, S.V.; ANGELOVA, M.B. Temperature downshift induces antioxidant response in fungi isolated from Antarctica. **Extremophiles**, Tokyo, v. 13, n. 2, p. 273–281, Mar. 2009.

GOTTWALD, T.R.; HUGHES, G.; GRAHAM, J.H.; SUN, X.; RILEY, T. The citrus canker epidemic in Florida: the scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species, **Phytopathology**, Palo Alto, v. 91, n. 1. p. 30–34, Jan. 2001.

GRIFFING, D.H. **Fungal physiology**. New York: Wiley-Liss. 1994. 458 p.

GUGLIOTTA, A. DE M.; CAPELARI, M. Taxonomia de basidiomicetos. **In: BONONI, V.L.R. Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do meio ambiente. 1998. p. 69-102.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, Oxford, v. 52, n. 5, p. 696–704, Oct. 2003.

GULDEN, G.; STENSRUD, O.; SHALCHIAN-TABRIZI, K.; KAUSERUD, H. *Galerina* Earle: A polyphyletic genus in the consortium of dark-spored agarics. **Mycologia**, Lancaster, v. 97, n. 4, p. 823–837, Apr. 2005.

GUZMÁN-DÁVALOS L. Further investigations on *Gymnopilus* (Agaricales, Cortinariaceae). A new section and a new species from Mexico. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 54, p. 117–124, Apr./June 1995.

GUZMÁN-DÁVALOS, L. Capítulo 5. Tropical brown- and Black-spored Mexican Agarics with Particular Reference to *Gymnopilus*. In: R. WATLING, J. C. FRANKLAND, A. M. AINSWORTH, S. ISAAC AND C. H. ROBINSON (Eds.). Tropical Mycology: Vol. 1. Macromycetes. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 61-72.

GUZMÁN-DÁVALOS, L.; MUELLER, G.M.; CIFUENTES, J.; MILLER, A.N.; SANTERRE, A. Traditional infrageneric classification of *Gymnopilus* is not supported by ribosomal DNA sequence data. **Mycologia**, Lancaster, v. 95, n. 6, p. 1204–1214, Nov./Dec. 2003.

GUZMÁN-DÁVALOS, L.; ORTEGA, A.; CONTU, M.; VIZZINI, A.; RODRÍGUEZ, A.; VILLALOBOS-ARÁMBULA, A. R.; SANTERRE, A. *Gymnopilus maritimus* (Basidiomycota, Agaricales), a new species from coastal psammophilous plant communities of northern Sardinia, Italy, and notes on *G. arenophilus*. **Mycological Progress**, Eching, v. 8, n. 3, p. 195–205, Aug. 2009.

HARITASH, A.K.; KAUSHIK, C.P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of hazardous materials**, Amsterdam, v. 169, n. 1-3, p. 1-15. Sept. 2009.

HARTMANN, A.; SCHMID, M.; TUINEN, D. van; BERG, G. Plant-driven selection of microbes. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 321, n.1-2, p.235–257, Aug. 2009.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revised. **Mycological research**, Cambridge, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, Dec. 2001.

HIBBETT, D.S. A phylogenetic overview of the Agaricomycotina. **Mycologia**, Lancaster, v. 98, n. 6, p. 917–925, Nov./Dec. 2006.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, O.E.; HUHNDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P.M.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, H.T.; LUTZONI, F.; MATHENY, P.B.; MCLAUGHLIN, D.J.; POWELL, M.J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W.; STALPERS, J.A.; VILGALYS, R.; AIME, M.C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.L.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P.W.; DAI, Y-C.; GAMS, W.; GEISER, D.M.; GRIFFITH, G.W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D.L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R.A.; HYDE, K.D.; IRONSIDE, J.E.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C.P.; LARSSON, K-H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J-M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASTO, E.; REEB, V.; ROGERS, J.D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J.P.; SCHÜBLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W.A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M.M.; WINKA, K.; YAO, Y-J; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, Cambridge, v. 111, n. 5, p. 509-547, May 2007.

HIBBETT, D.S.; PINE, E.M.; LANGER, E.; LANGER, G.; DONOGHUE, M.J. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. **Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.94, n.22, p.12002–12006, Oct. 1997.

HIBBETT, D.S.; TSUNEDA, A.; MURAKAMI, M. The Secotioid From of *Lentinus tigrinus*: Genetics and Development of a Fungal Morphological Innovation. **American Journal of Botany**, New York, v. 81, n. 4, p. 466-478, Apr. 1994.

IPCC. **Climate change 2007: the physical science basis – Summary for policymakers**. Geneva: Intergovernmental Panel on climate change, 2007. 18p. (IPCC Assessement Report 4).

JAMES, T.Y.; KAUFF, F.; SCHOCH, C.L.; MATHENY, P.B.; HOFSTETTER, V.; COX, C.J.; CELIO, G.; GUEIDAN, C.; FRAKER, E.; MIADLIKOWSKA, J.; LUMBSCH, H.T.; RAUHUT, A.; REEB, V.; ARNOLD A. E.; AMTOFT, A.; STAJICH, J.E.; HOSAKA, K.; SUNG, G.-H.; JOHNSON, D.; O'ROURKE, B.; CROCKETT, M.; BINDER, M.; CURTIS, J.M.; SLOT, J.C.; WANG, Z.; WILSON, A.W.; SCHÜBLER, A.; LONGCORE, J.E.; O'DONNELL, K.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; PORTER, D.; LETCHER, P.M.; POWELL, M.J.; TAYLOR, J.W.; WHITE, M.M.; GRIFFITH, G.W.; DAVIES, D.R.; HUMBER, R.A.; MORTON, J.B.; SUGIYAMA, J.; ROSSMAN, A.Y.; ROGERS, J.D.; PFISTER, D.H.; HEWITT, D.; HANSEN, K.; HAMBLETON, S.; SHOEMAKER, R.A.; KOHLMAYER, J.; VOLKMANN-KOHLMEYER, B.; SPOTTS, R.A.; SERDANI, M; CROUS, P.W.; HUGHES, K.W.; MATSUURA, K.; LANGER, E.; LANGER, G.; UNTEREINER, W.A.; LÜCKING, R.; BÜDEL, B.; GEISER, D. M.; APTROOT, A.; DIEDERICH, P.; SCHMITT, I.; SCHULTZ, M.; YAHR, R.; HIBBETT, D.S.; LUTZONI, F.; MCCLAUGHLIN, D.J.; SPATAFORA, J.W.; VILGALYS, R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, London, v. 443, n. 7113, p. 818-822, Oct. 2006.

JENNINGS, D.H.; LYSEK, G. **Fungal biology: Understanding the fungal lifestyle**. Guildford: BIOS Scientific Publishers. 1996. 156p.

KALAC, P.; SVOBODA, L. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 273-281, May 2000.

KANG, H.-S.; KIM, K.-R.; JUN, E.-M.; PARK, S.-H.; LEE, T.-S.; SUH, J.-W.; KIM, J.-P. Cyathuscavins A, B, and C, new free radical scavengers with DNA protection activity from the Basidiomycete *Cyathus stercoreus*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Berlin, v. 18, n.14, p. 4047–4050, July 2008.

KARSTEDT, F.; STÜRMER, S.L. Agaricales em áreas de Floresta Ombrófila Densa e plantações de *Pinus* no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Acta botânica brasileira**, São Paulo, v. 22, n. 4, p. 1036-1043, Out./Dez. 2008.

KARUNANANDAA, K.; FALES, S.L.; VARGA, G.A.; ROYSE, D.J. Chemical composition and biodegradability of crop residues colonized by white-rot fungi. **Journal of the science of food and agriculture**, London, v. 68, n. 1, p. 91-98, May 1995.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes orgânicos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1985. 492p.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; DAVID, J.C.; STALPERS, J.A. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of fungi**. 9th ed. Wallingford: CAB International. 2001. 655p.

KUMAR, K.C.S.; MÜLLER, K. Depsides as non-redox inhibitors of leukotriene B4 biosynthesis and HaCaT cell growth, 2. Novel analogues of obtusatic acid. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 35, n. 4, p. 405–411, Apr. 2000.

LARANJEIRA, F.F.; FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B. Manejo integrado de doenças de citros. **In**: MATTOS JÚNIOR, D. DE; NEGRI, J.D.DE; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citrus**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. 2005a. p. 629-654.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L. BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLETTA FILHO, H.D. Capítulo 18. Fungos, procariotos e doenças abióticas. **In**: MATTOS JÚNIOR, D. DE; NEGRI, J.D.DE; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citrus**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. 2005b. p. 509-566.

LATIFF, L.A.; DARAN, A.B.M.; MOHAMEDB, A.B. Relative distribution of minerals in the pileus and stalk of some selected edible mushrooms. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.56, n.2, p. 115-121, 1996.

LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H.; HOOKER, M.E.; DERRICK, K.S. Citrus variegated chlorosis: confirmation of *Xylella fastidiosa* as the causal agent. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.19, p.123-125, 1993.

LEE, R.F.; MARAIS, L.J.; TIMMER, L.W. & GRAHAM, J.H. Syringe injection of water into the trunk: a rapid diagnostic test for citrus blight. **Plant Disease**, Palo Alto, v. 68, p. 511-513, June 1984.

LEMOS, R.N.S. de; SILVA G.S. da; ARAUJO, J.R.G.; CHAGAS, E.F. das; MOREIRA, A.A.; SOARES, A.T.M. Occurrence of *Aleuricanthus woglumi* Ashby (Hemiptera : Aleyrodidae) in the state of Maranhao, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 558-559, July/Ago. 2006.

LI, W.H. **Molecular evolution**. Sunderland: Sinauer Associates. 1997. 487p.

LIU, X. ; WANG, J.; GOU, P.; MÃO, C.; ZHU, Z-R.; LI, H. *In vitro* inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 223–229, Oct. 2007.

LIU, Y-J.; ZHANG, K-Q. Antimicrobial activities of selected *Cyathus* species. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 157. n. 2, p. 185–189, Fev. 2004.

LODGE, D.J.; CANTRELL, S. Fungal communities in wet tropical variation in time and space. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.73, sup. 1, p.S1391-S1398, 1995.

LUMBSCH, H.T.; HUHNDORF, S.M. Outline of Ascomycota – 2007. **Myconet**, Chicago, v.13, p.1-58, Dec. 2007.

LV, P.-C.; XIAO, Z.-P.; FANG, R.-Q.; LI, H.-Q.; ZHU, H.-L.; LIU, C.-H. Synthesis, characterization and structure-activity relationship analysis of novel depsides as potential antibacterials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 44, n. 4, p.1779-1787, Abr. 2009.

MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M.C.; GREGGIO, C.C.; PIAZZA, J.P.; KAMLA, R.F.; ZACHARIAS, P.R.A.; BAR-JOSEPH, M.; KITAJIMA, E.W.; ASSUMPCÃO, L.C.; CAMAROTTE, G.; CARDOZO, J.; CASAGRANDE, L.C.; FERRARI, F.; FRANCO, S.F.; GIACHETTO, P.F.; GIRASOL; JORDÃO JÚNIOR, H.; SILVA, V.H.A.; SOUZA, L.C.A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; ZANCA, A.S.; ARRUDA, P.; KITAJIMA, J.P.; REINACH, F.C.; FERRO, J.A.; SILVA, A.C.R. Identification and genomic characterization of a new virus (*Tymoviridae* Family) associated with citrus sudden death disease. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, p. 3028-3037, Mar. 2005.

MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTI, V.; PIZZO-FERRATO, L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 65, n.4, p. 477-482, June 1999.

MAPA Instrução Normativa 28. Anexo. Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e minerais, orgânicos, organo-minerais e corretivos. **Diário Oficial**, Brasília, 27 de julho de 2007. 141p.

MARTINS, T. C. G.; NADAI FERNANDES, E. A. DE; FERRARI, A. A.; TAGLIAFERRO, F. S.; BACCHI, M. A. Chemical characterization of agricultural supplies applied to organic tomato cultivation. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, New York, v. 278, n. 2, p. 517-520, Nov. 2008.

MATA J.L., HUGHES K.W., PETERSEN R.H. Phylogenetic placement of *Marasmiellus juniperinus*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 45, n. 3, p. 214-221, June 2004.

MAY, L.L.; GHINI, R.; KIMATI, H. Solarização e *Trichoderma* para o controle de *Phytophthora parasitica* em mudas cítricas. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, n. 2, p. 395-409, 2001

MILLER O.K., VOLK T.J., BESSETTE A.E. A new genus, *Leucopholiota*, in the Tricholomataceae (Agaricales) to accommodate an unusual taxon. **Mycologia**, Lancaster, v.88, n.1, p.137-139, Jan./Fev. 1996.

MONCALVO, J.-M.; VILGALYS, R.; REDHEAD, S.A.; JOHNSON, J.E.; JAMES, T.Y.; AIME, M.C.; HOFSTETTER, V.; VERDUIN, S.J.W.; LARSSON, E.; BARONI, T.J.; R.; THORN, G.; JACOBSSON, S.; CLÉMENÇON, H.; MILLER, O.K.Jr. One hundred and seventeen clades of euagarics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.23, p. 357-400, 2002.

MÜLLER, G.W.; DE NEGRI, J. D.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MATTOS JR., D.; POMPEU JR., J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; MACHADO, M. A.; CARVALHO, S. A.; GIROTTI, L. F. Quick blight of sweet orange: a new citrus disease in Brazil. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGIST, 15., 2001, Paphos. **Abstracts...** Paphos: International Citrus Virologist, 2001. p.100.

MÜLLER, G.W.; NEGRI, J.D. de; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MATTOS JÚNIOR, D.; POMPEU JUNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; CARVALHO, S.A.; GIROTTO, L.F.; MACHADO, M.A. Morte súbita dos citros: uma nova doença na citricultura barsileira. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 2, p. 371-386, 2002.

MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A.de; RODRIGUES, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. **In:** MATTOS JÚNIOR, D. de; NEGRI, J.D.de; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. 2005. p. 567-604.

NASCIMENTO, J.S.; EIRA, A.F. Occurrence of the false truffle (*Diehliomyces microsporus* Gilkey) and damage on the himematsutake medicinal mushroom (*Agaricus brasiliensis* S. Wasser *et al.*). **Internacional Journal Medicinal Mushrooms**, Redding, v.5, n.1, p.87-94, 2003.

NCBI - National Center for Biotechnology Information, Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> acesso em 06 de setembro, 2009.

NEAMATI, N.; HONG, H.; MAZUMDER, A.; WANG, S.; SUNDER, S; NICKLAUS, M.C.; MILNE, G.W.A.; PROKSA, B.; POMMIER, Y. Depsides and Depsidones as Inhibitors of HIV-1 Integrase: Discovery of Novel Inhibitors through 3D Database Searching. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v.40, p.942-951, 1997.

OLIVEIRA, M.R.V.; SILVA, C.C.A.; NAVIA, D. **Mosca negra dos citros *Aleurocanthus woglumi***: Alerta quarentenário. Brasília: Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2001. 12p.

PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; GARCIA JUNIOR., A.; BERETTA, M.J.G.; HAKAKAWA, R.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L.O.S. Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 23, p. 46-49, 1997.

PATERSON, R.R.M.; BRIDGE, P.D. **Biochemical techniques for filamentous fungi**. Surrey: CAB internacional. 1994. 125p. (IMI technical handbooks 1)

PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. North Ryde: CSIRO. 1985. 187p.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. **In:** MATTOS JÚNIOR, D. DE; NEGRI, J.D.DE; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citrus**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. 2005. p. 61-104.

POMPEU JUNIOR, J.; SALVA, R.; BLUMER, S. Copas e porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas do Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v.25, n.2, p.413-426, 2004

PORTER, T.M.; SKILLMAN, J.E.; MONCALVO, J.-M. Fruiting body and soil rDNA sampling detects complementary assemblage of Agaricomycotina (Basidiomycota, Fungi) in a hemlock-dominated forest plot in southern Ontario. **Molecular Ecology**, Oxford, v.17, p.3037-3050, 2008.

- POULSEN, M.; BOOMSMA, J.J. Mutualistic fungi control crop diversity in fungus-growing ants. **Science**, Washington, v.307, p.741-744, 2005.
- PRATES, H.S.; NAKANO, O.; GRAVENA, S. “**Minadora das folhas de citros**” *Phyllocnistis citrella*, Stainton, 1856. Campinas: CATI. 1996. (Comunicado Técnico, 129).
- PRUETT, G.E.; BRUHN, J.N.; MIHAIL, J.D. Greenhouse production of Burgundy truffle mycorrhizae on oak roots. **New Forests**, Dordrecht, v. 37, n. 1, p. 43–52, Jan. 2009.
- PURCELL, A.H.; FINLAY, A.H. Evidence for noncirculative transmission of Pierce’s disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. **Phytopathology**, Lancaster, v.69, p.393-395, 1979.
- PUTZKE, J. Lista dos fungos Agaricales (Hymenomycetes, Basidiomycotina) referidos para o Brasil. **Caderno de Pesquisa**, série Botânica, Porto Alegre, v.6, n.2, p.1–189, 1994.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Glossário ilustrado de micologia**. Santa cruz do Sul: Edunisc, 2004a. 152p.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2004b. v.1, 605p.
- RADIN, B.; WOLFF, V.R.S.; LISBOA, B.B.; WITTER, S; SILVEIRA, J.R.P. *Bradysia* sp. em morangueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n.2, p. 547-550. mar./abr. 2009.
- REES, B.J.; STRID, A. Relationships between Australian and northern hemisphere *Gymnopilus* species 1: new species and common misconceptions regarding earlier names. **Australasian mycologist**, Dunedin, v.20. n.1, p. 30-49, 2001.
- REES, B.J.; MARCHANT, A. ZUCCARELLO, G.C. A tale of two speceis – possible origins of red to purple-coloured *Gymnopilus* species in Europe. **Australasian Mycologist**, Dunedin, v.22., n.2. p. 57-72, 2004.
- REES, B.J.; ORLOVICH, D.A. MARKS, P.B.D. Treading the fine line between small-statured *Gymnopilus* and excentrically stipitate *Galerina* species in Australia. **Mycological research**, Cambridge, v. 103, n.4, p. 427-442, Apr. 1999.
- REES, B.J.; ZUCCARELLO G.C.; ORLOVICH D.A. Relationships between Australian and northern hemisphere *Gymnopilus* species II. A preliminary phylogeny of species of *Gymnopilus* and related genera based on internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA. **Mycotaxon**, Ithaca, v.84, p.93–110, Oct./Dec. 2002.
- RICH, S.M.; LEENDERTZ, F.H.; XU, G.; LEBRETON, M.; DJOKO, C.F.; AMINAKE, M.N.; TAKANG, E.E.; DIFFO, J.L.D.; PIKE, B.L.; ROSENTHAL, B.M.; FORMENTY, P.; BOESCH, C.; AYALA, F.J.; WOLFE, N.D. The origin of malignant malaria. **Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.106, n.35, p.14902-14907, Sept. 2009.

ROBBERTSE, B.; REEVES, J.B.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W. A phylogenomic analysis of the Ascomycota. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v. 43, n. 10, p. 715–725, Oct. 2006.

RODRIGUES, A.A.C.; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 532-537, Sept./Oct. 2002.

RODRIGUEZ, O.; ROSSETTI, V.; MÜLLER, G.W.; MOREIRA, C.S.; PRATES, H.S.; DE NEGRI, J.D. & GREVE, A. Declínio de plantas cítricas em São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Sociedade brasileira de fruticultura. 1979. p.927-932.

ROKAS, A.; WILLIAMS, B.L.; KING, N.; CARROLL, S.B. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. **Nature**, London, v.425, 798-804, Oct. 2003.

ROMÁN, M.P.; CAMBRA, M.; JUÁREZ, J.; MORENO, P.; DURAN-VILA, N.; TANAKA, F.A.O.; ALVES, E.; KITAJIMA, E.W.; YAMAMOTO, P.T.; BASSANEZI, R.B.; TEIXEIRA, D.C.; JESUS JÚNIOR, W.C.; AYRES, A.J.; GIMENES-FERNANDES, N.; RABENSTEIN, GIOTTO, L.F.; BOVÉ, J.M. Sudden death of citrus in Brazil: A graft-transmissible bud union disease. **Plant Disease**, St Paul, v.88, n.5, p.453-467, May 2004.

ROSA, L.H.; MACHADO, K.M.G.; RABELLO, A.L.T.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L. Cytotoxic, immunosuppressive, trypanocidal and antileishmanial activities of Basidiomycota fungi present in Atlantic Rainforest in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.95, n. 3, p.227–237, Mar. 2009.

ROSSETTI, V. Citrus canker in Latin America: a review. **Proceedings International Society of Citriculture**, Florida, v.3, p. 918–924, 1977.

ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVE, J.M.; BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.R.; QUAGGIO, J.A.; DE NEGRI, J.D. Presence de bacteries dans le xyleme d'orangers atteints de chlorose variege, une nouvelle maladie des agrumes au Bresil. **Comptés Rendus de l' Académie des Sciences. Series III Sciences de la Vie**, Paris, v.30, p.345-349, 1990.

ROZEN S.; SKALETISKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER S. (Eds). **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press. 2000. p. 365-386.

RUDAWSKA, M.; LESKI, T. Macro- and microelement contents in fruiting bodies of wild mushrooms from the Notecka forest in west-central Poland. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 92, n.3, p. 499–506, Sept. 2005.

RUSCHELL, J.; CARMELLO, Q.A.D.; BERNARDI, A.C.D.; CARVALHO, S.A. de; MATTOS Jr., D. Leaf nutrient contents of Rangpur lime rootstock as affected by N, P, KCa and S fertilization. **Scientia agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 5, p. 501-506, Mar./Apr. 2004.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food- and airborne fungi**. Utrecht: CBS. 2000. 389p.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; FATMI, M.B.; CHANG, C.J. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp *piercei*, subsp nov., *X. fastidiosa* subsp *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp *pauca* subsp nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 290-300, 2004.

SEBASTIANES, F.L.S.; MAKI, C.S.; ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Genetic variability and vegetative compatibility of *Erythricium salmonicolor* isolates. **Scientia agricola**, Piracicaba, v.64, n.2, p.162-168, Mar./Apr. 2007.

SILVA, N.A.; VILLELA, P.M.S.; BOSCHIERO, C.; ANDRADE, J.L.F.; COUTINHO, L.L. Método alternativo de purificação de produto de PCR para sequenciamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador. **Resumos...** Salvador: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. p. 409.

SILVEIRA, V.D. **Micologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. 336p.

SINGER, R. Adaptation on higher fungi to varzea conditions. **Amazoniana**, Manaus, v. 8, n. 3, p. 311-319, 1984.

SINGER, R. **The Agaricales in modern taxonomy**. 4th ed. Koenigstein: Koeltz Scientific Books, 1986. 981 p.

SOBESTIANSKY, G. Contribution to a Macromycete Survey of the States of Rio Grande do Sul and Santa Catarina in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**; Curitiba, v.48, n.3, p.437-457, May 2005.

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

TALAVERA, G.; CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**, Oxford, v.56, p.564-577, 2007.

TRANCHIMAND, S.; ERTEL, G.; GAYDOU, V.; GAUDIN, C.; TRON, T.; IACAZIO, G. Biochemical and molecular characterization of a quercetinase from *Penicillium olsonii*. **Biochimie**, Amsterdam, v.90, p. 781-789, May 2008.

ULLOA, M.; HANLIN, R.T. **Illustrated dictionary of mycology**. St. Paul: APS Press. 2000. 448p.

VAHIDI, H.; MOJAB, F.; TAGHAVI, N. Effects of carbon sources on growth and production of antifungal agents by *Gymnopilus spectabilis*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, Tehran, v.3; p.219-222, 2006.

VEGA, F.E.; POSADA, F.; PETERSON, S.W.; GIANFAGNA, T.J.; CHAVES, F. *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. **Mycologia**, Lancaster, v. 98, n. 1, p. 31–42, Jan./Fev. 2006.

VILLESEN, P.; MUELLER, U.G.; SCHULTZ, T.Z.; ADAMS, M.M.; BOUCK, A.C. Evolution of ant-cultivar specialization and cultivar switching in *Apterostigma* fungus-growing ants. **Evolution**, Lancaster, v. 58, n.10, p. 2252–2265, Oct. 2004.

WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 60, p. 258–274, 2002.

WATERHOUSE, A.M.; PROCTER, J.B.; MARTIN, D.M.A.; CLAMP, M.; BARTON, G.J. Jalview version 2: A Multiple Sequence Alignment and Analysis Workbench. **Bioinformatics**, Oxford, v.25, n.9, p. 1189–1191, 2009.

WHITE T.J., BRUNS T.D., LEE S., TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J., WHITE T.J., Eds. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p.315–322.

WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. **Compendium of citrus diseases**. St. Paul:APS Press, 1988. 80p.

WILSON, A.W.; DESJARDIN, D.E. Phylogenetic relationships in the gymnopoid and marasmioid fungi (Basidiomycetes, euagarics clade). **Mycologia**, Lancaster, v.97, n.3, p. 667–679, May/June 2005.

WRIGHT, J.E.; WRIGHT, A.M. Catálogo de los hongos del Parque Nacional Iguazú (Misiones, Argentina). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, Córdoba, v. 40, n. 1–2, p. 23–44, 2005.

YODER, A.D.; OLSON, L.E.; HANLEY, C.; HECKMAN, K.L.; RASOLOARISON, R.; RUSSELL, A.L.; RANIVO, J.; SOARIMALALA, V.; KARANTH, K. P.; RASELIMANANA, A.P.; GOODMAN, S.M. A multidimensional approach for detecting species patterns in Malagasy vertebrates. **Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, sup. 1, p. 6587–6594, May 2005.

ZAMPIERI, E; MELLO, A.; BONFANTE, P.; MURAT, C. PCR primers specific for the genus *Tuber* reveal the presence of several truffle species in a truffle-ground. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 297, n.1, p.67–72, May 2009.

ZHAO, R.-L.; DESJARDIN, D.E.; SOYTONG, K.; HYDE, K.D. A new species of bird's nest fungi: characterisation of *Cyathus subglobisporus* sp. nov. based on morphological and molecular data **Persoonia**, Utrecht, v. 21, p. 71–76, Dec. 2008.

ZHAO, R.L.; JEEWON, R.; DESJARDIN, D.E.; SOYTONG, K.; HYDE, K.D. Ribosomal DNA phylogenies of *Cyathus*: Is the current infrageneric classification appropriate?. **Mycologia**, Lancaster, v. 99, n. 3, p. 385–395, May/June 2007.