

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

***Geastrum lloydianum* E *G. subiculosum*: GERMINAÇÃO DE ESPOROS,
OBTENÇÃO DE CULTURAS MONOCARIÓTICAS E DICARIÓTICAS
E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO MICELIAL *in vitro***

MARCOS DIONES FERREIRA SANTANA

Manaus, Amazonas

Junho, 2015

MARCOS DIONES FERREIRA SANTANA

***Geastrum lloydianum* E *G. subiculosum*: GERMINAÇÃO DE ESPOROS,
OBTENÇÃO DE CULTURAS MONOCARIÓTICAS E DICARIÓTICAS
E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO MICELIAL *in vitro***

Orientadora: Dra. Noemia Kazue Ishikawa (INPA)

Coorientador: Dr. Iuri Goulart Baseia (UFRN)

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Botânica.

Manaus, Amazonas

Junho, 2015

S232 Santana, Marcos Diones Ferreira

Geastrum lloydianum e *G. subiculosum*: germinação de esporos, obtenção de culturas monocarióticas e dicarióticas e condições de crescimento micelial *in vitro* / Marcos Diones Ferreira Santana. --- Manaus: [s.n.], 2015.

71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2015.

Orientador : Noemia Kazue Ishikawa.

Coorientador : Iuri Goulart Baseia.

Área de concentração : Botânica Aplicada.

1. Germinação de esporos. 2. Crescimento Micelial. 3. Geastraceae.
I. Título.

CDD 589.2

Sinopse:

Estudou-se as condições de crescimento micelial *in vitro* de duas espécies do gênero *Geastrum* sob diferentes meios de cultura, temperaturas, pHs e estado de agitação. A germinação *in vitro* dos basidiósporos foi obtida para as duas espécies. O cruzamento entre monocários para cada espécie em condições de laboratório foi relatada.

Palavras-chave: crescimento micelial, micélio monocariótico, Geastraceae, basidiomiceto.

À minha mãe,
Maria Pedro Alves,
Por todo amor, compreensão e incentivo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu forças durante toda a caminhada e por permitir que esse sonho se realizasse.

A minha mãe Maria Pedro Alves, razão de todo esse esforço, por todos os momentos de apoio, incentivo e principalmente, por toda confiança durante esse tempo longe de casa. De uma forma geral, a toda a família que esteve presente em forma de apoio para eu pudesse continuar diante de todas as dificuldades que encontrei.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), que através de sua estrutura física e quadro profissional contribuiu para a minha formação acadêmica de forma significativa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGBot), pela formação que recebi, pela estrutura física e principalmente, pela excelente equipe que compõem a Botânica do INPA hoje, de forma carinhosa, a todos os professores pelos ensinamentos e conselhos. A Neide, Leia e Dona Carminha, que sempre me ajudaram e me deram muito apoio para continuar estudando. A Dona Socorro, lotada no campus III do INPA e toda sua equipe, pelo café de todos os dias, pelas palavras de incentivo e por deixar a sala de estudos e o laboratório sempre em condições de uso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e ao Programa Nacional de Apoio e Desenvolvimento da Botânica (PNADB), pelo apoio financeiro durante essa jornada. Também agradeço ao Herbário INPA por receber minhas exsiccatas e pelo suporte técnico e ao Laboratório de Microscopia Ótica e Eletrônica do campus II do INPA, pelas imagens e pelo acompanhamento técnico que contribuíram de forma significativa com esta pesquisa.

A Dra. Noemia Kazue Ishikawa, pela orientação durante o mestrado, pelos ensinamentos e por sua paciência. Ao Dr. Iuri Goulart Baseia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), que me aceitou como seu coorientado e pelo auxílio na identificação das espécies. A Bianca Denise Barbosa da Silva e Thiago Accioly de Souza, ambos do Departamento de Botânica e Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), pela identificação das espécies.

A Dra. Ruby Vargas-Isla, por todo auxílio no laboratório. A Tiara Sousa Cabral pela ajuda com a filogenia das espécies. A Dra. Cristina Sayuri Maki da Universidade Federal do

Amazonas (UFAM), por me receber em seu laboratório e me orientou quanto aos procedimentos de extração, purificação e amplificação do DNA das espécies que estudei. Agradeço também a sua aluna, Janaina da Costa Nogueira, pelo auxílio e acompanhamento. Ao Professor Taidés Tavares dos Santos da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), pelo incentivo e por suas relevantes contribuições ao meu trabalho. Ao Professor Rodrigo Fadini e a Jarlei Dominique, ambos da UFOPA, pela ajuda com a tradução. Ao Professor Ulisses Brigato Albino da Universidade Federal do Pará (UFPA), campus Universitário de Altamira, pelos inúmeros conselhos que me fizeram continuar nessa jornada. A Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), pelo acolhimento, compreensão e estímulo.

Aos amigos e colegas que fiz na cidade de Manaus-AM, aos amigos da Botânica, principalmente, a turma 2013 pelo carinho, companheirismo e pelos inúmeros abraços nos momentos difíceis, em especial a Ednéia, Anna e Jucimara que dividiram comigo muitos momentos bons e ruins. Ao técnico João Victor do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do campus III do INPA, obrigado. Também agradeço aos amigos Filipe e Hudson e as meninas Super Poderosas: Luciana (Docinho), Yasmim (Lindinha) e a Thaís (Florzinha), pela tremenda força com a rotina do laboratório e em meus experimentos, pela amizade e principalmente pelo carinho e bons momentos que me proporcionaram. Sem sobra de dúvidas o trabalho não seria o mesmo sem vocês.

A todos que de alguma forma contribuíram para que esse sonho se realizasse.

MUITO OBRIGADO.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

O grande número de espécies do gênero *Geastrum*, família Geastraceae, bem como a grande semelhança morfológica entre as espécies desse gênero, tornam o processo de identificação bastante complexo, principalmente em regiões onde o número de taxonomistas é bastante reduzido, como na Amazônia. Diante da alta diversidade desse grupo e do pouco conhecimento disponível sobre seu crescimento e desenvolvimento em condições de laboratório, este trabalho apresenta métodos em condições ótimas de cultivo micelial de *G. lloydianum* e *G. subiculosum*, que foram selecionadas por serem espécies de ocorrência comum e por ocorrerem em todo período de estudo. O isolamento do micélio monocariótico a partir da germinação dos basidiósporos e os cruzamentos *in vitro* dos monocários para cada espécie é apresentado com o objetivo de contribuir para a compreensão da biologia e dinâmica entre estas espécies. O meio de cultura Batata Dextrose Ágar-preparado é indicado para o cultivo das duas espécies, com temperatura ótima de incubação a 30°C, em modo estacionário e pH 7. Esse mesmo meio de cultivo também é indicado para a germinação *in vitro* dos basidiósporos das duas espécies, sendo a germinação observada a partir de 35 dias de incubação, a 25°C, sem iluminação. A compatibilidade entre as culturas monocarióticas para as duas espécies foi confirmada pela presença de grampos de conexão no micélio resultante após pareamento, assim como pela similaridade molecular entre as amostras de micélio dicariótico oriundas do basidioma e amostras de micélio dicariótico resultante dos pareamentos compatíveis. Este estudo viabiliza futuros trabalhos envolvendo a compatibilidade sexual para o grupo e com isso, o que pode vir a tornar-se uma ferramenta útil para taxonomia pela comprovação de espécie biológica para o gênero *Geastrum*.

Palavras-chave: cultivo micelial, germinação de esporos, monocários, cruzamentos

ABSTRACT

The large number of species of the genus *Geastrum*, family Geastraceae, as well as the high morphological similarity among the species, make the identification process very complex, mainly in regions where the number of taxonomists is scarce, as in the Amazon. Due to the high diversity of this group and the few information about its growth and development in laboratory conditions, this work presents methods in ideal conditions of mycelial cultivation of *G. lloydianum* and *G. subiculosum*, species of common occurrence and occur the study period. The isolation of the monokaryotic mycelium after germination of its basidiospores and the mate *in vitro* for each species is presented in order to contribute to the understanding of the biology and dynamics of these species. The mean of culture Potato Dextrose Agar-prepared is indicated to the cultivation of both species, with good incubation temperature at 30°C in stationary mode, with pH 7. This mean of culture is also indicated to the germination *in vitro* of the basidiospores from the two species that started with 35 days of incubation at 25°C, without illumination. The compatibility among the isolated monokaryotics cultures of both species through *in vitro* mating was confirmed by observing the clamp connection on the resulting mycelium after pairing, the molecular similarity between samples of dikaryotic mycelium originated from basidiocarp, as well as the resulting dikaryotic mycelium samples observed after mating. This study enables future work involving to sexual compatibility studies, becoming a useful tool to taxonomy and providing evidence of a biological species in the genus *Geastrum*.

Keywords: mycelial cultivation, spore germination, monokaryotic mycelium, mate

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Aspectos gerais sobre os fungos	17
1.2. Os fungos Gasteromicetos	19
1.3. O gênero <i>Geastrum</i>	20
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Coleta dos macrofungos.....	26
3.2. Identificação morfológica dos macrofungos.....	27
3.3. Obtenção da cultura micelial dicariótica.....	28
3.4. Determinação das condições do cultivo micelial.....	28
3.4.1. Avaliação do meio de cultura no crescimento micelial.....	28
3.4.2. Avaliação do efeito da temperatura no crescimento micelial	30
3.4.3. Avaliação da agitação do meio líquido no crescimento micelial	30
3.4.4. Efeito do pH inicial do meio de cultura no crescimento micelial	31
3.5. Germinação <i>in vitro</i> dos basidiósporos e isolamento do micélio monocariótico	31
3.5.1. Percentual de germinação de basidiósporos de <i>Geastrum subiculosum</i>	32

3.6. Compatibilidade entre os micélios monocarióticos	33
3.7. Extração do DNA.....	33
3.7.1. Amplificação do rDNA e quantificação do DNA	34
3.8. Análise estatística	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Deposição dos espécimes em Herbário.....	36
4.2. Descrição das espécies.....	37
4.2.1. <i>Geastrum lloydianum</i> Rick, Brotéria	37
4.2.2. <i>Geastrum subiculosum</i> Cooke & Masee.....	37
4.3. Avaliação do meio de cultura no crescimento micelial	40
4.4. Avaliação do efeito da temperatura no crescimento micelial	43
4.5. Avaliação da agitação do meio líquido no crescimento micelial.....	48
4.6. Efeito do pH inicial do meio de cultura no crescimento micelial.....	49
4.7. Germinação <i>in vitro</i> dos basidiósporos e isolamento do micélio monocariótico	50
4.7.1. Percentual de germinação <i>in vitro</i> de basidiósporos de <i>Geastrum subiculosum</i>	56
4.8. Pareamento <i>in vitro</i> do micélio monocariótico.....	57
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
6. BIBLIOGRAFIA CITADA.....	62
7. ANEXO	70
7.1. Parecer da Aula de qualificação.....	70
7.2. Ata da defesa pública da dissertação	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Herbários onde as espécies *Geastrum lloydianum* (◆) e *G. subiculosum* (●) encontram-se depositadas assim como número de registro por herbário e a Unidade Federativa em que as espécies foram coletadas. Informações retiradas do banco de dados *Species Links* (www.splink.org.br 2014).22
- Figura 2.** Índice de precipitação mensal (mm) para os anos de 2013 e 2014 para a região de Manaus, AM. Dados do Instituto Nacional de Meteorologia (www.inmet.gov.br 2015).26
- Figura 3.** Coleta e fotodocumentação de basidiomas de fungos do gênero *Geastrum*. A) Basidiomas de *G. lloydianum* em campo. B) Basidiomas de fungos gasteroides acondicionados em caixa plástica compartimentada. C) Basidiomas de *G. subiculosum* em diferentes fases de desenvolvimento.27
- Figura 4.** *Geastrum lloydianum*. A) Basidioma imaturo e expandido. B) Ostíolo (seta). C) Apófise (seta). D) Basidiósporos.....39
- Figura 5.** *Geastrum subiculosum*. A) Basidioma imaturo e expandido em campo. B) Gleba exposta e subículo. C) Ostíolo (seta). D) Basidiósporos.39
- Figura 6.** Isolados de *Geastrum subiculosum* e *G. lloydianum* em placa de Petri (90 mm Ø) após 40 dias de incubação em diferentes meios de cultura a 25°C, no escuro. BDA-p = batata dextrose ágar-preparado; BDA-c = batata dextrose ágar-comercial; SDA = Sabouraud dextrose ágar; EMPA = extrato de malte peptona ágar.40
- Figura 7.** Diâmetro da colônia (mm) após 40 dias de incubação de isolados de *Geastrum lloydianum* (□) e *G. subiculosum* (■) em diferentes meios de cultura a 25°C, no escuro. BDA-p = batata dextrose ágar-preparado; BDA-c = batata dextrose ágar-comercial; DAS = Sabouraud dextrose ágar; EMPA = extrato de malte peptona ágar. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre os isolados e as letras maiúsculas a comparação entre os tratamentos.41

Figura 8. Biomassa seca (g/placa) de isolados de *Geastrum lloydianum* (□) e *G. subiculosum* (■) após 40 dias de incubação em diferentes meios de cultura a 25°C, no escuro. BDA-p = batata dextrose ágar-preparado; BDA-c = batata dextrose ágar-comercial; SDA = Sabouraud dextrose ágar; EMPA = extrato de malte peptona ágar. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre os isolados e as letras maiúsculas a comparação entre os tratamentos.42

Figura 9. Crescimento micelial de *Geastrum subiculosum* (■) e *G. lloydianum* (□) em diferentes meios de cultura na ausência de ágar incubados a 25°C, no escuro por 40 dias. BD-p = batata dextrose-preparado; SD = Sabouraud dextrose; EMP = extrato de malte peptona. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre os isolados e as letras maiúsculas a comparação entre os tratamentos.43

Figura 10. Isolados de *Geastrum lloydianum* e *G. subiculosum* incubados em diferentes temperaturas, no escuro, após 40 dias de incubação em meio BDA-p = Batata dextrose ágar-preparado.44

Figura 11. Crescimento micelial de *Geastrum subiculosum* (■) e *G. lloydianum* (□) em diferentes temperaturas de incubação, em meio de cultura BDA-p = Batata dextrose ágar-preparado, no escuro, após 40 dias. A) Diâmetro da colônia (mm). B) Massa da colônia (g/placa). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre os isolados e as letras maiúsculas a comparação entre os tratamentos.45

Figura 12. Crescimento micelial (g/frasco) de *Geastrum subiculosum* (■) e *G. lloydianum* (□) em diferentes temperaturas de incubação, por 40 dias em meio BD-p = Batata dextrose-preparado, no escuro. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre os isolados e as letras maiúsculas a comparação entre os tratamentos.46

Figura 13. Crescimento micelial de *Geastrum subiculosum* (■) e *G. lloydianum* (□) em Batata dextrose ágar-preparado incubado com diferentes pHs por 40 dias sem agitação, no escuro. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de

probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre os isolados e as letras maiúsculas a comparação entre os tratamentos.50

Figura 14. Germinação de esporos e isolamento de micélio monocariótico de *Geastrum lloydianum*. A) Esporo germinado (seta) com 35 dias de incubação. B e C) Desenvolvimento da hifa monocariótica (seta) a partir de 35 dias de incubação (Aumento de 400x). D) Desenvolvimento da hifa monocariótica com 40 dias de incubação (Aumento de 100x). E) Isolamento do micélio monocariótico. F) Micélio monocariótico com 15 dias de incubação. G) Micélio monocariótico com 35 dias de incubação, no escuro.....51

Figura 15. Germinação de esporos e isolamento de micélio monocariótico de *Geastrum subiculosum*. A) Esporo germinado (seta) com 35 dias de incubação. B e C) Desenvolvimento da hifa monocariótica (seta) a partir 35 dias de incubação (Aumento de 200 e 400x respectivamente). D) Desenvolvimento da hifa monocariótica com 40 dias de incubação (Aumento de 100x). E) Isolamento do micélio monocariótico. F) Micélio monocariótico com 15 dias de incubação. G) Micélio monocariótico com 35 dias de incubação, no escuro.52

Figura 16. Cruzamento não induzido de micélio monocariótico *in vitro* de *Geastrum lloydianum*. A) Monocários pareados (mo) após 35 dias de incubação, no escuro. B) Micélio monocariótico (mo) e dicariótico (di) isolados após 35 dias de incubação. C) Hifas do micélio dicariótico cruzado *in vitro* com destaque para os grampos de conexão (seta) (Aumento de 400x).....54

Figura 17. Cruzamento não induzido de micélio monocariótico *in vitro* de *Geastrum subiculosum*. A) Monocários pareados (mo) após 35 dias de incubação, no escuro. B) Micélio monocariótico (mo) e dicariótico (di) isolados após 35 dias de incubação. C) Hifas do micélio dicariótico cruzado *in vitro* com destaque para os grampos de conexão (seta) (Aumento de 400x).....55

Figura 18. Cruzamento intraespecífico *in vitro* de *Geastrum lloydianum*. A) Culturas pareadas em placa de Petri após 30 dias de incubação, no escuro. B) Hifas dicarióticas oriundas do cruzamento intraespecífico. As setas indicam a presença do grampo de conexão.58

Figura 19. Cruzamento intraespecífico *in vitro* de *Geastrum subiculosum*. A) Culturas monocarióticas pareadas em placa de Petri. B) Culturas pareadas em placa de Petri após 30

dias de incubação, no escuro. C) Hifas dicarióticas oriundas do cruzamento intraespecífico. As setas indicam a presença do grampo de conexão. 58

Figura 20. Árvore filogenética mostrando a similaridade molecular entre micélio dicariótico extraído do basidioma (■) e micélios dicarióticos oriundos do cruzamento *in vitro* (▲) para *Geastrum lloydianum* e *G. subiculosum*. A árvore foi construída baseadas em sequências de rDNA (ITS1, 5,8S e ITS2)..... 59

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais sobre os fungos

Os fungos são organismos eucariontes, uni ou multicelulares, heterotróficos que se nutrem por absorção e armazenam energia na forma de glicogênio; apresentam parede celular constituída principalmente por quitina; podem se reproduzir por fragmentação, mas geralmente disseminam-se por meio da produção de esporos que são liberados no ambiente, germinando, dando origem às hifas que se aglomeram e formam o micélio (Alexopoulos *et al.* 1996; Evert e Eichhorn 2013). De todas as estimativas propostas para elucidar a diversidade de fungos no mundo (Hawksworth 2001; Schmit e Mueller 2007; Blackwell 2011; Hawksworth 2012), a de 1,5 milhão de espécies (Hawksworth 1991) é a mais aceita atualmente, sendo que desse total, apenas cerca de 80 a 120.000 são conhecidas pela ciência (Webster e Weber 2007; Evert e Eichhorn 2013).

Hawksworth (2001) aponta que do maior percentual de espécies de fungos descritas, cerca de 60%, entre os anos 1990 e 1999, são oriundas de ambientes tropicais e subtropicais. No entanto, deve-se considerar que poucos estudos abordam a micodiversidade nesses ambientes e que esse percentual pode ser ainda maior, sendo consenso entre os pesquisadores a importância de se conhecer a diversidade em tais ambientes (Hawksworth 2001; Rinaldi *et al.* 2008). Quanto ao Brasil, Lewinsohn e Prado (2005) estimaram 13.090 a 14.510 espécies descritas para o país com base em entrevistas com especialistas. Contudo, Forzza *et al.* (2012) listaram um número bem menor de espécies, cerca 3.608 espécies com apenas 523 sendo endêmicas. Ainda segundo esses autores, 519 espécies foram descritas com 35 endêmicas para a Amazônia, estando em terceiro lugar em relação ao número de espécies e endemismo, perdendo para a Mata Atlântica, com 1.661 espécies descritas, sendo 100 destas endêmicas, e para a Caatinga, com um total de 734 espécies e 56 endêmicas.

De acordo com Kirk *et al.* (2008), a classificação dos fungos está dividida em seis filos, sendo estes Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia e Zygomycota. Ainda segundo esses autores, o filo Basidiomycota encontra-se distribuído em 16 classes, 52 ordens, 177 famílias, 1589 gêneros e 31.515 espécies, tornando-se o segundo filo mais diverso do reino Fungi, sendo suplantado pelo filo Ascomycota em número de espécie. Uma das características exclusivas dos basidiomicetos consiste na

presença do grampo de conexão em suas hifas, contudo, deve-se ressaltar que essa estrutura está presente apenas nos basidiomicetos, mas nem todos os representantes do grupo apresentam-na (Ferreira 2005; Evert e Eichhorn 2013).

Entre os basidiomicetos existem representantes parasitas e simbiontes, mas a maioria vive como sapróbio, sendo essa forma de vida encontrada em uma grande variedade de substratos e em diferentes biomas, o que faz com que esses fungos desempenhem um papel de grande importância na ciclagem de nutrientes (Kendrick 2001; Webster e Weber 2007) e atuem como um dos componentes essencialmente funcionais dos ecossistemas terrestres (Mueller e Schmit 2007).

De acordo com Evert e Eichhorn (2013), os representantes desse grupo encontram-se divididos em três subfilos, Pucciniomycotina conhecido como ferrugem, Ustilaginomycotina popularmente conhecido como carvão e Agaricomycotina. Segundo esse mesmo autor, Agaricomycotina é o único subfilo que produz corpo de frutificação, estando dividido em 17 ordens, 100 famílias, 1.147 gêneros e 20.951 espécies (Kirk *et al.* 2008), os corpos de frutificação são estruturas de reprodução sexuada popularmente conhecidas como cogumelos, orelhas de pau, ninho de pássaro e estrela da terra.

Em relação ao desenvolvimento dos basidiomas, alguns basidiomicetos apresentam formação de himênio fechado (angiocárpico) e aberto (gimnocárpico), sendo por isso denominados de gasteromicetos e himenomicetos, respectivamente (Alexopoulos *et al.* 1996). Nos himenomicetos, os esporos são produzidos no himênio, que expõem os basidiósporos na maturidade, enquanto em outros (denominados gasteromicetes), os esporos são produzidos num himênio fechado, denominado gleba, onde os esporos permanecem até a maturação, quando são dispersos de forma passiva (statismosporia) devido à falta de mecanismos de dispersão, ao contrário dos himenomicetos, que apresentam dispersão ativa de seus esporos (Evert e Eichhorn 2013). No entanto, as formas gasteroides desenvolveram uma série de estratégias para minimizar a falta de mecanismos ativos para dispersão, e para isso utilizam gotas de chuva, por exemplo, e outros agentes externos de dispersão (Baseia *et al.* 2014). Um caso atípico para o gênero é a espécie *Geastrum entomophilum* Fazolino, Calonge & Baseia descrita em 2008, onde foi observado que, além das diferenças na ornamentação do endoperídio em relação às demais espécies, havia presença de coleópteros no interior da sua gleba, o que indica, possivelmente, que estes animais também podem atuar como agentes dispersores (Fazolino *et al.* 2008).

1.2. Os fungos Gasteromicetos

Estudos pioneiros que segregam os fungos gasteroides, iniciaram em 1801, quando Christiaan Hendrik Persoon propôs duas divisões para os fungos em sua obra denominada *Synopsis Methodica Fungorum* (Cunningham 1942). Até então, a classificação era puramente baseada no desenvolvimento do basidioma. Sendo assim, a classe Gymnocarpi agruparia os fungos que apresentavam himênio exposto com liberação ativa dos esporos enquanto que na classe Angiocarpi foram incluídos os gasteromicetos que apresentavam fungos com himênio fechado durante a maturação dos esporos, além da dispersão passiva dos mesmos (Cunningham 1942; Alexopoulos *et al.* 1996). O critério morfológico do basidioma dos fungos gasteroides sempre foi utilizado como principal característica para agrupar diversas espécies de fungos nesse grupo (Sunhede 1989).

Mais tarde, em 1821, Elias Magnus Fries publicou a obra *Systema Mycologicum* onde cunhou a classe *Gasteromycetes* para reunir os fungos Angiocarpi. O termo *Gasteromycetes* vem da combinação de duas palavras do grego, onde ‘gaster’ significa estômago e faz menção ao fato da porção fértil do fungo estar no interior do corpo de frutificação, local onde os esporos são produzidos, armazenados e protegidos por camadas externas e ‘mycetes’ que significa fungos (Miller e Miller 1988).

Mesmo com as mudanças feitas por ambos os autores para tentar agrupar os fungos gasteroides em um único grupo, diversas espécies de ascomicetos e mixomicetos pertenciam à classe principalmente por causa da morfologia gasteroide dos basidiomas (Reijnders 2000). Miles Joseph Berkeley, em 1860, excluiu várias espécies, mas os mixomicetos ainda foram mantidos fazendo com que a classe se mantivesse artificial até o século XIX, quando George Winter propôs que *Gasteromycetes*, agora como ordem, fosse um grupo com representantes que contivesse apenas espécies de basidiomicetos (Cunningham 1942). Contudo, o problema taxonômico em relação à semelhança morfológica entre as espécies agrupadas permanecia em questionamento (Thiers 1984; Reijnders 2000).

O termo *Gasteromycetes* foi adotado como conceito tradicional por muitos autores e ainda muito encontrado na literatura especializada, sendo atualmente destituído de valor taxonômico e nomenclatural (Cunningham 1942; Miller e Miller 1988; Baseia *et al.* 2014). Isso se deve aos estudos morfológicos, filogenéticos e moleculares feitos por Hibbett *et al.* (1997) onde se concluiu que a principal característica gasteroide tinha evoluído diversas vezes em diferentes grupos de himenomicetos ancestrais, o que continuou sendo evidenciado uma

década depois por Hibbett *et al.* (2007). A evolução do hábito gasteroide se deu em grupos de diferentes espécies possivelmente devido às condições do clima árido que, por sua vez, desfavoreciam a dispersão ativa dos esporos por falta de umidade (Thiers 1984).

Segundo a classificação de Hibbett *et al.* (2007) fungos com hábito gasteroide tem origem polifilética, pois dentro de Agaricomycotina, eles estão agrupados em oito ordens diferentes sendo que quatro delas na subclasse Phallomycetidae (*Geastrales* K. Hosaka & Castellano, alguns representantes da ordem *Gomphales* Jülich, *Hysterangiales* K. Hosaka & Castellano e *Phallales* E. Fisch), que já constitui grupo conhecidamente gasteroide, duas ordens em Agaricomycetidae (*Agaricales* Underw. e *Boletales* E.J. Gilbert) e as ordens *Polyporales* Gäum. e *Russulales* Kreisel ex P.M. Kirk *et al.* (2008) que também possuem representantes com características gasteroides.

A ordem Geastrales apresenta as famílias Sphaerobolaceae J. Schröt., Sclerogastraceae Locq. ex P.M. Kirk, Schenellaceae Nann.-Bremek. e a família tipo, Geastraceae Corda (Hosaka *et al.* 2006; Kirk *et al.* 2008). Esta última apresenta sete gêneros, segundo o dicionário de fungos (Kirk *et al.* 2008). No entanto, oito gêneros são apresentados na base de dados Index Fungorum (www.indexfungorum.org 2014) (*Geasteroides* Long., *Nidulariopsis* Greis., *Geastrum* Pers., *Myriostoma* Desv., *Phialastrum* Sunhede, *Radiigera* Zeller, *Schenella* T. Macbr. e *Sphaerobolus* Tode.).

Os fungos gasteroides estão presentes na natureza, principalmente, como sapróbios no solo e detritos vegetais (Cortez 2009). Algumas espécies podem naturalmente estabelecer relação ectomicorrízica com raízes de plantas (Hibbett *et al.* 2000; Cortez *et al.* 2008; Karun e Sridhar 2014) e apresentar as mais variadas formas, tamanhos e cores (Baseia *et al.* 2014). Apesar da maioria dos seus representantes terem hábito terrestre, há ocorrência de espécies que se desenvolvem em ambientes marinhos (Barata *et al.* 1997).

1.3. O gênero *Geastrum*

O gênero *Geastrum* é popularmente conhecido como estrela da terra ou como visto na literatura especializada “*earthstar*” por apresentar exoperídio com deiscência formando raios, dando um aspecto estreliforme ao basidioma na maturidade (Sunhede 1989). O grupo foi descrito inicialmente como *Geaster* P. Micheli em 1729. Persoon, em 1794 renomeou o grupo que por sua vez, foi sancionado como *Geastrum* em 1801, sendo esta a denominação atualmente aceita (Sunhede 1989; www.indexfungorum.org 2014).

Na forma imatura, os basidiomas podem ser hipógeos quando se desenvolvem abaixo da superfície do solo ou epígeos quando seu desenvolvimento acontece acima da superfície do solo (Sunhede 1989). Apresentam formas geralmente globosas ou subglobosas que podem possuir um ápice pontiagudo ou não, sendo que algumas espécies desenvolvem basidiomas cespitosos que se originam a partir de um subículo (Sunhede 1989). Já na forma madura, apresentam um exoperídio dividido em duas ou três camadas, um endoperídio séssil ou com apenas um pedicelo e com um único ostíolo apical, poro por onde os esporos são dispersos, margeado por um peristômio, apresentando columela distinta ou indistinta, podendo ou não possuir um talo (Sunhede 1989). Os basidiósporos podem ser globosos a subglobosos, podendo apresentar ornamentação verrucosa ou com espinhos (Miller e Miller 1988; Sunhede 1989). Seus representantes podem ocorrer em vários ambientes, desde os solos arenosos aos ricos em matéria orgânica, atuando também como decompositores de madeira (Cortez 2009).

Sabe-se que foram descritas 50 espécies para todo o mundo (Kirk *et al.* 2008), sendo que 40 dessas espécies tem ocorrência para o Brasil (Trierveiler-Pereira e Baseia 2009). Desde então, novas espécies vem sendo descritas a cada ano, assim como novos relatos de ocorrência (Kuhar e Papinutti 2009; Hemmes e Desjardin 2011; Silva *et al.* 2013; Cabral *et al.* 2014; Sousa *et al.* 2014a,b). Na região norte do Brasil, as pesquisas que envolvem o gênero são recentes, entretanto, nos últimos anos, novas espécies foram relatadas para a Amazônia brasileira (Silva *et al.* 2013), bem como novos registros foram realizados (Cabral *et al.* 2014).

A espécie *Geastrum lloydianum* Rick teve sua ocorrência relatada pela primeira vez para Amazônia Central por Cabral *et al.* (2014). Esta espécie pode ocorrer em solos arenosos sombreados; seu basidioma é hipógeo quando jovem e subgloboso com protuberância apical e superfície lisa, quando maduro, o exoperídio é fornicado podendo ocorrer até nove raios quando aberto. A camada micelial é esbranquiçada e completamente recoberta por detritos do solo e componentes vegetais onde se desenvolveu; o endoperídio é globoso a subgloboso com presença de pruína em sua superfície, séssil com apófise lisa de cor marrom escuro, peristômio não definido e gleba amarronzada com columela presente (Calonge *et al.* 2005; Perez 2009; Trierveiler-Pereira *et al.* 2011; Trierveiler-Pereira e Silveira 2012).

A espécie *Geastrum subiculosum* Cooke & Masee foi descrita em 1887 como *Geaster subiculosum* Cke & Mass (Cooke 1887). Essa espécie cresce em madeira em decomposição e os basidiomas são caracterizados por apresentar um subículo bem desenvolvido e aveludado, são epígeos e obovóides com basidiomas maduros alcançando aproximadamente 1,5 cm com

divisões do exoperídio de 7 a 8 raios, o endoperídio é subsférico com peristômio bem delimitado. A espécie é tipicamente tropical e subtropical (Zürcher 1966; Guzmán 1986).

Segundo o banco de dados *Species Links* (www.splink.org.br 2014), a espécie *G. subiculosum* aparece seis vezes com registro em coleções científicas no Brasil. A coleta mais antiga foi feita por Oswaldo Fidalgo e Maria Eneyda Pacheco Kauffmann Fidalgo em 1956 com depósito no herbário do Rio de Janeiro e os registros mais atuais encontram-se no Herbário da UFRN (UFRN-FUNGOS) e no Herbário INPA. Para *G. lloydianum*, 78 registros são encontrados em herbários nacionais, sendo a coleta mais antiga para o estado da Paraíba em 1996 depositada no Herbário UFPB-JPB e a mais recente realizada pelo presente estudo, com depósito no Herbário INPA (Figura 1).

Para o estado do Amazonas, 40 registros são listados no banco de dados *Species Links* a partir de 2011 para *G. lloydianum*, quanto a *G. subiculosum*, três registros foram encontrados, contudo, no que tange Região Norte, inda há muitas áreas para explorar, principalmente ao analisar o quanto se conhece da diversidade no país.

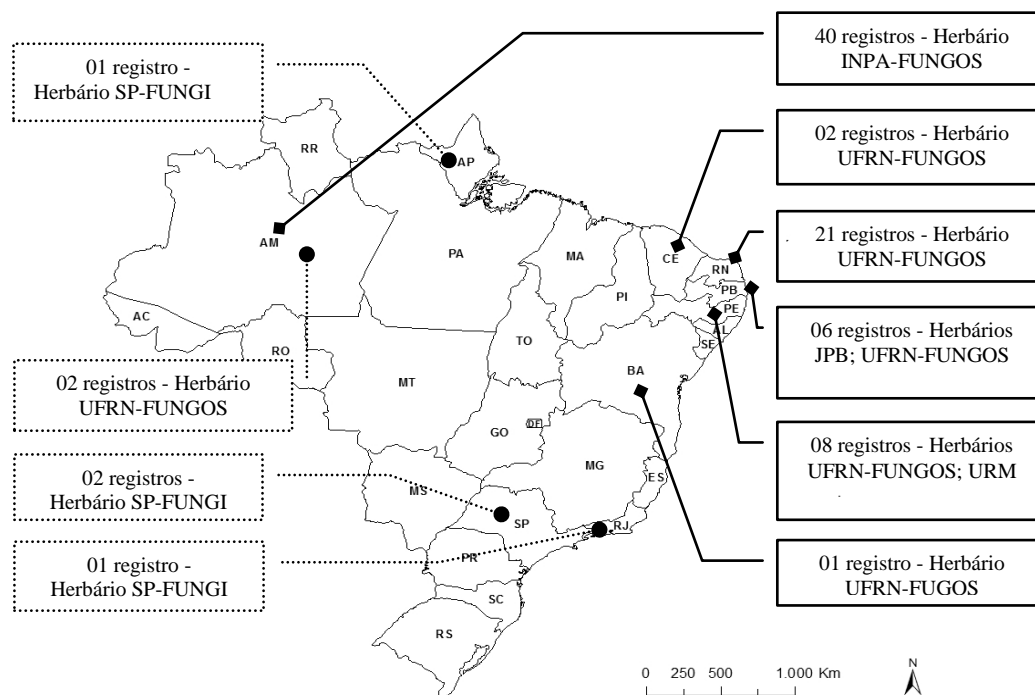


Figura 1. Herbários onde as espécies *Geastrum lloydianum* (◆→) e *G. subiculosum* (●.....) encontram-se depositadas assim como número de registro por herbário e a Unidade Federativa em que as espécies foram coletadas. Informações retiradas do banco de dados *Species Links* (www.splink.org.br 2014).

Segundo Lewinsohn e Prado (2005), o Brasil representa uma média de apenas 13% da fração da biota mundial conhecida, sendo esta uma estimativa mínima diante da megadiversidade ocorrente. Fatos como este tornam evidenciada a extrema necessidade de que esforços em pesquisa se intensifiquem nas áreas e em grupos menos estudados, fazendo do gênero *Geastrum* um grupo bastante representativo, considerando o crescente número de espécies, muitas das quais são bastante semelhantes morfológicamente, ocorrendo no mesmo habitat e até no mesmo período do ano, o que torna o processo de identificação das espécies ainda mais complexo e demandando a dedicação de experientes taxonomistas a fim de realizar estudos morfológicos e moleculares para a identificação das mesmas.

Em condições de laboratório, os estudos requerem conhecimento acerca do comportamento do fungo *in vitro* para melhor obtenção de resultados e estas podem variar considerando a espécie estudada. A temperatura, por exemplo, um dos fatores determinantes no crescimento micelial, foi estabelecida para fungos de regiões temperadas em torno de 25 a 30°C (Alexopoulos *et al.* 1996; Mswaka e Megan 1999). Entretanto, em 2012, por meio da obtenção das condições ótimas para o cultivo micelial *in vitro* de *Panus strigellus* (Berk.) Overh, um basidiomiceto amazônico, foi demonstrado que o padrão de temperatura supramencionado não se aplica a essa espécie tropical, pois a melhor temperatura para a obtenção do maior diâmetro de colônia da mesma foi em torno de 35 e 40°C e para a produção de biomassa a melhor temperatura foi de 35°C (Vargas-Isla e Ishikawa 2008; Vargas-Isla 2012).

Investigações como estas, estimulam a realização de novos estudos com espécies de regiões tropicais, assim como para as diversas espécies do gênero *Geastrum* que ocorrem na Amazônia, para as quais ainda não se encontram registros na literatura sobre seus melhores métodos de cultivo *in vitro* e considerando as condições climáticas da Amazônia, se faz necessário que protocolos para espécies que nela ocorrem sejam formulados (Vargas-Isla e Ishikawa 2008) ou, pelo menos, que os protocolos desenvolvidos para ambientes temperados sejam adequadamente validados.

O gênero apresenta potencial medicinal (Guerra-Dore *et al.* 2007), assim como imprescindível papel ecológico, possivelmente desempenhando associação ectomicorrízica (Karun e Sridhar 2014). Dada a grande importância biotecnológica e ecológica dessas espécies, torna-se evidenciada a importância de se desenvolver os métodos de obtenção de culturas miceliais para tais espécies, dado que este é passo chave para a realização de outros

estudos que contribuem para a elucidação taxonômica de espécies e o conhecimento de sua biologia.

No entanto, é necessário melhorar a obtenção de cultura micelial para proporcionar alternativas de material para análises moleculares e aplicações em futuros estudos de bioprospecção, sobretudo, é necessário identificar as espécies, mas, ainda são raros os taxonomistas de fungos na Amazônia, especificamente para o gênero *Geastrum*.

Apesar de a morfologia ter sido um dos critérios amplamente difundidos para reconhecer e diferenciar as espécies, foi e é através do conceito biológico de espécie que muitos problemas taxonômicos foram resolvidos (Anderson *et al.* 1980; Capelari e Fungaro 2003; Giraud *et al.* 2008). Nesse sentido, a germinação dos basidiósporos, assim como o isolamento de micélios monocarióticos se tornam ferramentas auxiliares de identificação das espécies por meio do cruzamento, sendo este comprovado a partir da visualização do grampo de conexão (Taylor *et al.* 2000; Taylor *et al.* 2006), estrutura presente apenas no micélio dicariótico resultante do cruzamento em basidiomicetos.

Para fungos, o conceito biológico de espécie é empregado considerando a compatibilidade dos organismos de cruzarem entre si, podendo unir organismos tidos como espécies distintas ou separá-los caso estes estejam classificados como mesma espécie (Giraud *et al.* 2008). A partir desse ponto de vista, o cruzamento monocariótico pode ser empregado e usado como ferramenta na taxonomia do gênero *Geastrum* para os estudos na Amazônia, que apresenta pouca demanda de taxonomistas, sendo provavelmente essa uma das razões dos poucos estudos envolvendo o grupo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar as condições de germinação dos basidiósporos e obter culturas miceliais monocarióticas e dicarióticas, além de determinar as condições de crescimento micelial para as duas espécies *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- Coletar e identificar as espécies do gênero *Geastrum* na área do campus I e III do INPA;
- Determinar as condições de germinação dos basidiósporos *in vitro* para as duas espécies;
- Obter culturas miceliais monocarióticas para ambas as espécies a partir da germinação dos basidiósporos;
- Determinar a taxa de germinação de basidiósporos de *G. subiculosum*;
- Realizar cruzamentos *in vitro* para cada uma das duas espécies;
- Determinar as condições de cultivo de culturas miceliais dicarióticas de *G. subiculosum* e *G. lloydianum*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta dos macrofungos

As coletas foram realizadas nos campus I e III do INPA, nos períodos de fevereiro a maio de 2013 e de 2014, que correspondem aos meses de maior índice pluviométrico na região de Manaus-AM, de acordo a estação do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) em Manaus (Figura 2) para esses dois anos de amostragem (www.inmet.gov.br 2015).

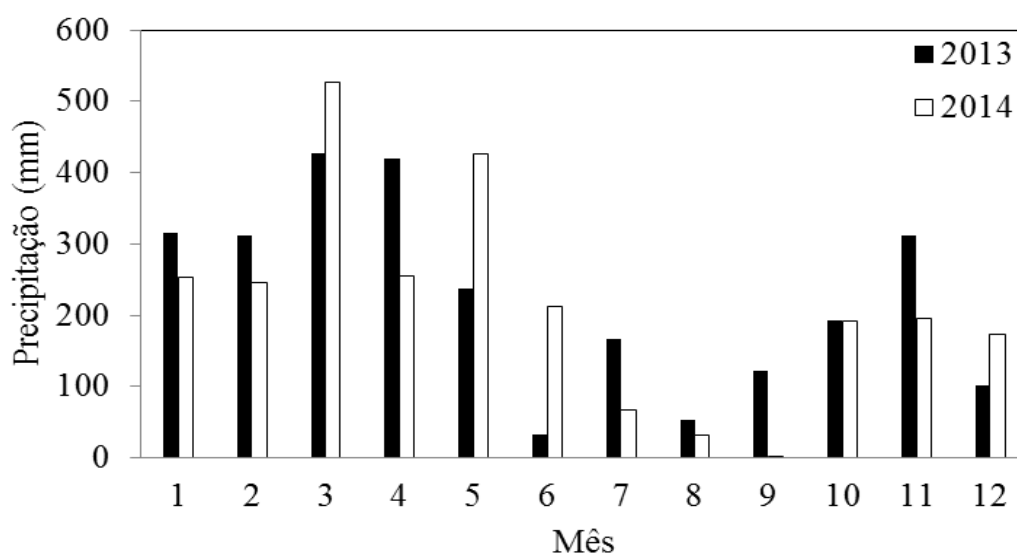


Figura 2. Índice de precipitação mensal (mm) para os anos de 2013 e 2014 para a região de Manaus, AM. Dados do Instituto Nacional de Meteorologia (www.inmet.gov.br 2015).

Para coleta e preservação dos corpos de frutificação, foi adotada a metodologia proposta por Lodge *et al.* (2004), que recomenda fotografar os espécimes antes de serem removidos do substrato (Figura 3A) e realizar remoção manual. Os basidiomas foram acondicionados separadamente em caixas plásticas compartimentadas e etiquetados segundo ordem de coleta (Figura 3B), tendo os dados relativos ao local da coleta, data, nome do coletor e habitat quanto à natureza do substrato sumarizados. Em seguida, foram conduzidos ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do campus III do INPA. Foram coletados vários basidiomas da mesma espécie em diferentes fases de desenvolvimento (Figura 3C) para proporcionar uma completa descrição e facilitar a identificação da espécie.



Figura 3. Coleta e fotodocumentação de basidiomas de fungos do gênero *Geastrum*. A) Basidiomas de *G. lloydianum* em campo. B) Basidiomas de fungos gasteroides acondicionados em caixa plástica compartimentada. C) Basidiomas de *G. subiculosum* em diferentes fases de desenvolvimento.

3.2. Identificação morfológica dos macrofungos

A identificação dos espécimes foi realizada com base nos caracteres morfológicos após secagem em estufa a 40°C com circulação de ar. A identificação taxonômica foi realizada com base em chaves de identificação e referência bibliográfica específica para o grupo (Miller e Miller 1988; Sunhede 1989). As exsicatas foram montadas e depositadas no Herbário INPA e posteriormente, enviadas para identificação no Departamento de Botânica e Zoologia do Centro de Biociências da UFRN, onde duplicatas permaneceram, sendo estas incorporadas ao acervo do Herbário UFRN.

Para as descrições micromorfológicas foi realizada análise em microscopia eletrônica de varredura no Laboratório de Microscopia Ótica e Eletrônica do Campus II do INPA, por meio de um Microscópio Eletrônico de Varredura (Carl Zeiss LEO 435 VP). Para isso, seguiu-se a metodologia adotada por Silva *et al.* (2011), onde amostras de esporos de *G. subiculosum* e *G. lloydianum* foram previamente aderidas a um suporte (stub) por meio do

uso de fita dupla face. Foi utilizado material herborizado e por esse motivo, não foi necessária a utilização do equipamento de ponto crítico. O material foi metalizado diretamente por uma fina camada de ouro (BALTEC SCD 050) e submetido à visualização.

3.3. Obtenção da cultura micelial dicariótica

O micélio dicariótico foi obtido a partir da inoculação de fragmentos do contexto dos basidiomas ainda frescos. Tais fragmentos foram obtidos em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar com auxílio de um bisturi esterilizado e transferidos para placas de Petri (90 mm Ø) contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar-comercial (BDA-c) (Difco®), contendo antibiótico (Tetraciclina 0,072 g/L) (Sigma®).

As placas de Petri foram mantidas a 25°C sem iluminação em estufa do tipo Demanda Biológica de Oxigênio (BOD). Observações diárias foram feitas até que se obtivessem culturas puras do micélio dicariótico das duas espécies. De igual forma, observações foram feitas em microscópio óptico a fim de verificar a presença de grampos de conexão e assim, comprovar que o micélio isolado tratava-se de um representante de basidiomiceto.

3.4. Determinação das condições do cultivo micelial

Foi seguida a metodologia descrita por Vargas-Isla e Ishikawa (2008) com adaptações, pois o basidiomiceto inicialmente identificado, publicado como *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr., e que posteriormente foi identificado como *P. strigellus* (Vargas-Isla *et al.* 2015 in press) alcançou a borda da placa de Petri (90 mm Ø) com cinco dias de incubação, o que não foi observado para o micélio das duas espécies estudadas, já que as mesmas apresentaram lento crescimento. Conseqüentemente, para determinar as condições de cultivo micelial para as duas espécies de *Geastrum*, foram utilizados fragmentos de 2 × 2 mm do micélio dicariótico, enquanto que as autoras utilizaram discos de micélio de 10 mm Ø do micélio de *P. strigellus*.

3.4.1. Avaliação do meio de cultura no crescimento micelial

Um fragmento de cultura micelial (2 × 2 mm) de cada isolado foi transferido para o centro de placa de Petri (90 mm Ø) contendo 15 mL dos meios de cultura sólidos descritos na tabela 1.

Tabela 1. Meios de cultura utilizados para os testes de condições ótimas de cultivo micelial de duas espécies do gênero *Geastrum*.

Meio de cultura	Ingredientes (g/L)
Meio comercial de Batata Dextrose Ágar (BDA-c) (Difco®)	39 g de BDA comercial.
Meio Preparado de Batata Dextrose Ágar (BDA-p)	200 g de batata; 15 g de Ágar; 20 g de Dextrose.
Meio Extrato de Malte Peptona Ágar (EMPA) (Becton Dickinson®)	30 g de extrato de malte; 3 g de peptona; 15 g de ágar.
Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) (Becton Dickinson®)	10 g de peptona; 40 g de dextrose; 15 g de ágar.
Meio preparado a partir de folhas	15 g de folhas secas maceradas; 15g de ágar; 20 g de Dextrose.

Os meios de cultura utilizados foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Os resíduos utilizados na elaboração dos meios propostos a partir de folhas e galhos foram coletados no Campus III do INPA durante a amostragem dos corpos de frutificação dos espécimes de *Geastrum*. Nas coletas de *G. subiculosum*, constatou-se que a espécie cresce sob os detritos de folhas e galhos em decomposição do material vegetal do gênero *Inga* Mill. O material vegetal foi coletado e conduzido ao laboratório para secagem em estufa a 40°C por 24 horas, sendo triturado em moinho mecânico após a secagem. Os ingredientes correspondentes a este meio listado na tabela 1 foram homogeneizados em 1 L de água destilada e a solução esterilizada em autoclave.

Após o período de incubação, o diâmetro da colônia foi medido em direções diametralmente opostas utilizando um paquímetro digital, sendo que o valor da média das duas medições foi considerado o diâmetro da colônia.

As mesmas placas foram utilizadas para avaliação da massa micelial. Para isso, foi adotada a metodologia descrita por Vargas-Isla e Ishikawa (2008), onde o meio de cultura das placas foi fundido em forno micro-ondas (potência de 800 W por 20 segundos) e o micélio foi separado do meio por filtração e lavado com água a 60°C em bomba a vácuo. O micélio foi transferido para cadinhos (recipiente) de massa conhecida preparados com papel alumínio,

desidratado em estufa a 60°C por 24 horas e depois a 105°C até atingir massa constante e, por fim, mensurada em balança analítica.

A avaliação do crescimento micelial em meio de cultura líquido se deu a partir dos meios descritos anteriormente, contudo, foram preparados sem a adição de ágar. A avaliação do crescimento micelial em meio de cultura líquido se deu a partir dos meios descritos anteriormente, exceto BDA-c. Foram preparados de maneira semelhante, excluindo-se o ágar da composição. Após o crescimento das culturas, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração em bomba a vácuo e a massa micelial determinada conforme descrito anteriormente.

3.4.2. Avaliação do efeito da temperatura no crescimento micelial

Um fragmento de cultura micelial (2 × 2 mm) de cada um dos isolados de cada espécie, foi transferido para o centro de uma placa de Petri (90 mm Ø) contendo o meio de cultura que proporcionou melhor crescimento no experimento anterior. As placas foram mantidas em estufas ajustadas para as temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C sem iluminação. Após o período de incubação definido no experimento anterior, o crescimento micelial foi avaliado seguindo a metodologia descrita no item 3.4.1.

O mesmo experimento em relação ao efeito da temperatura foi avaliado em meio de cultura líquido. Para isso, foram utilizados três fragmentos da cultura micelial (2 × 2 mm) por frasco do tipo Erlenmeyer com capacidade para 125 mL, este contendo 50 mL do meio que promoveu o melhor desenvolvimento micelial, sendo a incubação efetuada nas mesmas condições de temperaturas e iluminação descritas acima. Após o mesmo período definido no experimento anterior, o micélio foi separado por filtração e sua massa avaliada seguindo os procedimentos descritos anteriormente o item 3.4.1.

3.4.3. Avaliação da agitação do meio líquido no crescimento micelial

Para esta avaliação foi utilizado o meio de cultura que promoveu o maior crescimento micelial determinado no experimento descrito no item 3.4.1. Frascos do tipo Erlenmeyer com capacidade para 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura preparados nas mesmas condições descritas no experimento anterior, foram incubados em mesa agitadora a 75 rpm na ausência de luz durante o período determinado no item 3.4.1 sob a temperatura que

proporcionou o melhor crescimento micelial, esta determinada no experimento descrito no item 3.4.2, sendo que o controle deste experimento foram frascos mantidos em condição estática, também na ausência de luz. Após o período de incubação a massa micelial foi determinada seguindo metodologia descrita em 3.4.1.

3.4.4. Efeito do pH inicial do meio de cultura no crescimento micelial

Foram transferidos três fragmentos de colônia (2 × 2 mm) para frascos do tipo Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL do meio que proporcionou o melhor crescimento micelial. Este teve o pH ajustado para 4, 5, 6 ou 7 com soluções de HCl e NaOH antes da esterilização em autoclave. Os isolados foram incubados de acordo com as condições ótimas de temperatura e agitação determinadas anteriormente nos itens 3.4.2 e 3.4.3 e a avaliação da massa micelial seguiu os procedimentos descritos no item 3.4.1.

3.5. Germinação *in vitro* dos basidiósporos e isolamento do micélio monocariótico

A cultura micelial monocariótica foi obtida por meio da germinação dos basidiósporos dos basidiomas intactos, maduros e frescos. Para isso, as suspensões de esporos dos fungos *G. lloydianum* e *G. subiculosum* foram preparadas a partir de 10 mL de água destilada esterilizada mais a adição de 20 µL de Tween 80 em placa de Petri (90 mm Ø) contendo os esporos a serem utilizados. A solução foi submetida à agitação em condições assépticas em câmara de fluxo laminar. A densidade de esporos nas suspensões foi mensurada a partir de 50 µL em câmara de Neubauer com contagens realizadas em duplicata para saber a densidade de esporos para cada espécie.

Depois de quantificadas, 50 µL de cada suspensão foram inoculados por placa, esta contendo 15 mL de meio BDA-p com antibiótico (Tetraciclina 0,072 g/L), para impedir crescimento bacteriano, e mantidas a 25°C em câmara BOD até a germinação dos basidiósporos. Um total de 20 placas de Petri (90 mm Ø) foram semeadas, sendo que as observações aconteceram a cada três dias, após a incubação, em microscópio óptico.

Foram considerados germinados os basidiósporos que apresentavam tubo germinativo igual ou superior ao tamanho do esporo que o originou. Estes foram transferidos para placa de Petri (90 mm Ø) contendo 15 mL de meio BDA-p e incubados a 25°C em estufa do tipo BOD para obtenção de culturas puras. O crescimento das culturas foi acompanhado por meio de

observação em microscópio óptico e a presença ou ausência de grampos de conexão nas hifas indicou o estado dicariótico e monocariótico, respectivamente.

Após a constatação das primeiras germinações, as colônias jovens foram acompanhadas com auxílio de microscópio óptico até que atingissem tamanho adequado para a remoção e transferência para outra placa de Petri (90 mm Ø) contendo o mesmo meio de cultivo onde foram acompanhadas para constatação do estado monocariótico do micélio. O isolamento do micélio monocariótico foi feito em câmara de fluxo laminar com auxílio de um microscópio óptico, sendo as culturas assim isoladas e incubadas a 25°C em câmara BOD na ausência de luz até que apresentassem tamanho propício para os testes de cruzamento. Os basidiósporos ainda não geminados, assim como os monocários muito jovens continuaram em observação até que o isolamento fosse possível.

3.5.1. Percentual de germinação de basidiósporos de *Geastrum subiculosum*

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do campus III do INPA. Para isso, foram utilizados basidiósporos de um único basidioma, maduro e fresco da espécie *Geastrum subiculosum* coletado no Campus III do INPA, durante o mês de maio de 2014.

Foram testados dois métodos de germinação. No primeiro deles, foi preparada uma mistura a partir de 10 mL de água destilada acrescido de 20 µL de Tween 80 (ADT). No segundo, a mistura foi preparada a partir de 10 mL de solução salina (NaCl 0,85%) acrescido de 20 µL de Tween 80 (SST), ambas foram esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos. A solução de esporos foi feita de modo asséptico em câmara de fluxo laminar, onde os basidiósporos foram extraídos por meio de dispersão manual com auxílio de uma alça, esta exercendo uma força sobre o endoperídio para que os esporos fossem liberados em placa de Petri (90 mm Ø) esterilizada contendo uma das misturas supracitadas.

A suspensão de esporos foi homogeneizada com movimentos em forma de “oito” e sua densidade determinada em duplicata em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico. Em seguida, foram semeados 66×10^5 esporos por tratamento, com 20 repetições por tratamento, considerando que cada placa de Petri (90 mm Ø) representou uma unidade experimental. Cada placa de Petri continha 15 mL de meio BDA-p acrescido de antibiótico (Tetraciclina 0,072 g/L), sendo os esporos espalhados na superfície do meio de forma homogênea com alça de Drigalski. As placas foram mantidas a 25°C no escuro em

BOD com observações a cada três dias em microscópio óptico até que fosse observada a germinação dos esporos.

3.6. Compatibilidade entre os micélios monocarióticos

O pareamento das culturas monocarióticas foi realizado a partir de fragmentos das colônias (2×2 mm) obtidas em placa de Petri (90 mm Ø) contendo meio BDA-p e incubadas a 25°C em câmara BOD na ausência de luz. Após o crescimento e sobreposição das culturas, estas foram microscopicamente examinadas a fim de constatar a presença de grampos de conexão nas extremidades das colônias, indicativo da dicarionização e a compatibilidade entre os monocários pareados.

3.7. Extração do DNA

Fragmentos do micélio dicariótico oriundo do corpo de frutificação, assim como fragmentos do micélio dicariótico oriundo dos cruzamentos *in vitro*, foram inoculados em meio de cultura líquido que melhor promoveu crescimento micelial e incubados segundo as melhores condições de cultivo estabelecidas no item 3.4. Após o crescimento satisfatório, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração, lavado três vezes em água destilada esterilizada e conduzido ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

O protocolo de extração do DNA foi adotado de Raeder e Broda (1985). Para isso, as amostras foram trituradas em cadinho de porcelana com tampão de extração até formar uma solução homogênea, essa solução foi transferida para microtubos de 2 mL e mantida a 65°C por 1 hora em banho-maria. Após o período de incubação, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos, em seguida, a fase aquosa foi recuperada e transferida para um novo microtubo de 2 mL e à esta foi adicionado 500 µL de fenol e novamente a solução foi homogeneizada na mesma condição anterior, sendo o sobrenadante recuperado e transferido para outro microtubo. Foi acrescentado 600 µL de clorofane e centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionado 600 µL de clorofane e mais uma vez centrifugado por igual período e rotação. O sobrenadante foi coletado, transferido para novo microtubo e acrescentado 100 µL de NaCl

3M e 500 µL de etanol resfriado a -20°C. Nessa fase já foi possível visualizar o sobrenadante precipitado.

As amostras foram novamente submetidas à centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado obtido lavado em 500 µL de etanol 70% por 2 minutos por duas vezes. Após esse processo, os tubos foram investidos com a boca para baixo em folhas de papel toalha por aproximadamente uma hora em temperatura ambiente para secagem do sobrenadante. Ao final, este foi ressuscitado em 200 µL do tampão TE e armazenado em geladeira.

3.7.1. Amplificação do rDNA e quantificação do DNA

A região ITS1 + 5,8S + ITS2 do rDNA foi amplificado usando os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4. As reações de PCR foram realizadas em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial de cinco minutos a 94°C seguindo de 30 ciclos. Cada ciclo consiste de uma etapa de desnaturação que leva 30 segundo a 94°C, uma etapa de pareamento realizada em 30 segundos a uma temperatura de 55°C, uma etapa de alongamento de igual período a uma temperatura de 72°C e uma extensão final a 72°C por sete minutos.

Foram misturadas quantidades apropriadas de água MilliQ esterilizada e tampão 10x, d’NTPs, *primer* e MgCL₂ em um único tubo para criação de uma solução. Desta, 45 µL foram adicionados em cada um dos microtubos para amplificação, onde foram adicionados mais 5 µL das amostras de DNA e levados ao termociclador para a realização da amplificação. Após amplificação, 5 µL da reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE. O gel foi corado com brometo de etídio para ser observado e fotodocumentado em transiluminador de ultravioleta, uma vez comprovado o sucesso da amplificação, os fragmentos de DNA amplificados foram purificados usando o Kit GFX (Amersham Pharmacia®).

3.8. Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso. Para os experimentos em meio de cultura sólido, a unidade experimental constou de uma placa de Petri, com cinco repetições por tratamento e para os experimentos em meio de cultura líquido, a unidade experimental foi um frasco do tipo Erlenmeyer, também com cinco repetições por

tratamento. Ao final, os experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias de massa e diâmetro da colônia foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância usando-se o programa ASSISTAT versão 7.7 beta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Deposição dos espécimes em Herbário

A partir das coletas realizadas, foram gerados 217 depósitos no Herbário INPA. Destes, 216 espécimes pertencem ao gênero *Geastrum* como mostrado na tabela 2 e um espécime pertencente ao gênero *Mutinus* Fr. O material herborizado pertencente ao gênero *Geastrum* foi identificado morfológicamente com auxílio de especialistas do grupo e identificadas nove espécies.

Tabela 2: Lista de espécies do gênero *Geastrum* coletadas na região de Manaus-AM e depositadas no Herbário INPA.

Espécie	Nº de espécies
<i>Geastrum</i> cf. <i>albonigrum</i> Calonge & M. Mata	3
<i>Geastrum</i> cf. <i>echinulatum</i> B.D.B. Silva & Baseia	1
<i>Geastrum</i> cf. <i>entomophilum</i> Fazolino, Calonge & Baseia	3
<i>Geastrum</i> cf. <i>hirsutum</i> Baseia & Calonge	1
<i>Geastrum</i> cf. <i>lageniforme</i> Vittad	2
<i>Geastrum lloydianum</i> Rick	19
<i>Geastrum</i> cf. <i>schweinitzii</i> (Berk. & M.A. Curtis) Zeller	15
<i>Geastrum subiculosum</i> Cooke & Masee	9
<i>Geastrum</i> cf. <i>triplex</i> Jungh.	5
<i>Geastrum</i> sp.	158
Total de exsicatas depositadas	216

4.2. Descrição das espécies

As espécies *G. lloydianum* e *G. subiculosum* foram selecionadas para este estudo por serem abundantes e por estarem presentes em todo período da coleta. Os espécimes analisados correspondentes a essas duas espécies foram descritos pela Dra. Bianca Denise Barbosa da Silva e pelo Msc. Thiago Accioly de Souza do Programa de Pós-Graduação em Sistemática e Evolução da UFRN.

4.2.1. *Geastrum lloydianum* Rick, Brotéria 5: 26 (1906). Figura 4.

Basidioma expandido arqueado, podendo apresentar de 14 a 27 mm de altura, incluindo o peristômio, por 14 a 27 mm de diâmetro, não higroscópicos, camada micelial fibrosa papirácea, cotonosa, carnososa persistente, desprendendo-se em partes irregulares, marrom. Endoperídio marrom acinzentado escuro a marrom escuro, depresso globoso, com presença de apófise, sésil a curtamente estipitado, peristômio sulcado cônico, não delimitado e concolor com o endoperídio. Basidiósporos globosos a subglobosos, medindo 3,6 a 5,4 μm de diâmetro, levemente verrugosos, ápículo presente amarronzados em KOH.

Os dados da descrição da espécie corroboram com a descrição feita por Calonge *et al.* (2005) com espécimes coletados na Costa Rica; Perez (2009) com coletas para o Rio Grande do Sul, Brasil; Trierveiler-Pereira *et al.* (2011) com espécies coletados em remanescentes de Mata Atlântica no estado de Pernambuco, Brasil, além de análises em espécimes depositados no herbário URM; Trierveiler-Pereira e Silveira (2012) com análises de espécimes depositados em herbários Brasileiros (FLOR, ICN, PACA e URM), como também analisou espécies depositados no Herbários BAFC na Argentina, Herbário BPI nos Estados Unidos e no Herbário MA-Fungi na Espanha.

Habitat: Crescendo em meio a material vegetal em decomposição.

Material estudado: Brasil. Amazonas, Manaus. Campus III do INPA, 18 II 2014. Santana, M.D.F. INPA 259923.

4.2.2. *Geastrum subiculosum* Cooke & Masee, Grevillea 15: 97 (1887). Figura 5.

O basidioma imaturo é subgloboso a obovoide, com superfície lisa a levemente enrugada crescendo sobre o subículo, branco amarelado a amarelo acinzentado chegando ao bege. Basidioma expandido com camada micelial carnososa persistente de cor marrom

amarelado a amarelo claro chegando a creme com raios revolutos. Endoperídio é de cor marrom acinzentado escuro, peristômio mamiforme, fibriloso, não delimitado, concolor com o endoperíodo e expandido saculiforme. Os basidiósporos são pequenos, globosos a subglobosos, medindo 2,4 a 3,3 μm de diâmetro levemente verrugosos, hialinos.

Os dados da descrição da espécie corroboram com os estudos de Zürcher (1966) com estudos de espécimes da Costa Rica e com Guzmán (1986), estudando espécimes do Caribe e áreas circo vizinhas.

Habitat: Crescendo sobre a serapilheira em área sombreada.

Material estudado: Brasil. Amazonas, Manaus. Campus III do INPA, 22 III 2014. Santana, M.D.F. INPA 259933.

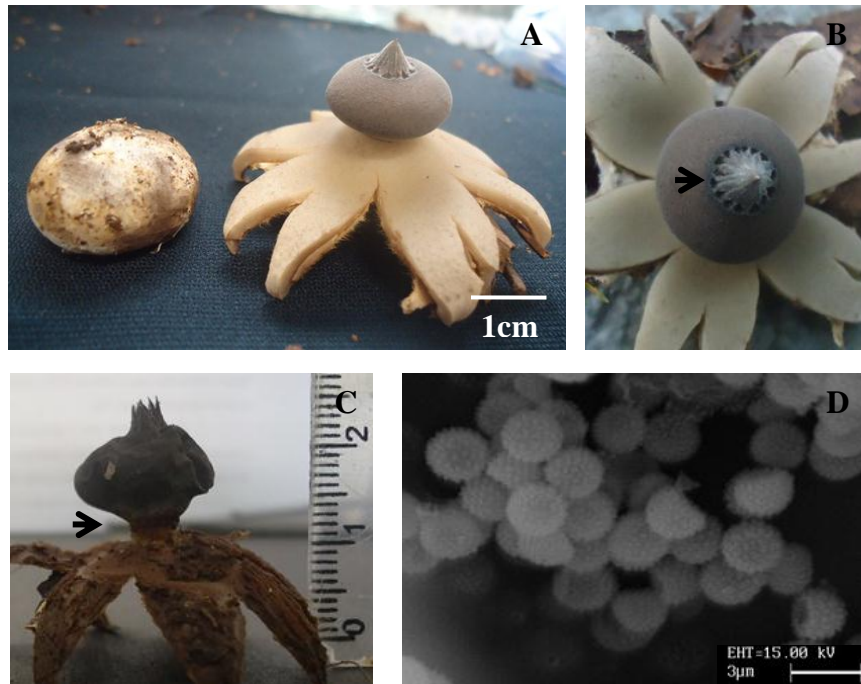


Figura 4. *Geastrum lloydianum*. A) Basidioma imaturo e expandido. B) Ostíolo (seta). C) Apófise (seta). D) Basidiósporos.

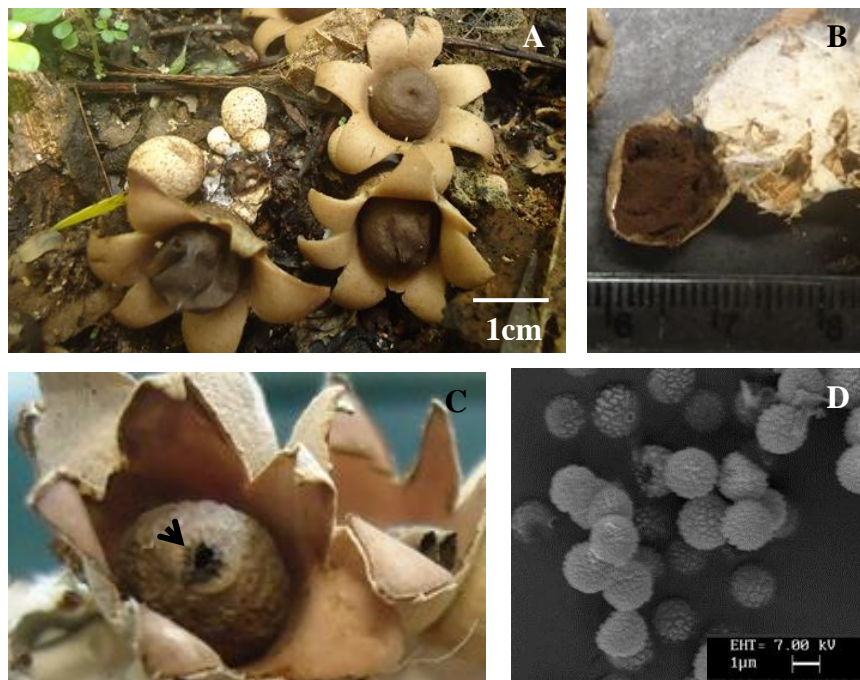


Figura 5. *Geastrum subiculosum*. A) Basidioma imaturo e expandido em campo. B) Gleba exposta e subículo. C) Ostíolo (seta). D) Basidiósporos.

4.3. Avaliação do meio de cultura no crescimento micelial

Os isolados permaneceram em incubação por 40 dias em câmara do tipo BOD, no escuro, a 25°C. Considerando o diâmetro dos isolados para as duas espécies em relação ao tempo de incubação, observou-se um lento crescimento independente do meio de cultivo em que foram inoculados (Figura 6).

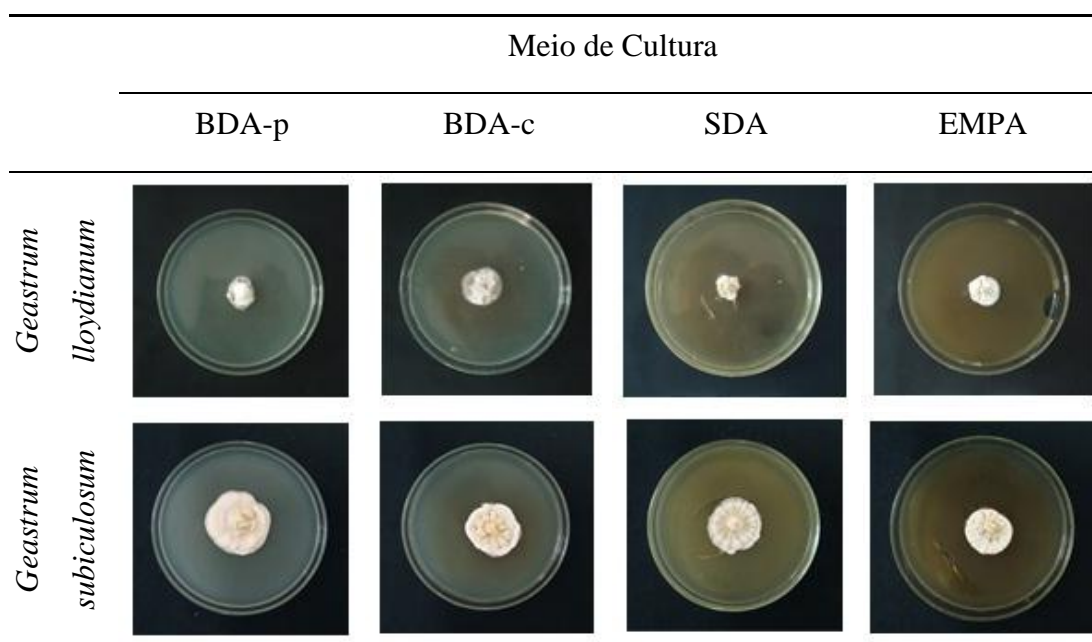


Figura 6. Isolados de *Geastrum subiculosum* e *G. lloydianum* em placa de Petri (90 mm Ø) após 40 dias de incubação em diferentes meios de cultura a 25°C, no escuro. BDA-p = batata dextrose ágar-preparado; BDA-c = batata dextrose ágar-comercial; SDA = Sabouraud dextrose ágar; EMPA = extrato de malte peptona ágar.

Após o período de incubação, verificou-se que em relação ao diâmetro de *G. lloydianum*, os meios BDA-p, BDA-c e EMPA não diferiram significativamente entre si considerando os melhores resultados, sendo o meio SDA o que menos proporcionou o crescimento radial dessa espécie. Em relação ao mesmo parâmetro, o crescimento de *G. subiculosum* apresentou diferença estatística quando o isolado foi cultivado nos meios BDA-p e EMPA. Quando as duas espécies foram comparadas, observou-se que as mesmas não mostraram diferença entre si quando cultivadas no meio EMPA, contudo, nos demais meios, *G. subiculosum* demonstrou um maior diâmetro em relação a *G. lloydianum* (Figura 7).

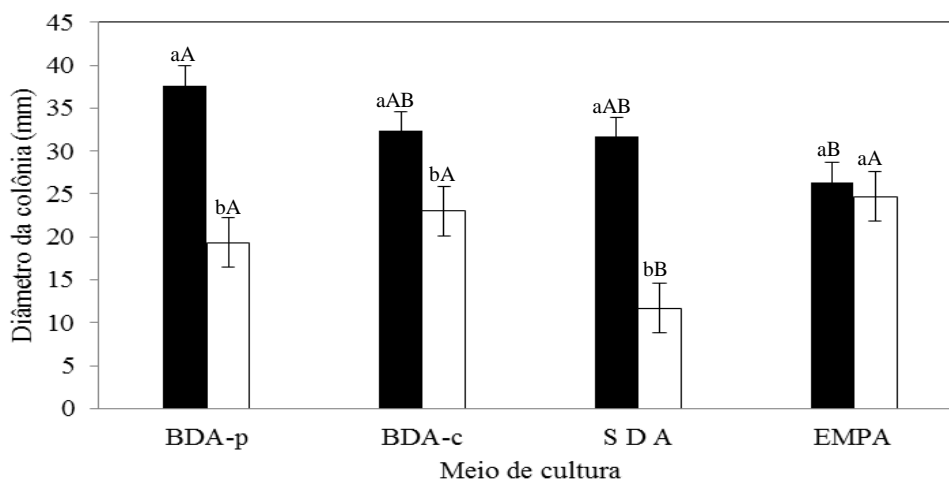


Figura 7. Diâmetro da colônia (mm) após 40 dias de incubação de isolados de *Geastrum lloydianum* (□) e *G. subiculosum* (■) em diferentes meios de cultura a 25°C, no escuro. BDA-p = batata dextrose ágar-preparado; BDA-c = batata dextrose ágar-comercial; DAS = Sabouraud dextrose ágar; EMPA = extrato de malte peptona ágar. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre os isolados e as letras maiúsculas a comparação entre os tratamentos.

O crescimento *in vitro* dos isolados das duas espécies é considerado lento quando comparado ao crescimento micelial de *P. lecomtei* (Fr.) Corner, por exemplo, que alcançou a borda da placa de Petri (90 mm Ø) em cinco dias de incubação (Vargas-Isla e Ishikawa 2008). No entanto, considerando as tentativas de obtenção das culturas miceliais de algumas espécies do gênero *Geastrum* durante a execução deste trabalho, observou-se o mesmo comportamento para *G. schweinitzii* (Berk. & M.A. Curtis) Zeller, *G. triplex* Jungh. e *G. echinulatum* B.D.B. Silva & Baseia isoladas durante as experimentações, mostrando o mesmo comportamento em meio de cultura, o que possivelmente é uma característica do grupo.

Sunhede (1989) descreveu o lento desenvolvimento de outras espécies desse grupo também relatando um crescimento micelial em torno de 3 a 22 mm em seis semanas em extrato de malte. Relato semelhante foi descrito por Stoytchev *et al.* (2001) para a espécie *G. pouzarii* V.J. Staněk, onde nesse caso, a espécie apresentou crescimento em torno de 3 a 4 mm considerando o mesmo meio de cultura e período de incubação.

Em relação à análise de biomassa seca dos dois isolados, verificou-se que para *G. lloydianum* não houve diferença significativa no crescimento micelial das colônias considerando os meios de cultivo testados. Entretanto, para *G. subiculosum*, foi observada diferença entre os meios BDA-p, BDA-c e SDA que se mostraram melhores em relação à EMPA, sendo que BDA-c e SDA foram estatisticamente melhores no desenvolvimento da

massa em relação ao meio de cultura EMPA. Quando comparados os isolados das duas espécies, observou-se que os isolados de *G. subiculosum* se desenvolveram melhor nos meios BDA-p, BDA-c e SDA em relação ao isolado de *G. lloydianum*, sendo que apenas para o meio EMPA essa diferença não foi significativa (Figura 8).

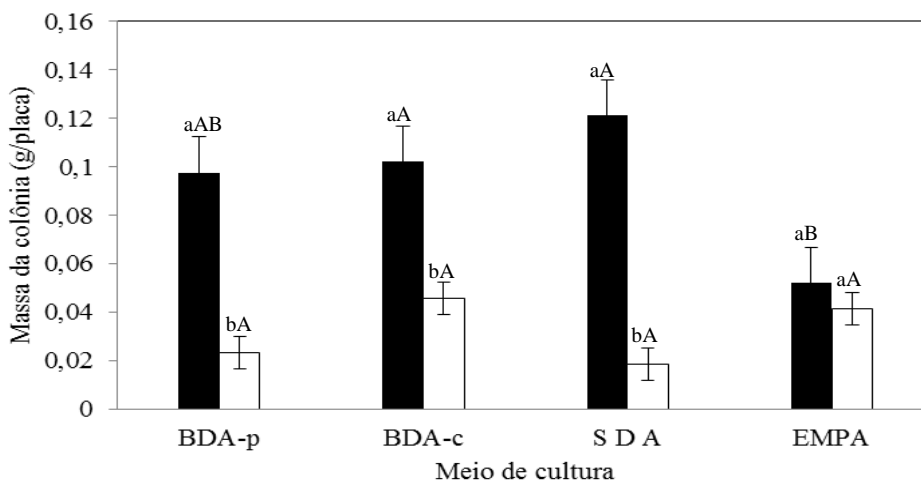


Figura 8. Biomassa seca (g/placa) de isolados de *Geastrum lloydianum* (□) e *G. subiculosum* (■) após 40 dias de incubação em diferentes meios de cultura a 25°C, no escuro. BDA-p = batata dextrose ágar-preparado; BDA-c = batata dextrose ágar-comercial; SDA = Sabouraud dextrose ágar; EMPA = extrato de malte peptona ágar. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre os isolados e as letras maiúsculas a comparação entre os tratamentos.

Por outro lado, no cultivo em meio líquido, não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à biomassa do isolado de *G. lloydianum*, mas para o isolado de *G. subiculosum*, o meio de cultura à base de batata (BD-p) apresentou o melhor resultado em relação à massa seca por frasco diante dos demais meios de cultura utilizados no experimento. A diferença entre ambos os isolados foi significativa, sendo que *G. subiculosum* apresentou melhor desenvolvimento micelial em relação a *G. lloydianum* considerando os meios de cultura (Figura 9).

Essa relação entre substrato e crescimento micelial entre os isolados também foi verificada por Donini *et al.* (2005), que avaliaram a velocidade de crescimento micelial *in vitro* de linhagens de *Pleurotus* spp. em diferentes substratos e observaram diferenças significativas na interação entre as linhagens e os substratos em que as mesmas foram avaliadas. Resultados semelhantes também foram apontados por Andrade *et al.* (2008), que avaliaram o crescimento micelial de duas linhagens de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler

submetidas a dez tipos de meio de cultura preparados a partir de extratos de serragem de sete espécies de eucalipto e três clones de eucalipto, e observaram que uma linhagem obteve médias de crescimento micelial superiores às da outra linhagem nas mesmas condições de tratamento.

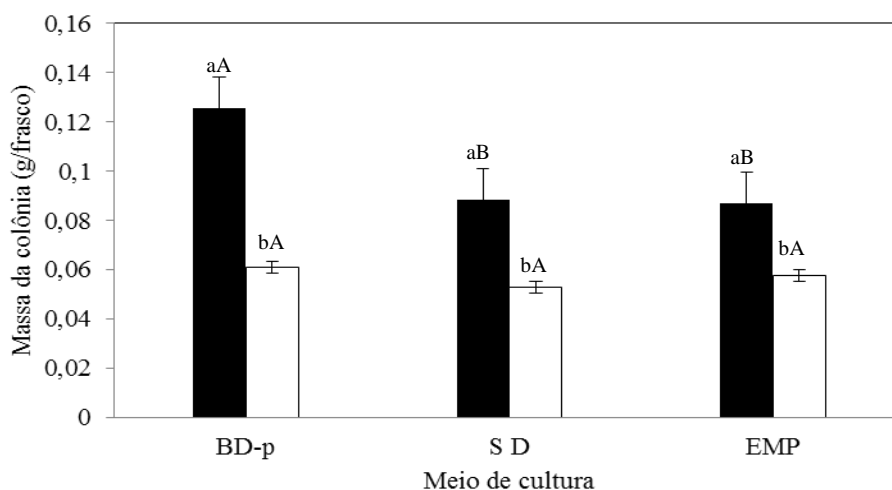


Figura 9. Crescimento micelial de *Geastrum subiculosum* (■) e *G. lloydianum* (□) em diferentes meios de cultura na ausência de ágar incubados a 25°C, no escuro por 40 dias. BD-p = batata dextrose-preparado; SD = Sabouraud dextrose; EMP = extrato de malte peptona. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre os isolados e as letras maiúsculas a comparação entre os tratamentos.

O meio de cultura selecionado para os experimentos seguintes, considerando os resultados obtidos nas análises anteriores, foi o meio preparado à base de batata, uma vez que o mesmo não apresentou diferença entre os meios de cultura sólidos que proporcionaram o melhor resultado e também por ter se sobressaído no experimento em meio de cultura líquido para uma espécie e não diferido para a outra. Outro fator importante considerado na seleção desse meio de cultura foi o fato de seus componentes serem de fácil acesso e de baixo custo de mercado.

4.4. Avaliação do efeito da temperatura no crescimento micelial

Foram testadas quatro temperaturas diferentes para as duas espécies de *Geastrum* inoculados no meio BDA-p. O isolado de *G. lloydianum* não mostrou crescimento quando exposto a 35 e 40°C e o isolado de *G. subiculosum* não se desenvolveu a 40°C (Figura 10).

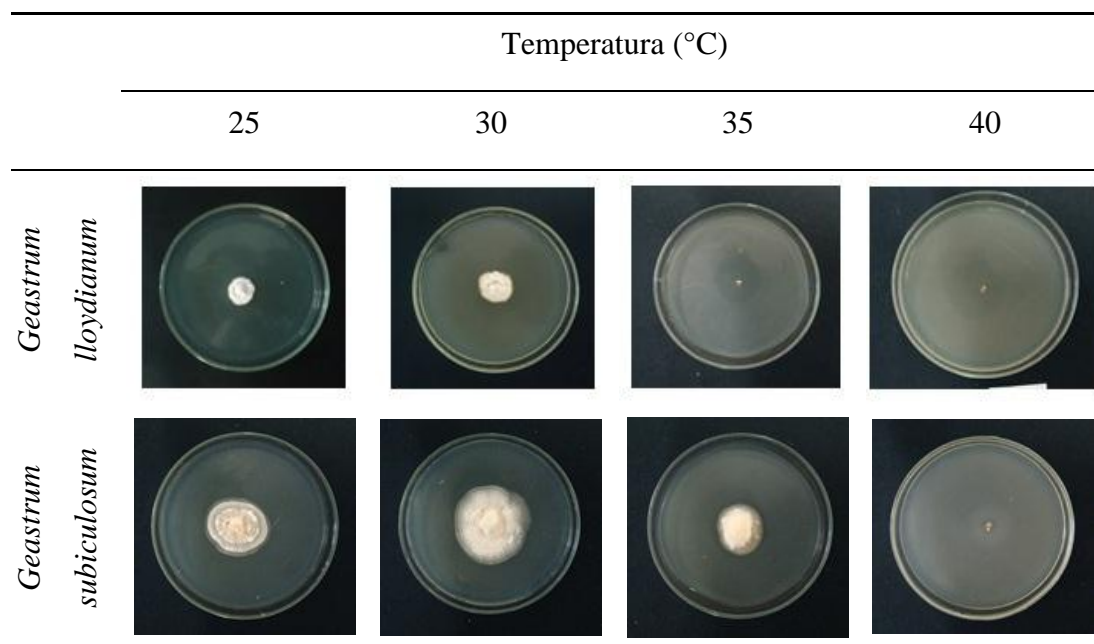


Figura 10. Isolados de *Geastrum lloydianum* e *G. subiculosum* incubados em diferentes temperaturas, no escuro, após 40 dias de incubação em meio BDA-p = Batata dextrose ágar-preparado.

Furlan *et al.* (1997) concluíram ao estudar fungos que crescem em altas temperaturas, que a melhor temperatura de cultivo é em torno de 20 a 30°C, sendo que acima dessa temperatura, o crescimento é paralisado, conforme ocorreu com *G. lloydianum* em nosso estudo. Apesar de não ter crescido na temperatura a 40°C, *G. subiculosum* apresentou desenvolvimento a 35°C. Estes resultados também foram observados por Vargas-Isla e Ishikawa (2008) ao investigar as condições ideais de cultivo de *P. lecomtei*, coletado na Região de Manaus-AM. As análises das autoras mostraram que a espécie avaliada também cresce a 35°C, sendo esse mesmo padrão de resultado verificado por Sales-Campos e Andrade (2010) para a mesma espécie.

Dentre as temperaturas que puderam ser avaliadas para os isolados, observou-se que para *G. subiculosum*, o melhor resultado quanto ao diâmetro da colônia foi observado a 30°C e para *G. lloydianum*, as temperaturas 25 e 30°C não diferiram entre si. No que diz respeito à comparação entre isolados, *G. subiculosum* foi o que apresentou maior diâmetro a 25 e 30°C e o único que apresentou desenvolvimento a 35°C com 40 dias de incubação (Figura 11A). A biomassa seca de ambos os isolados submetida às temperaturas 25 e 30°C não diferiram entre si pelo teste estatístico quando avaliadas separadamente. Todavia, quando o crescimento das espécies foi comparado entre elas, observou-se que *G. subiculosum* apresentou mais biomassa seca que *G. lloydianum* nas mesmas temperaturas (Figura 11B).

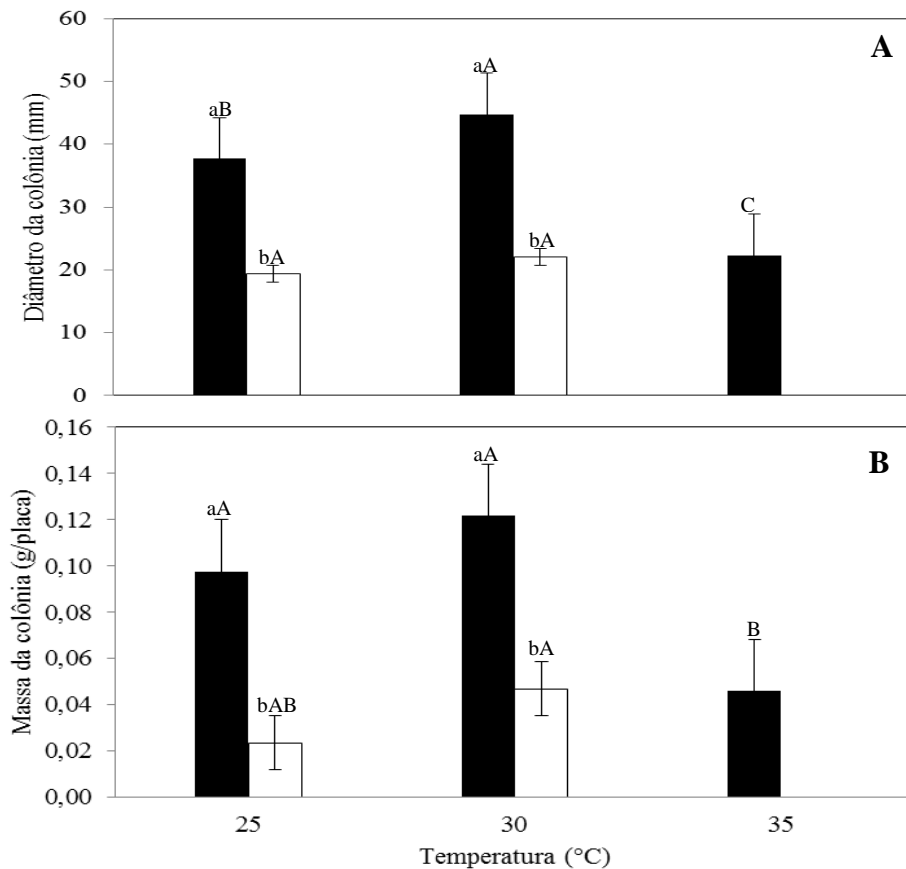


Figura 11. Crescimento micelial de *Geastrum subiculosum* (■) e *G. lloydianum* (□) em diferentes temperaturas de incubação, em meio de cultura BDA-p = Batata dextrose ágar-preparado, no escuro, após 40 dias. A) Diâmetro da colônia (mm). B) Massa da colônia (g/placa). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre os isolados e as letras maiúsculas a comparação entre os tratamentos.

O resultado do cultivo das espécies em meio líquido refletiu o do cultivo em meio sólido quanto ao crescimento micelial. O melhor resultado em crescimento micelial foi a 30°C para ambas as espécies, e assim como em meio de cultura sólido, *G. lloydianum* não apresentou crescimento a 35°C e ambos os isolados não cresceram a 40°C. Ao comparar os isolados nas temperaturas em que as duas espécies cresceram, constatou-se que *G. subiculosum* apresentou melhor desenvolvimento em relação a *G. lloydianum* de acordo com o teste estatístico utilizado (Figura 12).

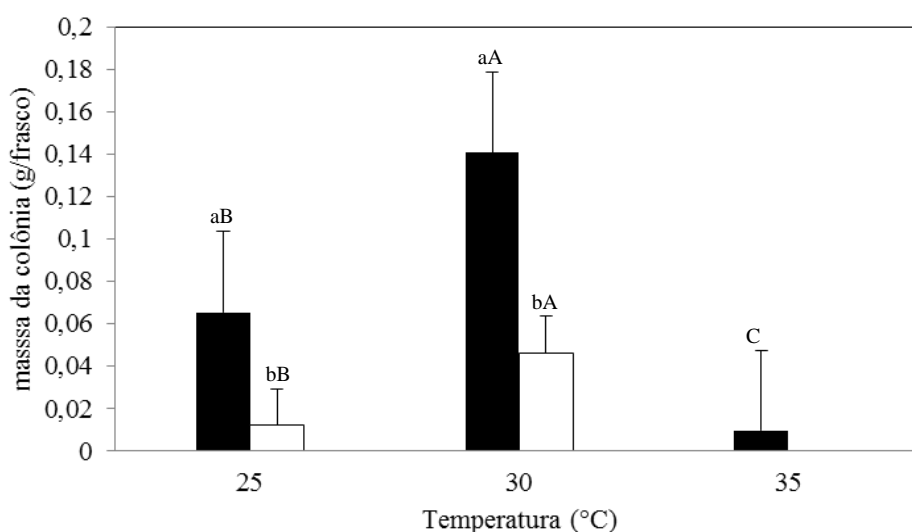


Figura 12. Crescimento micelial (g/frasco) de *Geastrum subiculosum* (■) e *G. lloydianum* (□) em diferentes temperaturas de incubação, por 40 dias em meio BD-p = Batata dextrose-preparado, no escuro. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre os isolados e as letras maiúsculas a comparação entre os tratamentos.

Esses resultados relacionados à temperatura corroboram com Fonseca (2009) que estudou cepas amazônicas de *Datronia brunneoleuca* (Berk.) Ryvar den validada atualmente como *Corilopsis brunneoleuca* (Berk.) Ryvar den, *Trametes lactinea* (Berk.) Sacc. e *L. crinitus* (L.) Fr., cujos basidiomas também foram coletados na região de Manaus-AM. No referido estudo, foi relatado que as espécies apresentaram melhor resposta ao crescimento micelial quando cultivadas a 30°C, porém, o meio Extrato de Malte foi o mais indicado em associação com essa temperatura em comparação ao BDA-c. Diferindo dos resultados de Vargas-Isla e Ishikawa (2008), tendo em vista que *P. lecomtei* cresceu a 35 e 40°C sem diferença significativa entre as duas temperaturas quanto ao diâmetro da colônia, todavia, foi a 35°C que a colônia apresentou estatisticamente, mais biomassa seca.

Na tabela 3 são mostrados os resultados para os isolados de *G. lloydianum* que não apresentaram crescimento a 35 e 40°C e para isolados de *G. subiculosum* que não apresentaram crescimento a 40°C, após o período de 40 dias de incubação, nos meios de cultura sólido e líquido, no escuro. Estes foram transferidos para estufa do tipo BOD por 40 dias com temperatura ajustada a 30°C, considerando o melhor resultado entre as temperaturas testadas. Após a constatação do crescimento, os mesmos parâmetros de crescimento micelial foram analisados e comparados com os resultados das culturas crescidas a 30°C por 40 dias, no escuro.

Tabela 3. Crescimento micelial de dois isolados de *Geastrum* incubados a 30°C por 40 dias após período de 40 dias de dormência.

Isolado	T°C _I	T°C _F	DC (mm)	MSMS (g/placa)	MSML (g/frasco)
<i>Geastrum lloydianum</i>	30	30	22,000a	0,047a	0,052a
	35	30	23,667a	0,055a	0,035b
	CV%		9.07	12.19	11.28
<i>Geastrum subiculosum</i>	30	30	44,667a	0,122a	0,154a
	40	30	27,233b	0,060b	0,60b
	CV%		6.06	18.39	18.82

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. T°C_I = Temperatura inicial. T°C_F = temperatura final. DC = diâmetro da colônia. MSMS = massa seca meio sólido. MSML = massa seca meio líquido.

Foi observado crescimento micelial para os isolados das duas espécies de fungo avaliadas após o período de incubação, tanto para o meio sólido quanto para o meio líquido. No entanto, os isolados de *G. lloydianum* incubados inicialmente a 40°C permaneceram sem desenvolvimento após igual período de incubação em temperatura ótima, tanto em meio sólido, como em meio de cultura líquido. Para os isolados inicialmente incubados a 35°C que não apresentaram crescimento, quando foram expostos a 30°C por igual período de incubação, observou-se crescimento micelial. Não houve diferença significativa quanto ao diâmetro e a biomassa seca entre os isolados avaliados a 30°C inicialmente e os que foram expostos a 30°C após 40 dias a 35°C. Em meio líquido, os isolados que não cresceram inicialmente a 35°C, foram expostos à temperatura ótima, e que após 40 dias de incubação, apresentaram crescimento micelial, no entanto, menos biomassa seca foi observada quando comparados aos isolados avaliados a 30°C inicialmente.

Para *Geastrum subiculosum* o crescimento micelial não foi observado a 40°C, por 40 dias, mas, quando a temperatura foi ajustada para 30°C por igual período de incubação, os isolados apresentaram crescimento micelial. Esse crescimento foi menor tanto em meio sólido

quanto em meio líquido, quando comparado aos isolados incubados diretamente a 30°C no mesmo período de incubação.

Para *Geastrum lloydianum*, a temperatura de 40°C inibe o crescimento considerando os resultados obtidos, ao passo que, a 35°C os isolados podem apresentar um período de dormência, já que foi observado crescimento micelial quando a mesma cultura foi submetida à melhor temperatura de incubação segundo o item 4.4. Para *G. subiculosum*, o período de exposição a 40°C parece ter influenciado negativamente no desenvolvimento do fungo, haja vista a diferença significativa observada nos parâmetros analisados, no entanto, a temperatura inibe o crescimento do fungo, que pode também apresentar uma resistência considerando a alta temperatura a qual foi exposto até que a temperatura mais apropriada para seu desenvolvimento seja restabelecida.

Os relatos na literatura mostram que diversas espécies de fungos podem suportar temperaturas elevadas (Vargas-Isla e Ishikawa 2008; D'Souza-Ticlo *et al.* 2009; Sales-Campos e Andrade 2010; Carlsson *et al.* 2012). D'Souza-Ticlo *et al.* (2009) relataram que o fungo basidiomiceto *Cerrena unicolor* (Bull.) Murrill isolado de madeira em decomposição em áreas de mangue, apresentava temperatura ótima em torno de 70°C. Outro caso de tolerância a temperaturas altas foi descrito por Carlsson *et al.* (2012) que relataram, em experimentos com basidiomicetos decompositores de madeira coletados em áreas de queimadas periódicas, que tais basidiomicetos podem tolerar altas temperaturas, sendo que algumas espécies podem suportar até 220°C por cinco minutos de exposição e outros toleram 180°C por dez minutos.

4.5. Avaliação da agitação do meio líquido no crescimento micelial

Os isolados foram inoculados no meio BD-p em virtude desse meio de cultura ter proporcionado os melhores resultados em relação aos demais meios testados e incubados na melhor temperatura (30°C) em condições de agitação em mesa agitadora. Como controle, os isolados foram inoculados no mesmo de cultura, porém, incubados em condições estacionárias. Na tabela 4 são mostrados os resultados após 40 dias de incubação nessas condições.

Tabela 4. Efeito da agitação do meio líquido no crescimento micelial de *Geastrum subiculosum* e *G. lloydianum* cultivados no meio de cultura batata dextrose-preparado (BD-p) a 30°C, no escuro.

Isolado	Tratamento	
	Com agitação	Sem agitação
<i>Geastrum subiculosum</i>	0,0349 aB	0,0705 aA
<i>Geastrum lloydianum</i>	0,0364 aA	0,0298 bA

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre os isolados e as letras maiúsculas a comparação entre os tratamentos.

A partir desses resultados, é possível perceber que para *Geastrum subiculosum*, a melhor condição de aeração é o crescimento estático, pois foi nessa condição que a espécie apresentou maior biomassa seca. Para *G. lloydianum* não houve diferença significativa entre os tratamentos. Comparando entre os isolados, observou-se que, quando eles são mantidos sob agitação, não se observa diferença na biomassa seca após o período de incubação, entretanto, em condições estacionárias, *G. subiculosum* apresentou maior biomassa significativamente em comparação com *G. lloydianum*.

Andrade (2011) concluiu que a condição estática ou de agitação não influenciou o crescimento micelial da espécie *T. lactinea*, assim como foi relatado aqui para *G. lloydianum*. Rezende *et al.* (2005) também não relatou diferença na biomassa de *P. ostreatus* quando estudou o seu crescimento considerando estes tratamentos. No entanto, para *P. lecomtei* a melhor condição de crescimento é sob efeito da agitação (Vargas-Isla e Ishikawa 2008), fato também constatado por Silva (2010) para *Pycnoporus sanguineu* (L.) Murrill.

4.6. Efeito do pH inicial do meio de cultura no crescimento micelial

As espécies *Geastrum subiculosum* e *G. lloydianum* apresentaram crescimento micelial em todos os pHs testados. Para *G. subiculosum*, o melhor desenvolvimento micelial ocorreu quando o meio de cultura teve o pH ajustado para 7 e o pior desempenho no pH 4 e 5. Os isolados de *G. lloydianum* também apresentaram melhor desenvolvimento no pH 7, sendo

que os demais tratamentos não apresentaram diferença entre si. Os isolados das duas espécies não apresentaram diferença quando cultivados em meio de cultura com pH ajustado para 5, entretanto, nos demais tratamentos, *G. subiculosum*, apresentou mais biomassa seca que *G. lloydianum* após o período de incubação (Figura 13).

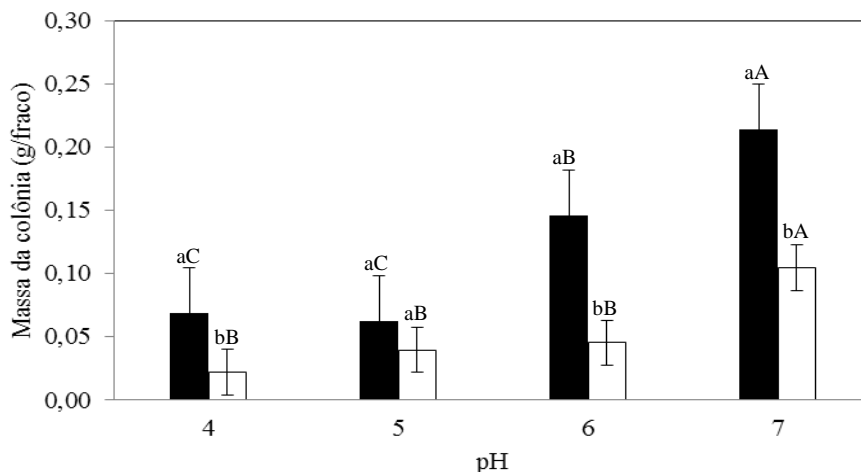


Figura 13. Crescimento micelial de *Geastrum subiculosum* (■) e *G. lloydianum* (□) em Batata dextrose ágar-preparado incubado com diferentes pHs por 40 dias sem agitação, no escuro. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre os isolados e as letras maiúsculas a comparação entre os tratamentos.

Segundo Vargas-Isla e Ishikawa (2008), o pH entre 5 e 7 melhor contribuiu para o crescimento de *P. lecomtei* e assim como para as espécies *Geastrum* estudadas, o pH 4 não proporcionou bom desempenho aos isolados, o que diferiu dos dados de Andrade (2011) que estudou o crescimento micelial em pHs diferentes para o basidiomiceto *T. lactinea* coletado também no perímetro urbano de Manaus-AM. A autora conclui que o melhor desenvolvimento micelial ocorreu quando o meio de cultura teve o pH ajustado para 4 e o pior desempenho no pH 9. Vukojević *et al.* (2006) encontraram algo semelhante ao estudar o efeito do pH inicial sobre a biomassa de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. onde observaram que a maior produção de biomassa foi observada entre pH 4,5 e 5, o que também diferiu dos dados relatados neste estudo.

4.7. Germinação *in vitro* dos basidiósporos e isolamento do micélio monocariótico

A densidade de esporos de ambas as espécies contabilizados nas suspensões em câmara de Neubauer foi de 1.360.000 esporos/mL, sendo que em cada placa de Petri foram

semeados cerca de 68.000 esporos. Nas figuras 14 e 15 é mostrado o período de germinação dos esporos e o desenvolvimento do micélio até seu isolamento para *Geastrum lloydianum* e *G. subiculosum*, respectivamente. A observação das colônias monocarióticas para as duas espécies iniciou a partir de 35 dias de incubação (Figura 14A e 15A), sendo observada até 40 dias depois da incubação (Figura 14D e 15D). Após a germinação, os micélios monocarióticos das duas espécies foram isolados em meio de cultura BDA-p (Figura 14E e 15E) e as culturas puras foram obtidas (Figura 14G e 15G).

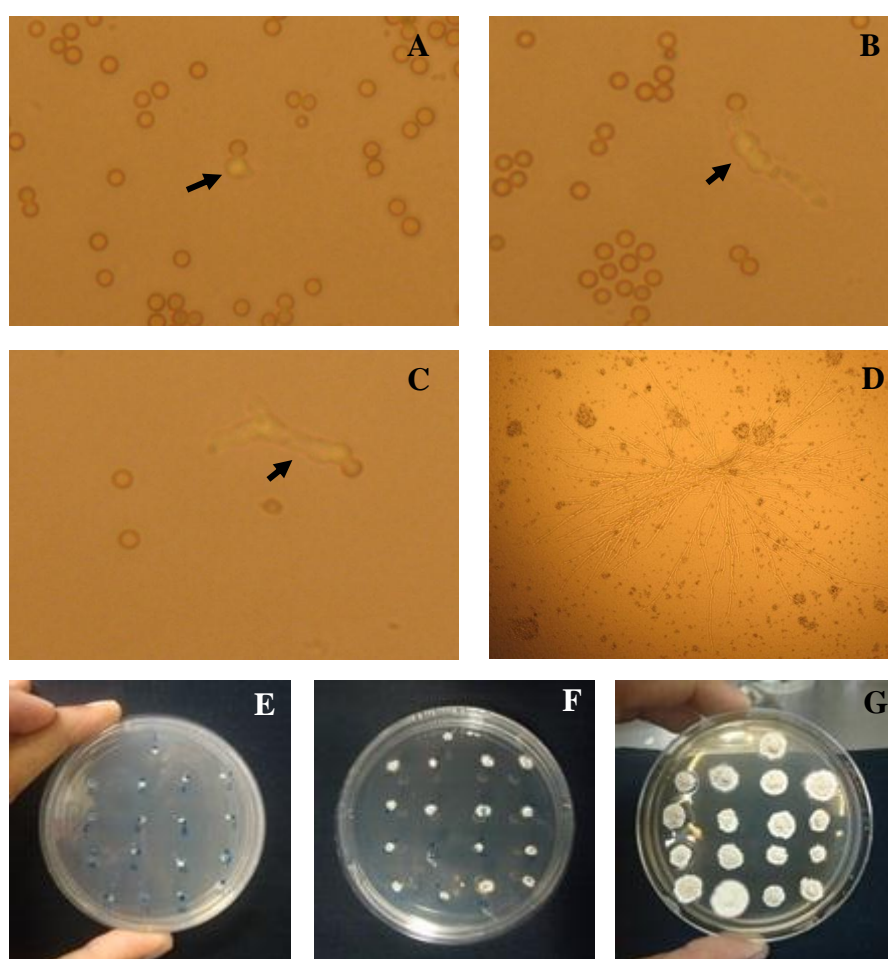


Figura 14. Germinação de esporos e isolamento de micélio monocariótico de *Geastrum lloydianum*. A) Esporo germinado (seta) com 35 dias de incubação. B e C) Desenvolvimento da hifa monocariótica (seta) a partir de 35 dias de incubação (Aumento de 400x). D) Desenvolvimento da hifa monocariótica (seta) com 40 dias de incubação (Aumento de 100x). E) Isolamento do micélio monocariótico. F) Micélio monocariótico com 15 dias de incubação. G) Micélio monocariótico com 35 dias de incubação, no escuro.

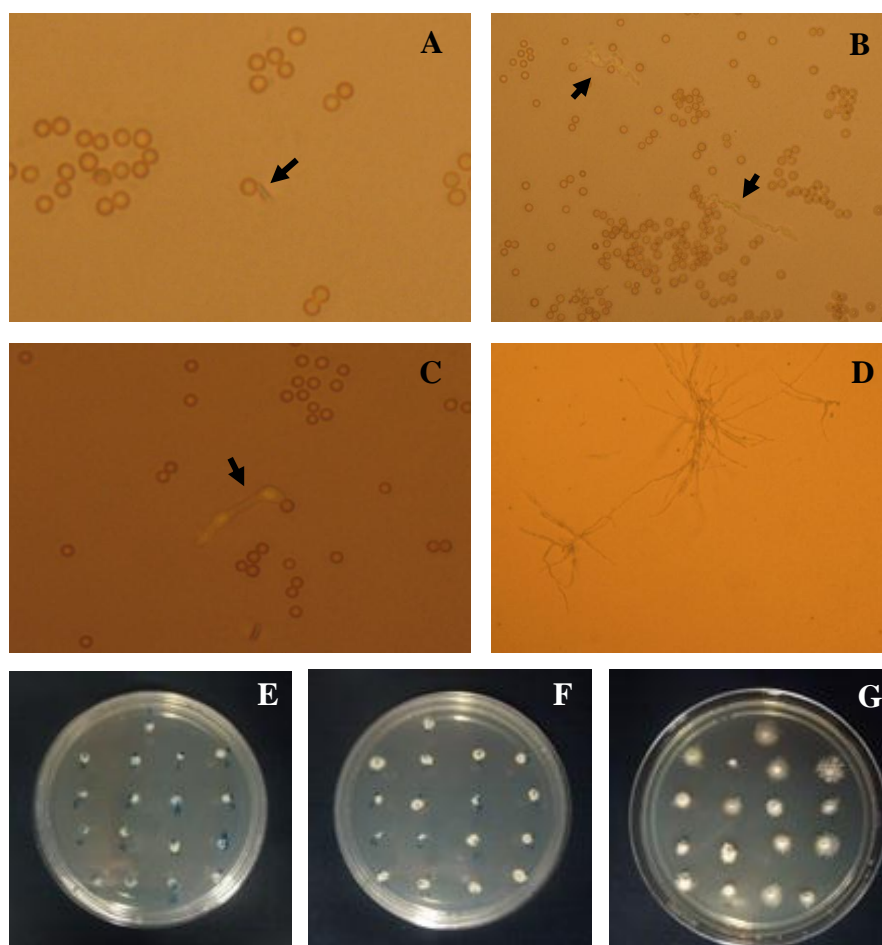


Figura 15. Germinação de esporos e isolamento de micélio monocariótico de *Geastrum subiculosum*. A) Esporo germinado (seta) com 35 dias de incubação. B e C) Desenvolvimento da hifa monocariótica (seta) a partir 35 dias de incubação (Aumento de 200 e 400x respectivamente). D) Desenvolvimento da hifa monocariótica com 40 dias de incubação (Aumento de 100x). E) Isolamento do micélio monocariótico. F) Micélio monocariótico com 15 dias de incubação. G) Micélio monocariótico com 35 dias de incubação, no escuro.

As observações quanto ao tempo de germinação dos esporos das duas espécies de *Geastrum* pode ser considerada longo se comparado ao tempo em que esporos de outras espécies germinam. Nesse sentido, convém mencionar que basidiósporos de *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr. alcançam 87,33% de germinação em 10 horas de incubação em caldo de batata (Dulay *et al.* 2012) e *Lentinula edodes* levou de sete a oito dias para germinar em três dos quatro meios de culturas testados, sendo que no meio BDA, a germinação iniciou no quinto dias de incubação (Kalmis e Kalyoncu 2006).

A germinação da espécie *Rhizopogon rubescens* (Tul.) Tul. e considerada pelo *Index Fungorum* como sinônimo de *R. roseolus* (Corda) Th. Fr., leva de duas a três semanas para ocorrer (Kawai *et al.* 2008). Contudo, os esporos do fungo gasteroide *Pisolithus tinctorius*

(Pers.) Coker & Couch, considerado sinônimo de *P. arhizus* (Scop.) Rauschert, Z. Pilzk. germinam a partir de 60 dias de incubação (Carvalho *et al.* 1997), tempo superior ao demandado pelas espécies desse estudo.

Stoytchev *et al.* (2001) relatam a germinação de esporos para *G. pouzarii* em meio extrato de malte na mesma temperatura em que os esporos de *G. lloydianum* e *G. subiculosum* germinaram. Kuhar e Papinutti (2009) tentaram a germinação de esporos para *G. episcopale* Kuhar & Papin também em meio malte ágar quando descreveram a espécie, contudo, não obtiveram êxito, nem apresentaram maiores detalhes sobre a tentativa de germinação.

Ao final dos isolamentos, foram obtidas 96 colônias monocarióticas de *Geastrum subiculosum* e 84 de *G. lloydianum*, sendo estas repicadas para outras placas de Petri e mantidas nas mesmas condições de cultivo em que germinaram para desenvolvimento do micélio, acompanhamento do estado monocariótico e posterior uso nos cruzamentos.

Durante o desenvolvimento dos micélios isolados, contabilizou-se 67,7% de culturas de *G. subiculosum* com grampo de conexão, assim como 66,7% nas culturas de *G. lloydianum*. A dificuldade encontrada na obtenção de culturas monocarióticas puras demonstra estar relacionada com a concentração de esporos inoculados, de forma que o adensamento dos mesmos facilita o pareamento e migração dos núcleos logo após a germinação. Isso foi constatado para ambas às espécies por consequência da distância entre os basidiósporos na placa de Petri, que cruzaram logo após a germinação (Figura 16A e 17A). Estes foram isolados e em placa de Petri (90 mm Ø) contendo meio BDA-p (figura 16B e 17B) e incubados a 25°C em estufa do tipo BOD na ausência da luz, sendo microscopicamente acompanhados para a constatação da presença do grampo de conexão na colônia resultante (Figura 16C e 17C).

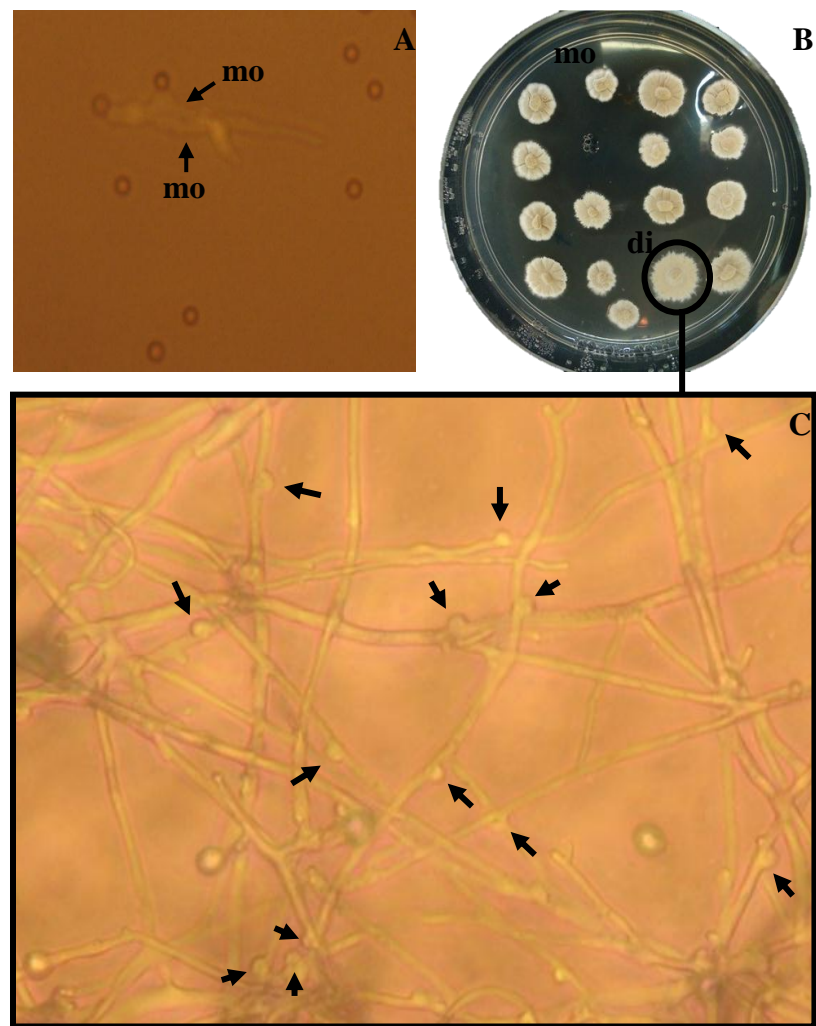


Figura 16. Cruzamento não induzido de micélio monocariótico *in vitro* de *Geastrum lloydianum*. A) Monocários pareados (mo) após 35 dias de incubação, no escuro. B) Micélio monocariótico (mo) e dicariótico (di) isolados após 35 dias de incubação. C) Hifas do micélio dicariótico cruzado *in vitro* com destaque para os grampos de conexão (seta) (Aumento de 400x).

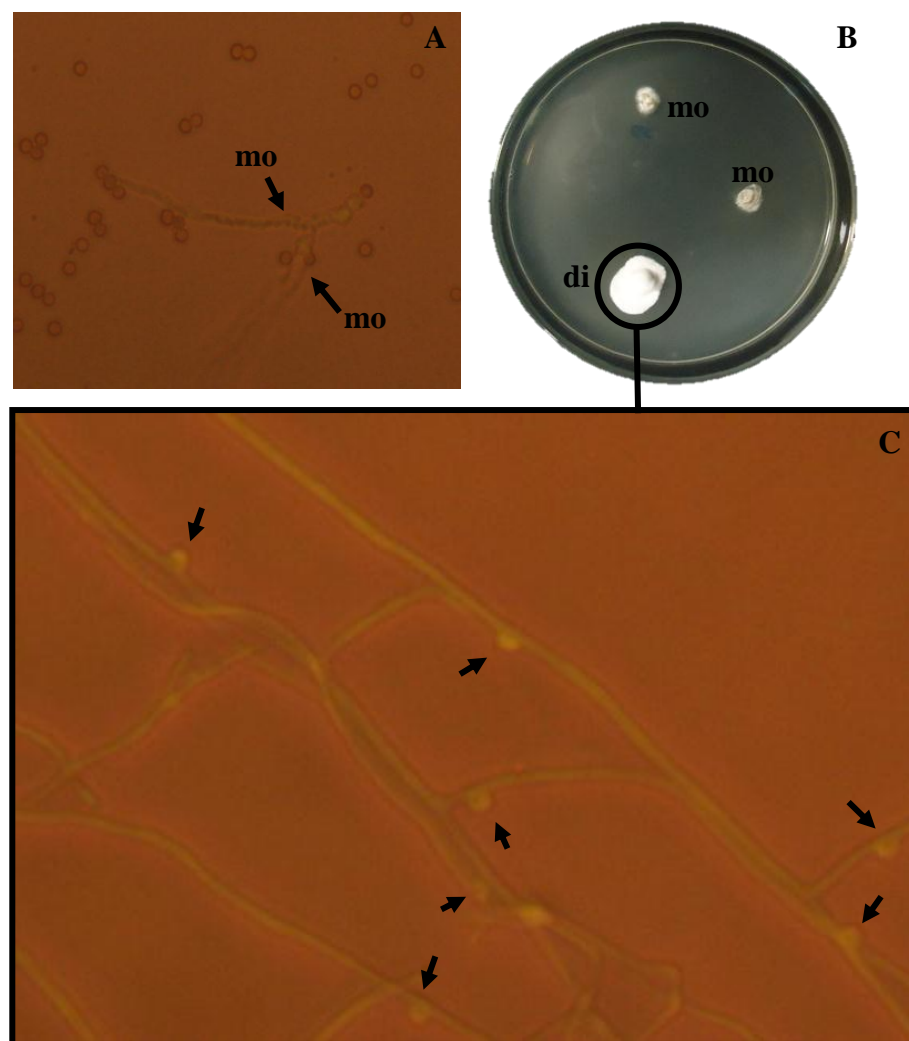


Figura 17. Cruzamento não induzido de micélio monocariótico *in vitro* de *Geastrum subiculosum*. A) Monocários pareados (mo) após 35 dias de incubação, no escuro. B) Micélio monocariótico (mo) e dicariótico (di) isolados após 35 dias de incubação. C) Hifas do micélio dicariótico cruzado *in vitro* com destaque para os grampos de conexão (seta) (Aumento de 400x).

Em fungos basidiomicetos, o grampo de conexão indica que houve cruzamento (Taylor *et al.* 2000; Taylor *et al.* 2006), e portanto, denotando que as condições aqui testadas são propícias para estudos de compatibilidade sexual em *Geastrum lloydianum* e *G. subiculosum*, assim como para uso na taxonomia biológica por meio do cruzamento.

Das culturas monocarióticas, comprovadas pela ausência do grampo de conexão, que foram estocadas para *G. subiculosum* e *G. lloydianum*, cerca de 48,4 e 60,7% respectivamente, não apresentaram mais desenvolvimento micelial em meio de cultura e portanto, foram descartadas. Assim, 14 culturas monocarióticas de *G. subiculosum* e 11 colônias de *G. lloydianum* foram preservadas em tubos de ensaio inclinados contendo 10 mL de BDA-

p, estas culturas foram mantidas em estufa do tipo BOD, na ausência de luz, para os testes de cruzamento.

4.7.1. Percentual de germinação *in vitro* de basidiósporos de *Geastrum subiculosum*

Para cada tratamento foram inoculados 66×10^5 esporos, sendo 33×10^4 esporos por placa de Petri. O tratamento com água destilada + Tween 80 (ADT) apresentou maior número de esporos germinados em relação ao tratamento com solução salina (0,85%) + Tween 80 (SST) no mesmo período e sob as mesmas condições de cultivo em laboratório. O antibiótico usado foi eficaz contra o crescimento bacteriano, entretanto, um percentual de contaminação de 40% para o primeiro tratamento e 60% para o segundo foi observada durante o período do experimento para fungos oportunistas.

Na tabela 4 é mostrada a quantidade total de esporos germinados nos diferentes tratamentos. As estimativas dos valores médios do número de esporos germinados por tratamento e, conseqüentemente, as análises estatísticas de comparação de médias não foram efetuadas devido à falta de homogeneidade entre os dados, justificada pela alta taxa de germinação em uma repetição e completa ausência de germinação em outra do mesmo tratamento. Esses resultados sugerem que a germinação de um ou mais esporos e a formação inicial de uma colônia possa influenciar na germinação de outros esporos. Resultados semelhantes quanto a falta homogeneidade em relação à germinação também foram observados por Carvalho *et al.* (1997) para *P. arhizus*.

Tabela 4. Número de esporos de *Geastrum subiculosum* germinados por tratamento.

Método utilizado	Nº de esporos/placa	Nº de esporos germinados
ADT	330.000	197
SST	330.000	18

ADT = Água Destilada + Tween 80. SST = Solução Salina (0,85%) + Tween 80.

Se for considerada regra de três simples e as condições as quais os basidiósporos foram expostos, em um milhão de esporos, em média 74,6 esporos germinam com o uso do

primeiro tratamento e 6,8 esporos com o segundo tratamento. Essa baixa taxa de germinação em condições de laboratório é historicamente relatada na literatura para fungos gasteromicetos (Bulmer 1964; Fries 1978; Fries 1987; Carvalho *et al.* 1997) e ainda sendo alvo de estudos atualmente (Silvério 2013). A germinação de basidiósporos do gênero *Pisolithus*, por exemplo, varia de 0,001 a 0,38% (Bulmer 1964; Silvério 2013).

Diante da dificuldade de obtenção de micélio monocariótico para os fungos gasteromicetos, alguns fatores foram apontados para justificar a baixa germinação, sendo um deles a mobilização de reservas de carbono e lipídios apontados por Bago *et al.* (2002), e assim como a estrutura da parede celular associada à sua hidrofobicidade que pode estar associando a recalcitrância dos basidiósporos à germinação. Porém, em relação a este último, Silvério (2013) atingiu a permeabilidade de 88% dos esporos de *P. microcarpus* (Cooke & Masee) G. Cunn., todavia, obteve uma taxa de germinação baixa.

4.8. Pareamento *in vitro* do micélio monocariótico

Quando o pareamento foi induzido para ambas às espécies (Figura 18A e 19A), os micélios monocarióticos mostraram capacidade de cruzar entre si e estabelecer um micélio dicariótico com a visualização de grampos de conexão (Figura 18B e 19C), comprovando assim a compatibilidade sexual entre os monocários para *Geastrum lloydianum* e *G. subiculosum*, respectivamente. A presença de grampos de conexão nas culturas oriundas do cruzamento induzido mostra que as condições as quais foram impostas são propícias para o estudo de compatibilidade sexual em ambas as espécies de *Geastrum*.

Esses resultados também sinalizam que a técnica apresenta potencial em eventuais estudos taxonômicos para o grupo com uso do conceito biológico de espécie. Segundo Taylor *et al.* (2000) e Taylor *et al.* (2006), no momento em que o micélio monocariótico de dois indivíduos se unirem na formação do micélio dicariótico, confirma-se a compatibilidade sexual entre ambos por meio da visualização do grampo de conexão, logo, confirma-se que tais monocários pertencem a mesma espécie biológica.

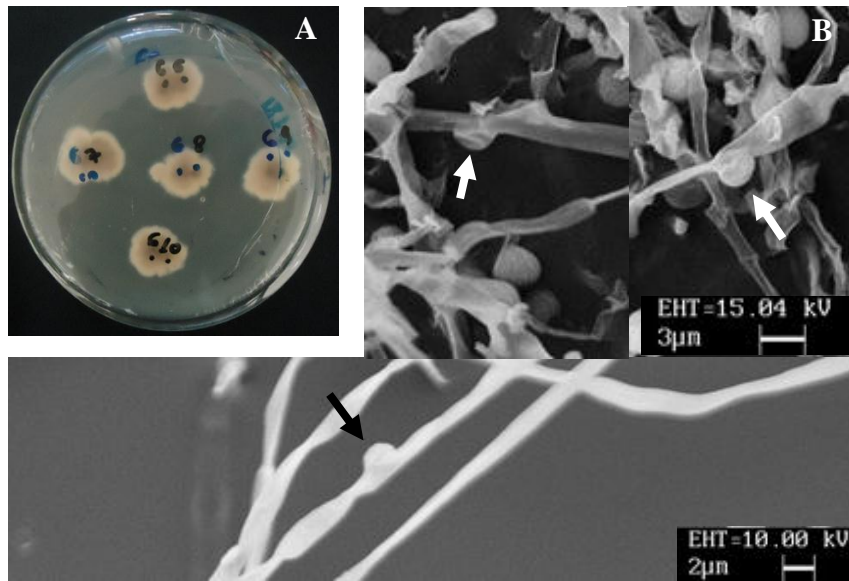


Figura 18. Cruzamento intraespecífico *in vitro* de *Geastrum lloydianum*. A) Culturas pareadas em placa de Petri após 30 dias de incubação, no escuro. B) Hifas dicarióticas oriundas do cruzamento intraespecífico. As setas indicam a presença do grampo de conexão.

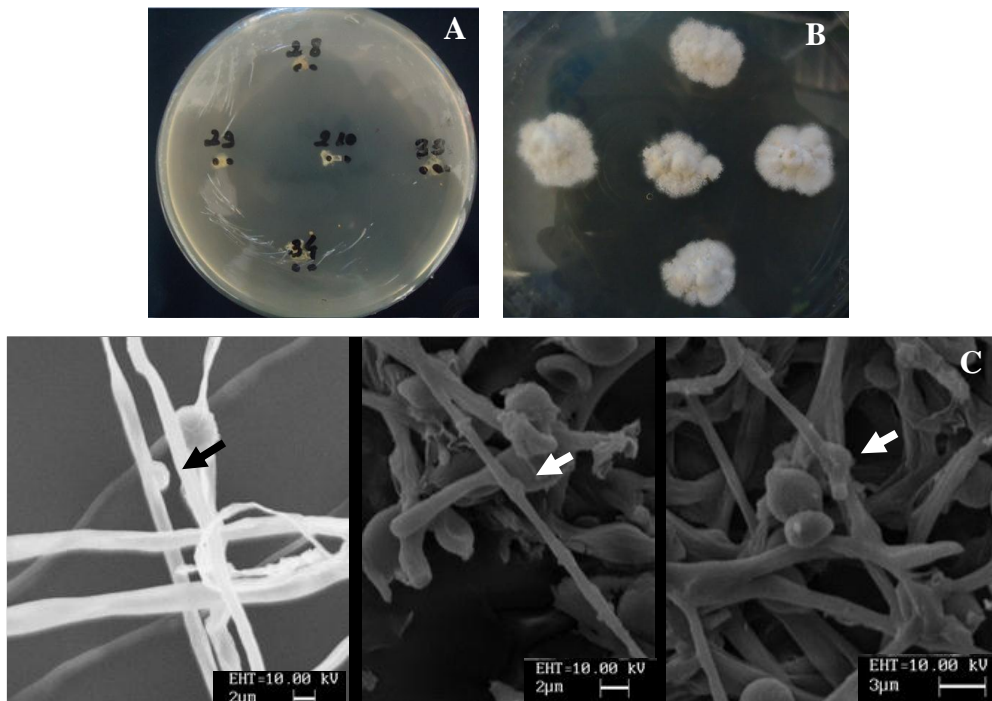


Figura 19. Cruzamento intraespecífico *in vitro* de *Geastrum subiculosum*. A) Culturas monocarióticas pareadas em placa de Petri. B) Culturas pareadas em placa de Petri após 30 dias de incubação, no escuro. C) Hifas dicarióticas oriundas do cruzamento intraespecífico. As setas indicam a presença do grampo de conexão.

Na figura 20 são mostrados os resultados das análises de DNA para os micélios dicarióticos oriundos do basidioma e os micélios dicarióticos oriundos do cruzamento *in vitro* para as duas espécies de *Geastrum*. Foi observada grande similaridade entre as amostras que correspondem à mesma espécie e clara separação entre as amostras de espécies diferentes, evidenciando que os cruzamentos podem unir ou separar espécies e, portanto, o conceito biológico de espécie pode ser empregado segundo as definições presentes na literatura (Giraud *et al.* 2008).

Para de *G. lloydianum*, os micélios dicarióticos resultantes do cruzamento *in vitro* dos monocários foram agrupamentos considerando a similaridade com os micélios dicarióticos isolados do basidioma, mostrando que os monocários utilizados nos pareamento pertenciam de fato a esta espécie. Para *G. subiculosum*, os micélios dicarióticos que tem origem a partir do basidioma e os micélios dicarióticos formados a partir do cruzamento entre os monocários, também foram agrupados no mesmo clado, sugerindo grande similaridade entre os mesmos e denotando também que o cruzamento ocorreu entras micélios monocarióticos dessa espécie.

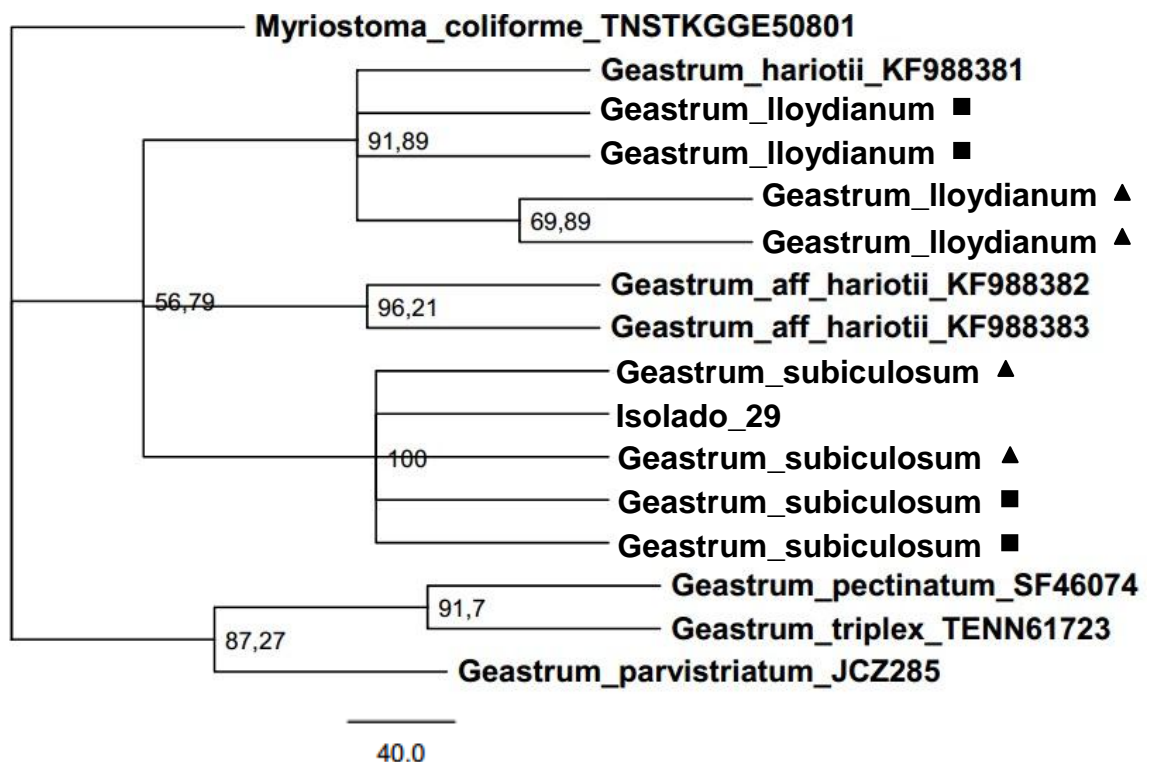


Figura 20. Árvore filogenética mostrando a similaridade molecular entre micélio dicariótico extraído do basidioma (■) e micélios dicarióticos oriundos do cruzamento *in vitro* (▲) para *Geastrum lloydianum* e *G. subiculosum*. A árvore foi construída baseadas em seqüências de rDNA (ITS1, 5,8S e ITS2).

Mesmo que o presente estudo trate de pareamentos entre culturas monocarióticas obtidas a partir do mesmo corpo de frutificação, ele indica que o método apresentado pode ser expandido para estudos com as demais espécies do grupo, pois populações que, mesmo separadas geograficamente ou diferenciadas em maior ou menor grau morfológicamente, mantiveram a capacidade de entrecruzar quando em contato eventual, seriam consideradas como integrantes de uma mesma espécie, a despeito de quaisquer outras diferenças entre elas como relatado na literatura (Anderson *et al.* 1980; Carvalho *et al.* 1997; Capelari e Fungaro 2003).

No trabalho de Carvalho *et al.* (1997), as duas populações de *Pisolithus* Alb. & Schwein. estudadas apresentaram capacidade de cruzar entre si, revelando que ambas as populações pertencem a mesma espécie biológica. Anderson *et al.* (1980) parearam isolados de micélio monocariótico de *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm., Führ. Pilzk. para examinar as relações de cruzamento entre indivíduos de ocorrência na Europa e na América do Norte, haja vista que em estudos anteriores, isolados do mesmo continente eram considerados como espécies biológicas diferentes. O estudo mostrou que por meio do cruzamento dos micélios monocarióticos foi possível detectar que os isolados pertenciam apenas a uma espécie biológica, independente do local de ocorrência, já que apresentavam a capacidade de cruzarem entre si.

Capelari e Fungaro (2003) usaram critérios morfológicos, crescimento radial da colônia em meio de cultura, variabilidade genética e testes de intercompatibilidade para identificação de isolados de duas espécies de *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. subgênero *Coremiopleurotus*, *P. cystidiosus* O.K. Mill. e *P. smithii* Guzmán de amostras de isolado brasileiro de diferentes locais de coleta. Considerando que os critérios morfológicos utilizados não foram suficientes para suportar a separação das duas espécies, a semelhança genética e o fato das duas espécies terem apresentado compatibilidade sexual, as autoras concluíram que ambas as espécies deveriam ser consideradas sinônimas, aumentando a distribuição das mesmas para a América do Sul.

Este estudo viabiliza futuros trabalhos envolvendo o sistema de compatibilidade sexual e torna-se uma ferramenta para a taxonomia, principalmente na Amazônia, considerando a falta de taxonomistas e o complexo processo de identificação das espécies do gênero *Geastrum*.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da grande diferença morfológica entre as duas espécies estudadas, o comportamento em condições de laboratório é semelhante. De forma que, para ambas as espécies são sugeridas as mesmas condições de crescimento micelial (Batata Dextrose Ágar-preparado, a 30°C de incubação em modo estacionário e com o meio ajustado para pH 7.0).

Quanto à obtenção do micélio monocariótico, o mesmo meio de cultura indicado para o cultivo micelial das duas espécies, também é apropriado para a obtenção de monocários a partir da germinação, que inicia a partir de 35 a 40 dias de incubação a 25°C. Quanto à taxa de germinação de *G. subiculosum*, esta foi considerada baixa.

O cruzamento foi comprovado pela presença do grampo de conexão no micélio resultante para ambas as espécies, além de serem confirmadas pelas análises filogenéticas, denotando que as condições aqui apresentadas são propícias para os estudos de compatibilidade sexual para o grupo, tornando-se assim, uma ferramenta para taxonomia e pode ser usada para comprovar espécie biológica para o gênero *Geastrum*.

6. BIBLIOGRAFIA CITADA

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th. ed. Wiley, & Sons, New York, USA, 1996, 869p.

Anderson, J.B.; Korhonen, K.; Willricp, R.C. 1980. Relationships between European and North American Biological Species of *Armillaria mellea*. *Experimental Mycology*, 4: 87-95.

Andrade, A.L.C.de. 2011. Aspectos do crescimento e influência de parâmetros físicos na atividade da lacase do fungo amazônico *Trametes lactinea*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, 116p.

Andrade, M.C.N.; Silva, J.H.da; Minhoni, M.T.; Zied, D.C. 2008. Mycelial growth of two *Lentinula edodes* strains in culture media prepared with sawdust extracts from seven eucalyptus species and three eucalyptus clones. *Acta Scientiarum Agronomy*, 30: 333-337.

Bago, B.; Zipfel, W.; Williams, R.M.; Jun, J.; Arreola, R.; Lammers, P.J.; Pfeffer, P.E.; Shachar-Hill, Y. 2002. Translocation and utilization of fungal storage lipid in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Plant Physiology*, 128: 108-124.

Barata, M.; Basilio, M.C.; Baptista-Ferreira, J.L. 1997. *Nia globospora*, a new marine gasteromycete on baits of *Spartina maritima* in Portugal. *Mycological Research*, 101: 687-690.

Baseia, I.G.; Silva, B.D.B.da; Cruz, R.H.S.F. da.; Santana, F.de. 2014. *Fungos gasteroides no semiárido do nordeste brasileiro*. 1ed. Print Mídia, 2014. 132p.

Blackwell, M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98: 426-438.

Bulmer, G.S. 1964. The in vitro production of abortive fructifications of *Lycoperdon Pusillum* Pers. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 44: 192-195.

Cabral, T.S.; Silva, B.D.B.da; Ishikawa, N.K.; Alfredo, D.S.; Braga-Neto, R.; Clement, C.R.; Baseia, I.G. 2014. A new species and new records of gasteroid fungi (Basidiomycota) from Central Amazonia, Brazil. *Phytotaxa*, 183: 1-16.

- Calonge, F.D.; Mata, M.; Carranza, J. 2005. Contribución al catálogo de los Gasteromycetes (Basidiomycotina, Fungi) de Costa Rica. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 62: 23-45.
- Capelari, M.; Fungaro, M.H.P. 2003. Determination of biological species and analysis of genetic variability by RAPD of isolates of *Pleurotus* subgenus *Coremiopleurotus*. *Mycological Research*, 107: 1050-1054.
- Carlsson, F.; Edman, M.; Holm, S.; Eriksson, A.M.; Jonsson, B.G. 2012. Increased heat resistance in mycelia from wood fungi prevalent in forests characterized by fire: a possible adaptation to forest fire. *Fungal Biology*, 116: 1025-1031.
- Carvalho, D.; Rosado, S.C.S.; Souza, A.M.; Oliveira, A.F. 1997. Produção de culturas monocarióticas e compatibilidade sexual intra e interpopulacional para o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*. *Cerne*, 3: 143-160.
- Cooke, M.C. 1887. A quarterly recorde of cryptogamic botany and its literature. Some Australian Fungi. *Grevillea*, 76: 9-101.
- Cortez, V.G. 2009. *Estudos sobre Fungos Gasteroides (Basidiomycota) no Rio Grande do Sul*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Rio Grande do Norte. 286p.
- Cortez, V.G.; Baseia, I.G.; Guerrero, R.T.; Silveira, R.M.B. 2008. Two sequestrate cortinarioid fungi from Rio Grande do Sul, Brazil. *Hoehnea*, 35: 4513-518.
- Cunningham, G.H. 1942. *The Gasteromycetes of Australia and New Zealand*. Printed privately by John McIndoe, Dunedin, New Zealand, 1942, 158p.
- D'Souza-Ticlo, D.; Sharma, D.; Raghukumar, C. 2009. A thermostable metal-tolerant laccase with bioremediation potential from a marine-derived fungus. *Marine Biotechnology*, 11: 725-737.
- Donini, L.P.; Bernardi, E.; Minotto, E.; Nascimento, J.S. 2005. Desenvolvimento *in vitro* de *Pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72: 331-338.

Dulay, R.M.R.; Cabrera E.C.; Kalaw S.P.; Reyes R.G. 2012. Optimal growth conditions for basidiospore germination and morphogenesis of Philippine wild strain of *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr. *Mycosphere*, 3: 926-933.

Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. 2013. *Raven Biology of Plants*. 8th. ed. Worth Publishers, New York, 2013, 880p.

Fazolino, E.P.; Colonge, F.D.; Baseia, I.G. 2008. *Geastrum entomophilum*, a new earthstar with an unusual spore dispersal strategy. *Mycotaxon*, 104: 449-453.

Ferreira, A.V.B. 2005. Fungos - Os primórdios do sexo. *Ciência Hoje*, 37: 34-41.

Fonseca, M.D.P. 2009. Produção de Enzimas Oxidativas por Fungos Amazônicos Degradadores de Madeira. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, 72p.

Forzza, R.C.; Baumgratz, J.F.A.; Bicudo, C.E.M.; Canhos, D.A.L.; Carvalho Jr., A.A.; Coelho, M.A.N.; et al. 2012. New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. *Bio Science*, 62: 39-45.

Fries, N. 1978. Basidiospore germination in some mycorrhiza forming hymenomycetes. *Transactions of the British Mycological Society*, 70: 319-324.

Fries, N. 1987. Ecological and evolutionary aspects of spore germination in the higher basidiomycetes. *Transactions of the British Mycological Society*, 88: 1-7.

Furlan, S.A.; Virmond, L.J.; Miers, D.A.; Bonatti, M.; Gern, R.M.M.; Jonas, R. 1997. Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13: 689-692.

Giraud, T.; Refrégier, G.; Gac, M.L.; Vienne, D.M.; Hood, M.E. 2008. Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 791-802.

Guerra-Dore, C.M.P.; Azevedo, T.C.G.; Souza, M.C.R.; Rego, L.A.; Dantas, J.C.M.; Silva, F.R.F.; Rocha, H.A.O.; Baseia, I.G.; Leite, E.L. 2007. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of β -glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. *International Immunopharmacology*, 7: 1160-1169.

- Guzmán, G. 1986. Distribucion de los hongos en la region del Caribe y zonas vecinas. *Caldasia*, 15: 104-120.
- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95: 641-655.
- Hawksworth, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105: 1422-1432.
- Hawksworth, D.L. 2012. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? *Biodiversity and Conservation*, 21: 2425-2433.
- Hemmes, D.E.; Desjardin, D.E. 2011. Earthstars (*Geastrum*, *Myriostoma*) of the Hawaiian Islands including two new species, *Geastrum litchiforme* and *Geastrum reticulatum*. *Pacific Science*, 65: 477-496.
- Hibbett, D.S.; Binder, M.; Bischoff, J.F.; Blackwell, M.; Cannon, P.F.; *et al.* 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111: 509-547.
- Hibbett, D.S.; Gilbert, L.B.; Donoghue, M.J. 2000. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature*, 407: 506-508.
- Hibbett, D.S.; Pine, E.M.; Langer, E.; Langer, G.; Donoghue, M.J. 1997. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 12002-12006.
- Hosaka, K. *et. al.*, 2006. Molecular phylogenetics of the gomphoid-phalloid fungi with an establishment of the new subclasses Phallomycetidae and two new orders. *Mycologia*, 98: 949-959.
- Kalmis, E.; Kalyoncu, F. 2006. Variations in the isolates obtained from basidiospores of commercial mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake). *International Journal of Science & Technology*, 2, 99-103.
- Karun, N.C.; Sridhar, K.R. 2014. Geasters in the Western Ghats and west coast of India. *Acta Mycologica*, 49: 207-219.

- Kawai, M.; Yamahara, M.; Ohta, A. 2008. Bipolar incompatibility system of an ectomycorrhizal basidiomycete, *Rhizopogon rubescens*. *Mycorrhiza*, 18: 205-210.
- Kendrick, B. 2001. *The Fifth Kingdom*. 3th. ed. Newburyport, MA: Focus Publishing, 2001, 369p.
- Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; Minter, D.W.; Stalpers, J. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10th. ed. CAB International. Wallingford, 2008, 771p.
- Kuhar, F.; Papinutti, L. 2009. *Geastrum episcopale*: a new noticeable species with red-violet exoperidium. *Mycologia*, 101: 535-538.
- Lewinsohn, T.M.; Prado, P.I. 2005. Quantas espécies há no Brasil? *Megadiversidade*, 1: 36-42.
- Lodge, D.J.; Ammirati, J.F.; O'Dell, T.E.; Mueller, G.M. 2004. Collecting and describing macrofungi. In: Mueller, G.M.; Bills, G.F.; Foster, M.S. 2004. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, Oxford, UK. 2004, 777p.
- Miller, Jr.O.K; Miller, H.H. 1988. Gasteromycetes. morphology and development features with keys to the orders, families, and genera. *Mad River Press*. 157p.
- Mswaka, A.Y.; Magan, N. 1999. Temperature and water potential relations of tropical *Trametes* and other wood-decay fungi from the indigenous forests of Zimbabwe. *Mycological Research*, 103: 1309-1317.
- Mueller, G.M.; Schmit, J.P. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, 16: 1-5.
- Perez, E.F. 2009. *O gênero Geastrum Pers. (Phallomycetidae, Basidiomycota) em algumas áreas de mata atlântica e caatinga no Rio Grande do Norte, Brasil*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Rio Grande do Norte. 77p.
- Raeder, U.; Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 17-20.
- Reijnders, A.F.M.A. 2000. A morphogenetic analysis of the basic character of the Gasteromycetes and their relation to other basidiomycetes. *Mycological Research*, 104: 900-910.

- Rezende, M.I.; Barbosa, A.M.; Vasconcelos, A.F.D.; Haddad, R.; Dekker, R.F.H. 2005. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, Scepter® (imazaquin). *Journal of Basic Microbiology*, 45: 232-240.
- Rinaldi, A.C.; Comadini, O.; Kuyper, T.W. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity*, 33, 1-45.
- Sales-Campos, C.; Andrade, M.C.N.de. 2010. Temperatura e meio de cultura mais favoráveis ao crescimento micelial de uma linhagem de *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. *Arquivos do Instituto Biológico*, 77: 539-543.
- Sales-Campos, C.; Eira, A.F.da; Jesus, M.A.de; Campagnolli, F.; Andrade, M.C.N.de. 2008. Crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* em resíduo de *Simarouba amara*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 1633-1635.
- Schmit, J.P.; Mueller, G.M. 2007. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation*, 16: 99-111.
- Silva, B.D.B.da; Sousa, J.O.; Baseia, I.G. 2011. Discovery of *Geastrum xerophilum* from the Neotropics. *Mycotaxon*, 118: 355-359.
- Silva, B.D.B.da; Cabral, T.S.; Marinho, P.; Ishikawa, N.K.; Baseia, I.G. 2013. Two new species of *Geastrum* (Geastraceae, Basidiomycota) found in Brazil. *Nova Hedwigia*, 96: 445-456.
- Silva, N.M.da. 2010. Avaliação do potencial antimicrobiano, enzimático e de crescimento de um isolado Amazônico do Fungo *Pycnoporus sanguineus*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 180p.
- Silvério, M.A.M. 2013. *Permeabilização e ultraestrutura da parede celular de basidiósporos de Pisolithus microcarpus*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 53p.
- Sousa, J.O.; Morais, L.A.; Nascimento, Y.M.; Baseia, I.G. 2014a. Updates on the geographic distribution of three *Geastrum* species from Brazilian semi-arid region. *Mycosphere*, 5: 467-474.

- Sousa, J.O.; Silva, B.D.B.; Alfredo, D.S.; Baseia, I.G. 2014b. New records of Geastraceae (Basidiomycota: Phallomycetidae) from Atlantic rainforest remnants and relicts of Northeastern Brazil. *Darwiniana, nueva serie*, 2: 207-221.
- Stoytchev, I.; Homolka, L.; Nerud, F. 2001. *Geastrum pouzarii* Staněk in agar culture. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79: 363-364.
- Sunhede, S. 1989. *Geastraceae* (Basidiomycotina): morphology, ecology and systematics with special emphasis on the North European species. (Synopsis Fungorum 1) *Fungiflora*, 1989, 534p.
- Taylor, J.W.; Jacobson, D.J.; Kroken, S.; Kasuya, T.; Geiser, D.M.; Hibbett, D.S.; Fisher, M.C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31: 21-32.
- Taylor, J.W.; Turner, E.; Townsend, J.P.; Dettman, J.R.; Jacobson, D. 2006. Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 361: 1947-196.
- Thiers, H.D. 1984. The secotioid syndrome. *Mycologia*, 76: 1-8.
- Trierveiler-Pereira, L.; Baseia, I.G. 2009. A checklist of the Brazilian gasteroid fungi (Basidiomycota). *Mycotaxon*. 108: 441-444.
- Trierveiler-Pereira, L.; Calonge, F.D.; Baseia, I.G. 2011. New distributional data on *Geastrum* (Geastraceae, Basidiomycota) from Brazil. *Acta Botanica Brasilica*. 25: 577-585.
- Trierveiler-Pereira, L.; Silveira, R.M.B.da. 2012. On the *Geastrum* species (Geastraceae, Basidiomycota) described by Rick. *Phytotaxa*, 61: 37-46.
- Vargas-Isla, R. 2012, *Taxonomia, biologia e produção de semente-inóculo de Panus strigellus, um cogumelo comestível da Amazônia*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 122p.
- Vargas-Isla, R.; Capelari, M.; Menolli Jr, N.; Nagasawa, E.; Tokimoto, K.; Ishikawa, N.K. 2015. Relationship between *Panus lecomtei* and *P. strigellus* inferred from their morphological, molecular and biological characteristics. *Mycoscience*, in press.

Vargas-Isla, R.; Ishikawa, N.K. 2008. Optimal conditions of *in vitro* mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon. *Mycoscience*, 49: 215-219.

Vukojević, J.; Stajić, M.; Duletić-Laušević, S.; Simonić, J. 2006. Effect of medium pH and cultivation period on mycelial biomass, polysaccharide, and ligninolytic enzyme production by *Ganoderma lucidum* from Montenegro. *Archives of Biological Science Belgrade*, 58: 179-182.

Webster, J.; Weber, R.W.S. 2007. *Introduction to Fungi*. 3th. ed. Cambridge; New York: Cambridge University, 2007, 841p.

Zürcher, M.I.M. 1966. Contribucion al estudio de los Gasteromicetes de Costa Rica. Tesi de grado. Universidad de Costa Rica, Costa Rica, 120p.

7. ANEXO

7.1. Parecer da Aula de qualificação



DIVISÃO DOS
CURSOS DE
PÓS-GRADUAÇÃO

AULA DE QUALIFICAÇÃO



PARECER

Aluno (a): **MARCOS DIONES FERREIRA SANTANA**
Curso: BOTÂNICA
Nível: Mestrado
Orientadora: Dra Noemia Kazue Ishikawa e **Co-orientação** Dr. Iuri Goulart Baseia

Título:

"Condições de crescimento micelial e sistema de reprodução de três espécies de macrofungos do gênero Geastrum Pers. (Geastraceae, Basidiomycota)"

BANCA JULGADORA

TITULARES:

CHARLES ROLAND CLEMENT
CRISTINA SAYURI MAKI
JOSÉ RENATO CAVALLAZZI

SUPLENTES:

ROGÉRIO EUI HANADA
MARIA APARECIDA DE JESUS

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
CHARLES ROLAND CLEMENT	(<input checked="" type="checkbox"/>) Aprovado () Reprovado	
CRISTINA SAYURI MAKI	(<input checked="" type="checkbox"/>) Aprovado () Reprovado	
JOSÉ RENATO CAVALLAZZI	(<input checked="" type="checkbox"/>) Aprovado () Reprovado	

Manaus (AM), 24 de Janeiro de 2014.

OBS: *A banca recomenda repensar os experimentos do uso de cultura para considerar as interações e usar repouso nos estudos curados de repouso.*

Michael John Gilbert Hopkins
Coordenador Substituto do Programa de
Pós-Graduação em Botânica
PO. 272/2012 DCB/INPA

7.2. Ata da defesa pública da dissertação



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Aos vinte nove dias do mês de julho de 2015 às 09:00h, na sala de seminários da biblioteca do INPA-Campus I, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Dr. José Renato Pereira Cavallazzi, Universidade Federal do Amazonas -UFAM, Dra. Ruby Vargas- Isla, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia INPA, Dr. Rogério Eiji Hanada, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia INPA, tendo como suplentes: Dra. Maria Aparecida de Jesus, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia INPA, Dra. Cristina Sayuri Maki, Universidade Federal do Amazonas -UFAM, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, intitulada: “*Geastrum lloydianum* E *G. subiculosum*: germinação de esporos, obtenção de culturas monocarióticas e dicarióticas, e condições de crescimento micelial *in vitro*”, discente: **Marcos Diones Ferreira Santana**, sob orientação: Dra. Noemia Kazue Ishikawa – INPA, e Coorientação: Dr. Iuri Goulart Baseia - UFRN. Após a exposição, dentro do tempo regulamentar, a discente foi argüida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
JOSÉ RENATO PEREIRA CAVALLAZZI	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
RUBY VARGAS- ISLA	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
ROGÉRIO EIJI HANADA	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
MARIA APARECIDA DE JESUS	<input type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
CRISTINA SAYURI MAKI	<input type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO

Manaus (AM), 29 de Julho de 2015.

OBS: *A banca aprova, porém o aluno deve fazer as correções sugeridas pela banca.*

Nada mais havendo, foi lavrado a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

[Handwritten Signature]
 Dr. Michael John Gilbert Hopkins
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Botânica
 Tel. 948/2011 - DDC 367/INPA