

Melhoramento genético de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. : Fr.) Kumm. por cruzamentos multispóricos visando a obtenção de isolados resistentes ao calor

Regina Helena Marino^{1,3}, Augusto Ferreira da Eira² e Elvio Queiroz Cardoso²

Recebido: 13.09.2005; aceito: 14.06.2006

ABSTRACT - (Genetic breeding of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. : Fr.) Kumm. by multisporic crossing aiming to obtain resistant neat strains). The cultivate of *Pleurotus ostreatus* requires low temperature for basidioma induction and development. The aim of this work was genetic breeding seeking *P. ostreatus* heat resistance. Parental isolates were composed of seven dark lineages that are fruitful in low temperature and a white lineage that is fruitful in high temperature. Genetic breeding was performed using multisporic crossings and genetic stability was evaluated in three re-isolation cycles. From 533 crossings, 32.9% fructified at 28 °C. Sixteen isolates were selected with gray pileus at 28 °C precocious and high biological efficiency. Parental isolates were improved concerning heat resistance (28 °C), pileus coloration, primordial formation precocity, biological efficiency and handling resistance.

Key words: edible mushrooms, genetic breeding, *Pleurotus*

RESUMO - (Melhoramento genético de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. : Fr.) Kumm. por cruzamentos multispóricos visando a obtenção de isolados resistentes ao calor). O cultivo de *Pleurotus ostreatus* exige baixa temperatura para indução e desenvolvimento dos basidiomas. Com o objetivo melhorar geneticamente *P. ostreatus* visando a resistência ao calor foram utilizados como parentais sete isolados que frutificam a baixa temperatura e uma linhagem branca que frutifica à temperatura elevada. O melhoramento genético foi realizado por cruzamentos multispóricos e a estabilidade genética avaliada em três ciclos de reisolamentos. Dos 533 cruzamentos, 32,9% frutificaram a 28 °C. Dezesesseis isolados que apresentaram píleo cinza a 28 °C, precocidade elevada e eficiência biológica, foram selecionados. Os isolados parentais foram melhorados quanto à resistência ao calor (28 °C), coloração do píleo, precocidade na formação dos primórdios e colheita, eficiência biológica e resistência ao manuseio.

Palavras-chave: cogumelos comestíveis, melhoramento genético, *Pleurotus*

Introdução

Pleurotus ostreatus é um cogumelo comestível com grande interesse biotecnológico devido à sua habilidade decompositora de inúmeros resíduos agrícolas e pela produção de basidiomas de alta qualidade organoléptica (Rajarathnam & Bano 1987).

No Brasil, este cogumelo vem ganhando importância, principalmente no Estado de São Paulo, com a introdução de isolados provenientes do Japão. Entretanto, estes isolados são adaptados à zona temperada, onde as espécies selvagens normalmente são cultivadas no outono, pelo sistema axênico (substrato autoclavado), por

apresentar uma produção mais regular e mais precoce, quando comparado com o sistema natural, que utiliza substrato compostado e pasteurizado (Eira 2004).

Por outro lado, há relatos de uma variedade de *P. ostreatus*, a var. *florida*, capaz de frutificar em temperaturas acima de 25 °C (Eger *et al.* 1978) e um isolado da Tailândia também resistente à temperatura elevada (Kinugawa *et al.* 1997). Eger *et al.* (1978) e Kinugawa *et al.* (1997) relataram que os cogumelos cultivados em temperatura elevada apresentam píleo branco. No Brasil, os principais consumidores deste tipo de cogumelo exigem basidiomas de coloração cinza a cinza-chumbo.

1. Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Engenharia Agrônômica, 49100-000 São Cristóvão, Sergipe, Brasil
2. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Departamento de Produção Vegetal, Caixa Postal 237, 18610-307 Botucatu, SP, Brasil
3. Autor para correspondência: rehmarino@yahoo.com

Desta forma, é desejável o melhoramento genético visando à obtenção de isolados de *P. ostreatus* resistentes ao calor, com píleo cinza a cinza-chumbo, mais adaptados ao clima tropical e subtropical e ao cultivo axênico, podendo propiciar o cultivo em períodos mais amplos e não apenas no inverno, com maior produtividade e custos de produção reduzidos. Isto possibilitará ao consumidor ter maior oferta e acesso a um alimento rico em proteínas, representando um avanço na produção e comercialização deste tipo de cogumelo.

Material e métodos

Origem dos isolados parentais – Os isolados usados neste estudo estão listados na tabela 1.

Produção de basidiomas dos isolados parentais – Os isolados foram multiplicados em meio de cultura SDA (59,8% de serragem de *Eucalyptus* spp. suplementada com 20% de farelo de trigo, 20% de farelo de arroz e 0,2% de calcário; 10 g dextrose; 13 g agar), segundo a metodologia de Eira & Minihoni (1997) e incubados a 25 ± 1 °C por uma semana. Em seguida, foram cultivados em substrato à base de serragem de *Eucalyptus* spp. suplementada com farelos na mesma proporção descrita para o meio de cultura. A produção foi realizada em câmara climatizada, à temperatura de 15 ± 5 °C, com luminosidade de 26×10^6 fluxo m^2 , fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de 85-90%.

A indução de primórdios foi realizada após a completa colonização do substrato (30 dias), pela retirada da tampa e pelo acréscimo de uma lâmina d'água de 2 a 3 cm de espessura, durante 4 horas. Em seguida, foi retirado o excesso de água e os frascos transferidos para câmaras de frutificação.

Tabela 1. Caracterização dos isolados parentais de *Pleurotus ostreatus* usados nos cruzamentos, quanto à temperatura de frutificação¹. ¹Fonte: Marino *et al.* (2003); n.f. - não frutificou.

Sigla	Código da Micoteca	Temperatura de frutificação	
		15 ± 5 °C	28 ± 5 °C
A	Pos 96/05	píleo cinza a cinza-chumbo	n.f.
B	Pos 97/12	píleo cinza a cinza-chumbo	n.f.
C	Pos 97/14	píleo cinza a cinza-chumbo	n.f.
D	Pos 97/15	píleo cinza a cinza-chumbo	n.f.
E	Pos 97/17	píleo cinza a cinza-chumbo	n.f.
F	Pos 98/37	píleo cinza	píleo albino
G	Pos 98/38	píleo cinza a cinza-chumbo	n.f.
H	Pos 98/40	píleo cinza a cinza-chumbo	n.f.

Cruzamentos multispóricos – Os basidiomas desenvolvidos foram transferidos, individualmente, para placas de Petri, previamente autoclavadas. Posteriormente, em condições assépticas, os esporos foram coletados segundo a metodologia de Fritsche (1978). A partir dos esporos obtidos, foram feitas suspensões, utilizando-se 2 mL de água destilada autoclavada e, em seguida, foram realizados os cruzamentos. Fixou-se o isolado F (Pos 98/37), por ser o único a frutificar a 28 °C e apresentar polimorfismo genético através de análise prévia de RAPD (Marino *et al.* 2003). Os cruzamentos foram realizados através da mistura de 1 mL da suspensão de esporos do isolado F com 1 mL da suspensão do isolado a ser cruzado e, com auxílio de uma alça em “O”, foi transferida uma gota desta suspensão mista para o centro de uma placa de Petri com SDA e incubados por uma semana a 28 ± 1 °C, no escuro. Durante o período de colonização formaram-se setores com crescimento micelial diferente, que foram isolados e identificados por um número seqüencial após a letra do isolado (A a H) seguido pela letra F (isolado fixo, Pos 98/37).

Avaliação dos cruzamentos em condições de laboratório – Os cruzamentos foram avaliados, quanto à indução de primórdios, em câmaras de crescimento com temperatura de 28 ± 5 °C, intensidade luminosa de 26×10^6 fluxo m^2 , fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de 85-90%. Foram realizadas três repetições por cruzamento. Avaliação dos setores quanto à uniformidade das colônias – Os setores foram avaliados, quanto à uniformidade da colônia (circular ou irregular) e possíveis setoriamentos, em meio de cultura SDA à temperatura de 28 ± 1 °C, em câmara de crescimento, durante até 7 dias, com três repetições. Para tanto, as colônias foram fotografadas com câmara digital PhotoWise Agfa 1.280 na resolução 307S de 0,81 mega pixels.

Avaliação dos setores selecionados em condições de produção – Os isolados que apresentaram colônias circulares e resistência ao calor foram selecionados e avaliados em câmaras climatizadas de produção, em serragem suplementada com farelos, na mesma proporção descrita para o meio de cultura. O cultivo foi realizado à temperatura de 28 ± 5 °C, com luminosidade de $3,5 \times 10^6$ fluxo m^2 , fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de 85-90%, com 10 repetições.

O micélio resultante dos cruzamentos, após a produção, foi cultivado durante três ciclos sucessivos. A cada ciclo de reisolamento avaliou-se a precocidade na formação de primórdios e de colheita, a eficiência biológica e as características fenotípicas.

Caracterização molecular dos isolados parentais e recombinantes – Os isolados parentais e os recombinantes de *Pleurotus ostreatus* foram caracterizados pelo método RAPD (Williams *et al.* 1990), com extração e quantificação do DNA segundo a metodologia de Sadowsky *et al.* (1987) e Kuramae-Izioka (1997).

Os “primers” testados obtidos da Operon foram OPA-01 a 20, OPB-01 a 19, OPG-04 a 18, OPP-01 a 14, OPX-01 a 08. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador (MJ research) de acordo com Williams *et al.* (1990). As amostras e o marcador molecular Ladder 1 Kb (Gibco BRL Life Technologies, Inc.) foram analisados em gel de agarose 1,5% em solução TBE (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M ácido bórico, 0,02 mM EDTA, pH 8,0) contendo 10 µL de brometo de etídio (10 µg mL⁻¹). O gel foi submetido à corrida eletroforética em tampão TBE, com aproximadamente 120 V por 3 horas. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Na análise de polimorfismo entre os parentais e os recombinantes foram selecionados os primers OPA-03, OPB-10 e OPX-08 e construído o dendrograma.

Para tanto, a comparação entre isolados foi realizada para cada “primer” com base na presença (1) ou ausência (0) de produtos amplificados de mesmo tamanho. As bandas de mesmo tamanho foram consideradas idênticas. A similaridade genética entre os isolados foi calculada usando o programa “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System” (NTSYS), com o coeficiente “Simple Matching” (SM) e a construção do dendrograma pelo método UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average”).

Resultados e Discussão

Foram obtidos 533 cruzamentos e desses 12 foram perdidos por contaminação. Desses cruzamentos multispóricos 59,4% formaram colônias uniformes circulares com crescimento micelial diferenciado entre os recombinantes (figuras 1, 2). Este comportamento também foi observado por Horgen *et al.* (1996), com isolados de *Agaricus bisporus* originários de culturas multispóricas.

Elliott & Langton (1981) mencionaram que a seleção de novos isolados não deve ser prontamente comercializada a partir de resultados em placas de Petri, pois o crescimento micelial nesta fase não está correlacionado com o potencial de produção. No entanto, o acompanhamento do crescimento micelial

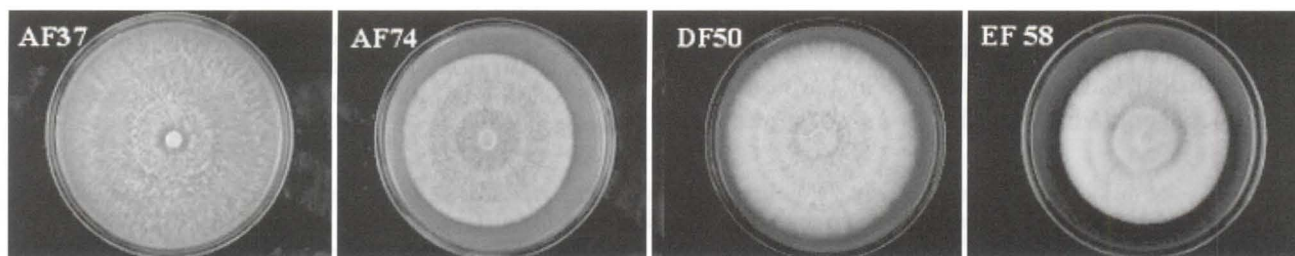


Figura 1. Colônias estáveis e circulares dos recombinantes, obtidas dos cruzamentos multispóricos entre isolados de *Pleurotus ostreatus* (Isolados parentais: A – Pos 96/05; D – Pos 97/15; E – Pos 97/17; F – Pos 98/37).

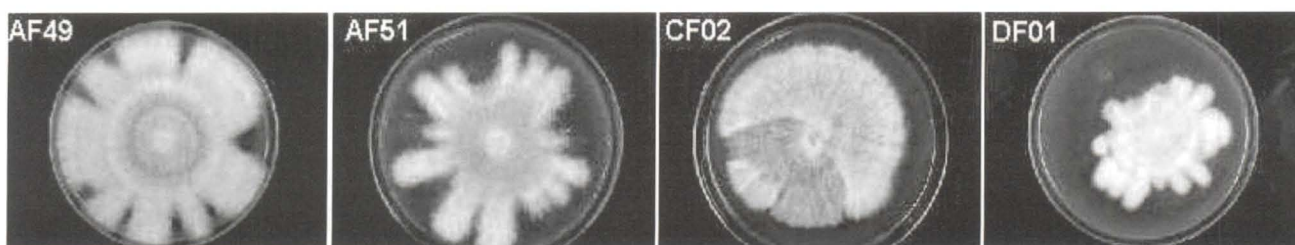


Figura 2. Colônias dos recombinantes, apresentando setores obtidas dos cruzamentos multispóricos entre isolados de *Pleurotus ostreatus* (Isolados parentais: A – Pos 96/05; C – Pos 97/14; D – Pos 97/15; F – Pos 98/37).

em placas de Petri é importante na seleção de isolados que não apresentem setores, fato que pode afetar a produtividade e morfologia dos cogumelos devido à recombinação somática (Li *et al.* 1994), herança extra-cromossômica (Matsumoto & Nakai 1996), perda de alelos ou polimorfismo genético (Labarère *et al.* 1991, Chen *et al.* 1996). Neste experimento, observou-se que 22,7% dos cruzamentos desenvolveram colônias que formaram setores (tabela 2, figura 2), atestando que pode haver uma significativa instabilidade genética dentro de setores aparentemente homogêneos. Esta instabilidade é desfavorável na produção comercial de inoculantes obtidos de esporos sem uma avaliação em condições de laboratório e de produção, tal como mencionado por Fritsche (1978). Li *et al.* (1994) sugeriram que os setores podem influenciar a produção, formar cogumelos deformados ou até não formarem basidiomas.

Em termos de variabilidade genética, os recombinantes AF48 e DF02 apresentaram 72% de similaridade com os parentais escuros, confirmando o comportamento observado em condições de produção, uma vez que foram mais tardios na indução de primórdios, similar aos isolados parentais escuros. Já os recombinantes mais bem adaptados à temperatura de 28 °C apresentaram 57% de similaridade com o parental albino F, resistente ao calor (figura 3).

Os parentais escuros (A, B, C, D, E, G e H) apresentaram 85% de similaridade entre si, apesar de terem origens distintas. Esta alta similaridade também foi observada em isolados comerciais de *P. ostreatus* (Larraya *et al.* 1999) enquanto o isolado parental branco (F), o único capaz de

produzir cogumelos a 28 °C, apresentou apenas 50% de similaridade genética com os parentais escuros (figura 3).

O sucesso dos cruzamentos multispóricos, em termos genéticos, pode ser evidenciado pelo fato de que 32,9% dos recombinantes induziram primórdios a 28 °C e apresentaram similaridade genética com os parentais entre 57 a 72% (tabela 3, figura 3), ou

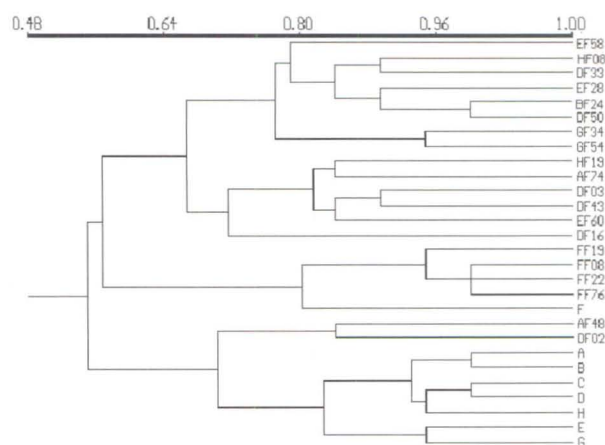


Figura 3. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no Coeficiente "Simple Matching", a partir das bandas obtidas por RAPD com os "primers" OPA-03, OPB-10 e OPX-08, em análises de isolados de *Pleurotus ostreatus*. Isolados parentais: A – Pos 96/05; B – Pos 97/12; C – Pos 97/14; D – Pos 97/15; E – Pos 97/17; F – Pos 98/37; G – Pos 98/38 e H – Pos 98/40) e recombinantes (Isolados recombinantes com pilaço branco resistentes ao calor: FF08, FF19, FF22, FF76; Isolados recombinantes com pilaço cinza a cinza-chumbo resistentes ao calor: AF48, AF74, BF24, DF02, DF03, DF16, DF43, DF50, EF28, EF58, EF60, GF34, GF54, HF08 e HF19) selecionados obtidos por cruzamentos multispóricos.

Tabela 2. Dados médios da uniformidade (circular ou irregular) das colônias repicadas de cada setor e presença de setoriamento nos cruzamentos multispóricos de *Pleurotus ostreatus*, em câmara de crescimento. ¹Isolados parentais: A – Pos 96/05; B – Pos 97/12; C – Pos 97/14; D – Pos 97/15; E – Pos 97/17; F – Pos 98/37; G – Pos 98/38 e H – Pos 98/40; ²Número de setores isolados dentro do grupo de cruzamento; ³Porcentagem de colônias sem setoriamento (estáveis); ⁴Porcentagem de colônias circulares (diâmetro uniforme); ⁵Porcentagem de colônias irregulares (diâmetro desuniforme); ⁶Porcentagem de colônias com setoriamento (instáveis).

Cruzamento ¹	Número de setores ²	Estável ³ e circular ⁴	Estável e irregular ⁵	Instável ⁶ e circular	Instável e irregular	Somatória
AF	81	59,3	9,9	13,6	17,3	100
BF	76	27,6	43,4	0,0	28,9	100
CF	32	53,1	12,5	0,0	34,4	100
DF	49	73,5	14,3	0,0	12,2	100
EF	75	61,3	20,0	0,0	18,7	100
FF	79	74,7	7,6	0,0	17,7	100
GF	91	68,1	3,3	2,2	26,4	100
HF	38	57,9	15,8	0,0	26,3	100
Média		59,4	15,8	2,0	22,7	

seja, houve recombinação genética com obtenção de isolados resistentes ao calor.

Rajarithnam & Bano (1987) mencionaram que nos cruzamentos monospóricos apenas 25% são sexualmente compatíveis podendo ou não induzir primórdios, no caso de espécies de basidiomicetos com herança sexual tetrapolar, a exemplo de *P. ostreatus*. Entre os cruzamentos com primórdios, apenas 12,6% apresentaram cogumelos desenvolvidos a 28 °C em câmara de crescimento e o restante abortou ou paralisou o desenvolvimento (tabela 3).

Estudos sobre o processo genético de indução de primórdios e formação de basidiomas foram relatados para *Agaricus bisporus* (Ospina-Giraldo *et al.* 2000), *Lentinula edodes* (Ohga & Royse 2001, Miyazaki *et al.* 2002), *Volvariella volvacea* (Chen *et al.* 2004) e *Pleurotus ostreatus* (Suguimoto *et al.* 2002, Hou *et al.* 2004, Rodríguez *et al.* 2004, Sunagawa & Magae 2005).

Suguimoto *et al.* (2002) descreveram que a indução de primórdios de *P. ostreatus* foi estimulada pelo aumento de veratril álcool. Ferraz (2004) cita que veratril álcool está correlacionada com a atividade da lacase, uma importante enzima no processo de decomposição de material vegetal por fungos de podridão branca, como *P. ostreatus*. Por sua vez, Hou *et al.* (2004), Rodríguez *et al.* (2004) e Sunagawa & Magae (2005) observaram que nas fases de indução de primórdios e desenvolvimento de basidiomas de *P. ostreatus*, a atividade da lacase aumentou significativamente, em comparação com o crescimento vegetativo.

Outro fator a ser considerado é o efeito da temperatura na formação e desenvolvimento dos primórdios, uma vez que isolados não adaptados ao cultivo em temperaturas elevadas abortam ou paralisam seu desenvolvimento, tal como observado neste trabalho (tabela 3) e como relatado por Chang *et al.* (1995) em seus experimentos com *Lentinula edodes*.

Dos isolados avaliados em laboratório (quanto à uniformidade da colônia) e em câmara de crescimento (resistência a 28 °C), foram selecionados 16 (AF48, AF74, BF24, DF02, DF03, DF16, DF33, DF43, DF50, EF28, EF58, EF60, GF34, GF54, HF08, HF19) que induziram primórdios e produziram colônias uniformes em meio de cultura e se destacaram em termos de produtividade e características fenotípicas, para serem reavaliados, em condições de produção comercial, por três ciclos de re-isolamento.

Os isolados, nos três ciclos de re-isolamento, não apresentaram variações quanto ao período de indução de primórdios, colheita, eficiência biológica e características fenotípicas. Dois se destacaram, o isolado EF58 e o EF60, pela eficiência biológica, precocidade e características fenotípicas tais como a coloração do píleo e resistência ao manuseio (tabela 4, figura 4).

Portanto, através dos isolados obtidos pelos cruzamentos multispóricos sugere-se o estabelecimento do melhoramento genético quanto à precocidade na indução de primórdios e realização da colheita, número de ciclos de frutificação sem choque térmico, resistência ao calor e ao manuseio,

Tabela 3. Porcentagem média de indução e desenvolvimento de primórdios a 28 °C dos isolados multispóricos de *Pleurotus ostreatus*, após hidratação por 4 horas, 30 dias de incubação e em câmara de crescimento. ¹Isolados parentais: A – Pos 96/05; B – Pos 97/12; C – Pos 97/14; D – Pos 97/15; E – Pos 97/17; F – Pos 98/37, G – Pos 98/38 e H – Pos 98/40; ²Ausência: setores que não induziram primórdios a 28 °C; ³Abortados: setores que apresentaram paralisação do crescimento dos primórdios, estágio de “cabeça de alfinete”; ⁴Sem desenvolvimento: setores que apresentaram paralisação do desenvolvimento dos cogumelos.

Cruzamento ¹	Número de setores	% de setores em relação à frutificação			
		Ausência ²	Abortados ³	Sem desenvolvimento ⁴	Desenvolvidos
AF	81	83,7	7,0	2,1	7,0
BF	76	77,6	5,7	9,6	7,0
CF	32	60,4	6,2	18,7	14,6
DF	49	52,4	17,1	4,8	25,8
EF	75	81,8	7,6	7,5	3,1
FF	79	27,0	24,5	22,8	25,7
GF	91	89,7	2,9	1,5	5,9
HF	38	64,0	23,7	0,9	11,4
Média		67,1	11,8	8,5	12,6

Tabela 4. Período de formação de primórdios (dias), colheita (dias), eficiência biológica - EB (%), coloração do píleo (análise visual) e resistência ao manuseio dos isolados selecionados obtidos por cruzamentos multispóricos de *Pleurotus ostreatus*, no terceiro ciclo de reisolamento, em câmara de frutificação a 28 ± 5 °C. ¹Isolados selecionados obtidos por cruzamentos multispóricos; ^{2,3}Dados médios após 30 dias de incubação; comparações entre as medianas, na mesma coluna, seguidas por letras distintas que diferem entre si pelo Teste de Dunn ($p < 0,05$), com 10 repetições; ⁴Comparações entre as médias, na mesma coluna, seguidas por letras distintas que diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), com 10 repetições; ⁵Siglas: b - branco; c - cinza; cc - cinza-claro; ch - cinza-chumbo; ce - cinza-escuro; ⁶Resistência ao manuseio: avaliada pela presença de píleo frágil (quebradiço) ou firme quanto à manipulação.

Isolados ¹	Primórdios (dias) ²	Colheita (dias) ³	EB ⁴ (%)	Cor (visual) ⁵	Resistência ao manuseio ⁶
AF48	3,7 b	5,8 a	27,0 abc	ce	firme
AF74	3,3 a	8,9 a	23,9 bcd	c	firme
BF24	4,8 b	7,8 a	14,7 cd	ce	firme
DF02	5,8 b	7,1 a	9,3 cd	ce	firme
DF03	6,0 b	8,8 a	12,3 cd	ce	firme
DF16	4,8 b	6,8 a	19,0 bcd	ce	firme
DF33	3,8 b	8,4 a	33,7 abcd	ce	frágil
DF43	4,3 b	8,5 a	20,7 abcd	ce	firme
DF50	6,0 b	8,8 a	11,3 cd	ce - ch	firme
EF28	5,0 b	6,9 a	21,4 cd	ce	firme
EF58	2,7 a	6,9 a	43,3 a	ce	firme
EF60	2,7 a	7,4 a	38,4 ab	cc - ce	firme
GF34	7,9 c	10,4 b	6,6 d	ce	firme
GF54	8,0 c	10,0 b	12,7 bc	ce	firme
HF08	5,3 b	9,8 b	32,3 bcd	ce	firme
HF19	5,8 b	7,3 a	17,2 bcd	ce	firme
F	2,0 a	7,0 a	35,8 abcd	b	frágil

Tabela 5. Características dos isolados melhorados de *Pleurotus ostreatus* em relação aos parentais, em condições de produção comercial. ¹Isolados melhorados: AF48, AF74, BF24, DF02, DF03, DF16, DF43, DF50, EF28, EF58, EF60, GF34, GF54, HF08 e HF19; ²Fonte: Marino (2002); ³Isolados parentais necessitam também de choque térmico a 5 °C por 24 h; ⁴Ciclos de frutificação sem hidratação e choque térmico; ⁵Apenas os isolados AF74, DF33, DF43, EF28, EF58, EF60 e HF08 produziram o segundo ciclo, com desenvolvimento de primórdios remanescentes da colheita e/ou indução de primórdios sem hidratação ou choque térmico; ⁶Siglas: b - branco; cc - cinza-claro; ce - cinza-escuro; ch - cinza-chumbo; cr - creme.

Características	Isolados melhorados ¹	Isolado parental	Isolados parentais
Indução de primórdios	hidratação	F a 28 °C	(A a H) ² a 15 °C
Período para formação de primórdios	1 a 8 dias	hidratação	hidratação ³
Período para início da colheita	1 a 8 dias	2 dias	8 a 11 dias
Período para início da colheita	6 a 10 dias	7 dias	13 a 15 dias
Número de ciclos de frutificação	2 ciclos ^{4,5}	1 ciclo	1 ciclo
Ciclo de produção	13 dias	15 dias	15 dias
Eficiência biológica (%)	6 a 44%	35,8%	11 a 25%
Resistência ao calor	Sim	Sim	não, exceto a F
Coloração do píleo ⁶	cc - ch	B - cr	ce - ch
Resistência ao manuseio	Firme	Frágil	firme

adequada coloração do píleo e eficiência biológica. Essas características podem beneficiar os produtores de cogumelos que poderão cultivar os isolados EF58 e EF60 durante todo o ano, com custos menores e em instalações simples.

Agradecimentos

O primeiro autor agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa outorgada (processo 97/14675-5).

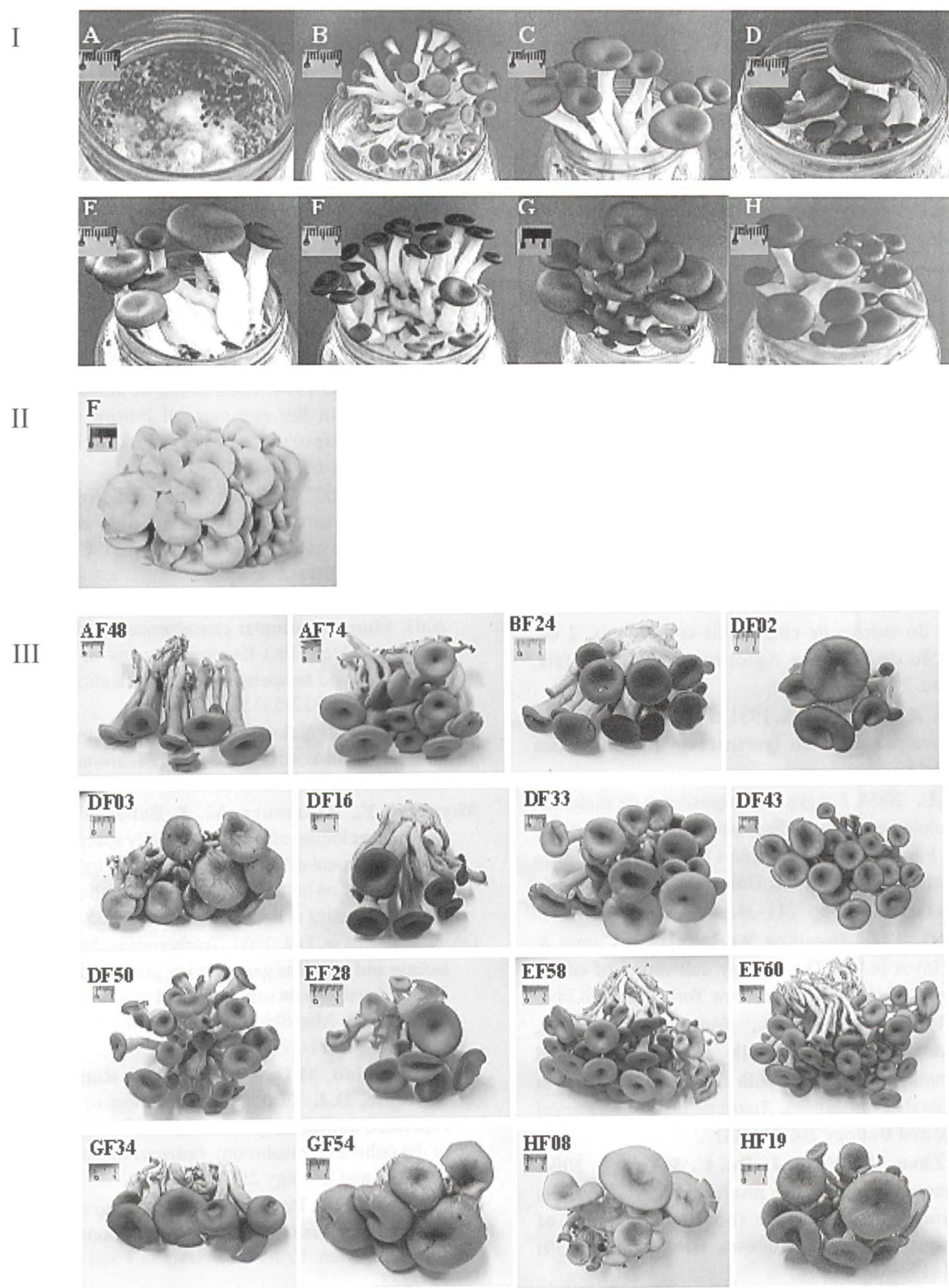


Figura 4. Basidiomas dos isolados parentais (I, II) e recombinantes (III) de *Pleurotus ostreatus* [I – Isolados parentais cultivados à temperatura de 15 °C (A – Pos 96/05, B – Pos 97/12, C – Pos 97/14, D – Pos 97/15, E – Pos 97/17, F – Pos 98/37, G – Pos 98/38 e H – Pos 98/40); II – Isolado parental F cultivado a 28 °C; III – Isolados recombinantes resistentes a 28 °C].

Literatura citada

- Chang, S.T., Kwan, H.S. & Kang, Y.N.** 1995. Collection, characterization, and utilization of germplasm of *Lentinula edodes*. Canadian Journal of Botany 73 Supplementum: 955-961.
- Chen, S., Ge, W. & Buswell, J.A.** 2004. Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters 230: 171-176.
- Chen, M.J., Wang, Z.Y., He, D.M., Pan, Y.J. & Chen, M.J.** 1996. Biochemical analysis of hybrid shiitake (*Lentinus edodes*) strains resulting from di-mono mating. Acta Agriculture Shanghai 12: 19-22.
- Eger, G., Eden, G. & Wissing, E.** 1978. *Pleurotus ostreatus*, breeding potential of a new cultivated mushroom. Theoretical and Applied Genetics 47: 155-163.
- Eira, A.F.** 2004. Fungos comestíveis. In: E. Espósito & J.L. de Azevedo (eds.). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Editora da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, pp. 380-448.
- Eira, A.F. & Minhoni, M.T.A.** 1997. Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis. 2 ed. Fundação de Pesquisa Agropecuária e Florestais, Botucatu.
- Elliott, T.J. & Langton, F.A.** 1981. Strain improvement in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Euphytica 30: 175-182.
- Ferraz, A.L.** 2004. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: E. Espósito & J.L. de Azevedo (eds.). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Editora da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, pp. 211-242.
- Fritsche, G.** 1978. Breeding Work. In: J.T. Chang & W.A. Hayes (eds.). The biology cultivation of edible mushroom. Academic Press, New York, pp. 239-249.
- Horgen, P.A., Carvalho, D., Sonnenberg, A., Li, A.M. & Griensven, L.J.L.D.** 1996. Chromosomal abnormalities associated with strain degeneration in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. Fungal Genetic and Biology 20: 229-241.
- Hou, H., Zhou, H., Wang, J., Du, C. & Yan, B.** 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. Process Biochemistry 39: 1415-1419.
- Kinugawa, K., Tanesaka, E., Nagata, A. & Watanabe, K.** 1997. Cross-compatibility between Thai and Japanese Oyster mushrooms and the inheritance of fruiting habits. Memoirs of the Faculty of Agriculture of Kinki University 30: 7-11.
- Kuramae-Izioka, E.E.** 1997. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. Revista Unimar 19: 683-689.
- Labarère, J., Noel, T. & Huynh, T.D.H.** 1991. Variability of the incompatibility alleles of the tetrapolar heterothallic basidiomycete *Agrocybe aegerita*: a survey of recent experiments. Mushroom Science 1: 23-29.
- Larraya, L., Penas, M.M., Perez, G., Santos, C., Ritter, E., Pisabarro, A.G. & Ramirez, L.** 1999. Identification of incompatibility alleles and characterization of molecular markers genetically to the A incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Current Genetic 24: 486-493.
- Li, A., Begin, M., Kokurewicz, K., Bowden, C. & Horgen, P.A.** 1994. Inheritance of strain instability (sectoring) in the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology 60: 2384-2388.
- Marino, R.H.** 2002. Melhoramento genético de *Pleurotus ostreatus* visando o cultivo axênico de isolados resistentes ao calor. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- Marino, R.H., Eira, A.F., Kuramae, E.E. & Queiroz, E.C.** 2003. Morphomolecular characterization of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kummer strains in relation to luminosity and temperature of fructification. Scientia Agricola 60: 5332-5335.
- Matsumoto, T. & Nakai, Y.F.** 1996. Mitochondrial DNA inheritance in sexual crosses of *Pleurotus ostreatus*. Current Genetic 30: 549-552.
- Miyazaki, Y., Nakamura, M. & Babasaki, K.** 2002. Molecular cloning of developmentally specific genes by representational difference analysis during the fruiting body formation in the basidiomycete *Lentinula edodes*. Fungal Genetics and Biology 42: 493-505.
- Ohga, S. & Royse, D.J.** 2001. Transcriptional regulation of laccase and cellulose genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters 201: 111-115.
- Ospina-Giraldo, M.D., Collopy, P.D., Romaine, C.P. & Royse, D.J.** 2000. Classification of sequences expressed during the primordial and basidioma stages of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Fungal Genetics and Biology 29: 81-94.
- Rajarathnam, S. & Bano, Z.** 1987. *Pleurotus* mushrooms. Part 1 A: Morphology, Life cycle, Taxonomy, Breeding and Cultivation. Critical Reviews in Food Science 26: 157-223.
- Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A.T. & Martínez, M.J.** 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. Soil Biology & Biochemistry 36: 909-916.

- Sadowsky, M.J., Tully, R.E., Cregan, P.B. & Keyser, H.H.** 1987. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 and relation to genotype specific nodulation of soybean. *Applied Environmental Microbiology* 53: 2624-2630.
- Sunagawa, M. & Magae, Y.** 2005. Isolation of genes differentially expressed during the fruit body development of *Pleurotus ostreatus* by differential display of RAPD. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 246: 279-284.
- Sugimoto, H.H., Barbosa, A.M., Dekker, R.F.H. & Castro-Gomez, R.J.H.** 2001. Veratryl alcohol stimulates fruiting body formation in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Federation European Microbiological Societies Microbiology Letters* 194: 235-238.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

