

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
PROPOSTA DE PROJETO DE TESE DE DOUTORADO**

Título: *Macrolepiota*, *Chlorophyllum* e *Agaricus* (Agaricaceae, Basidiomycota) em áreas de Mata Atlântica e Pampa: Contribuição ao conhecimento da diversidade e potencial enzimático

Doutorando: Eduardo Fazolino Perez

Orientadora: Dra. Rosa Mara Borges da Silveira / Departamento de Botânica / UFRGS

Co-orientadora: Dra. Marli Camassola / Universidade de Caxias do Sul (UCS)

1. INTRODUÇÃO

A família Agaricaceae (Fr.) Chev. é constituída por macrofungos saprofíticos de ampla distribuição mundial, com uma enorme diversidade de cores, formas, tamanhos de basidiomas e basidiósporos. Inclui aproximadamente 85 gêneros (Kirk *et al.* 2008) formando um grupo monofilético que abrange desde fungos agaricóides, os cogumelos, como também fungos secotióides e gasteróides (Moncalvo *et al.* 2002). São decompositores de matéria orgânica, encontrados em diferentes substratos, sendo frequentes no solo, húmus e madeira (Singer, 1986; Vellinga, 2004). Espécies de alguns gêneros são utilizadas como alimento. Cogumelos comestíveis comumente utilizados na alimentação aqui no Brasil, foram estudados por Furlani e Godoy (2007), e mostraram ser um alimento com características nutricionais excelentes, com alto teor de proteínas e fibras alimentares, além do baixo teor de lipídios e fonte considerável de fósforo. Outros, no entanto, são tóxicos podendo causar danos a homens e animais (Wright & Albertó, 2002).

A base para classificação dos fungos agaricóides e de outros basidiomicetos foi construída por Fries (1821), utilizando-se principalmente dos caracteres macroscópicos dos basidiomas. Seu sistema facilitou em muito a identificação no campo, sendo amplamente utilizado (Kirk *et al.* 2008). Singer (1986) em sua importante obra sobre a classificação da ordem Agaricales baseada em caracteres morfológicos aceita quatro tribos: *Agariceae* Pat., *Cystodermateae* Sing., *Lepioteae* Fayod e *Leucocoprineae* Sing. Trabalhos subsequentes baseados em análises moleculares suportaram o conceito morfológico de Singer, com exceção da tribo Cistodermatae que foi excluída e a família Lycoperdaceae foi incluída (Kirk *et al.* 2001, Moncalvo *et al.* 2002, Vellinga *et al.* 2003). De qualquer modo, relacionamentos dentro de Agaricaceae continuam em grande parte não resolvidos, devido à pequena amostragem desta família tão diversa (Vellinga *et al.* 2003), estimada conservadoramente com cerca de 1340 espécies (Kirk *et al.* 2008).

Os estudos em sistemática molecular em Agaricales transformaram radicalmente as interpretações da evolução e classificação do grupo (Moncalvo *et al.*, 2000). A esmagadora maioria das espécies produz basidiomas com lamelas, mas hoje sabemos que, evolutivamente, estas surgiram várias vezes nos Agaricomycetes (Hibbett *et al.* 1997). Da mesma forma, segundo Peintner *et al.* (2001) várias linhagens estudadas de Gasteromycetes, espécies que produzem esporos num basidioma fechado, evoluíram de forma independente entre os Agaricales e estudos realizados por Larsson *et al.* (2004) e Binder *et al.* (2005) têm mostrado que alguns fungos não lamelados, incluindo as formas cifelóides e ressupinadas, partilham as suas histórias evolutivas com numerosas linhagens de Agaricales.

1.1. Caracterização dos gêneros *Agaricus*, *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* (Agaricaceae)

Os gêneros *Agaricus* L., *Chlorophyllum* Mass. e *Macrolepiota* Sing. são macrofungos de grande interesse humano, uma vez são largamente utilizados como alimento, podem ser tóxicos ou

ainda úteis na indústria. No Brasil *Agaricus bisporus* é o principal cogumelo cultivado e também o mais consumido. *Agaricus xanthodermus*, *Chlorophyllum molybdites* e *Macrolepiota venenata* são tóxicos e provocam problemas gastrointestinais. Alguns são utilizados pela indústria, quer para obtenção de fármacos como o cogumelo do Sol, *Agaricus brasiliensis*, ou como produtores de enzimas e utilizados em processos industriais ou biorremediação de ambientes contaminados.

Membros desses gêneros são predominantemente agaricóides, comumente conhecidos por cogumelos e se caracterizam-se por apresentarem basidiomas com hábito pluteóide, raramente colibióide ou micenóide, com a superfície do píleo escamosa, escamulosa, fibrilosa ou glabra. Margem normalmente lisa. Contexto carnoso. Lamelas livres, próximas e afastadas da inserção do estípite. Trama trabecular ou regular. Basídios geralmente tetrasporados, mas podendo ser biesporados. Queilocistídios presentes, raramente ausentes em alguns *Agaricus*. Pleurocistídios sempre ausentes. Basidiósporos variando de hialinos, verdes, castanhos a marrons, lisos, de parede espessada, com ou sem poro germinativo visível. Esporada muito variada, podendo ser branca, creme, ocreácea, verde, rosa, castanha ou marrom. Estípite central, carnoso a fibroso, algumas vezes mais alargado na base, facilmente separável do píleo. Anel presente e bem desenvolvido. Volva geralmente ausente. Fíbulas ausentes ou presentes. Encontrados em diferentes substratos, sendo frequentes no solo (terra ou areia), húmus e raramente em madeira, também em estufas, desertos e campos. Muito comuns em áreas urbanizadas ou modificadas pelo homem. Não apresentam relações micorrízicas com vegetais (Singer, 1986) formando um grupo monofilético de fungos saprofitos, amplamente distribuídos (Vellinga, 2004).

***Agaricus* L., características gerais:** *Agaricus* L.: Fr. Emend Karst. é a espécie tipo do gênero que caracteriza-se por apresentar basidiomas que variam de pequeno a grande; píleo com coloração branca, amarelada, cinza a marrom; contexto carnoso; lamelas livres, na maioria das vezes afastada da inserção do estípite, cor variando de branca a rosada quando jovem e marrom a marrom escura nos maduros; estípite central, cilíndrico, geralmente com base alargada, anel presente e contexto carnoso; esporada marrom a marrom escura; basídios tetrasporados; basidiósporos pequenos, com parede espessada, sem poro germinativo, de coloração castanha a marrom em KOH; trama da lamela regular; queilocistídio presente na grande maioria e pleurocistídio ausente.

***Chlorophyllum* Masse, características gerais:** *Chlorophyllum molybdites* (G. Mey. : Fr.) Masee. é a espécie tipo do gênero que caracteriza-se por apresentar basidiomas grandes e carnosos; píleo convexo a aplanado, com coloração branca a creme, recoberto por escamas a partir do disco central variando de castanho, cinza a marrom; contexto carnoso; lamelas livres, sempre afastadas da inserção do estípite, cor variando de branca a creme quando jovem e verde a levemente castanho nos maduros; estípite central, cilíndrico, de médio a curto, com base regular a levemente alargada, superfície lisa e sem bandas coloridas na superfície, raramente apresentando apresentar volva; anel, muitas elaborado, duplo, que na maioria das vezes se desprendem ficando soltos no estípite; esporada verde, branca ou creme; basídios tetrasporados ou biesporados; esporos médios a grandes, de parede espessada, de coloração hialina, verde ou levemente ocre em KOH, com um poro germinativo truncado (com uma depressão na parede do esporo) e descoberto, às vezes sem o poro. dextrinóides, metacromáticos em azul de cresil e congófilos. A trama lamela é trabecular; queilocistídios presentes e pleurocistídios ausentes.

***Macrolepiota* Singer, características gerais:** *Macrolepiota procera* (Scop.) Sing. é a espécie tipo do gênero que caracteriza-se por apresentar basidiomas grandes e carnosos; píleo convexo a aplanado e umbonado, com coloração branca, creme a marrom claro recoberto por escâmulas a partir do disco central variando de alaranjado, cinza a marrom; contexto carnoso; lamelas livres, sempre afastadas da inserção do estípite, cor variando de branca a creme quando jovem e creme nos maduros; véu universal himenidermal ou trichodermal que se divide em escâmulas grossas a finas no píleo; estípite central, cilíndrico, delgado e longo com base abruptamente alargada, com presença de escâmulas, muitas vezes visíveis como bandas coloridas nos espécimes adultos (Vellinga 2003

Vellinga et al., 2003), podendo apresentar volva em algumas espécies; anel, muitas vezes elaborado, duplo, que na maioria das vezes se desprendem ficando soltos no estípite; esporada branca, creme ou ocreácea; basídios tetrasporados e ou biesporados; esporos médios a grandes, de parede espessada, de coloração hialina a levemente ocre em KOH, com um poro germinativo recoberto por uma capa hialina, dextrinóides, metacromáticos em azul de cresil e congófilos. A trama lamela é trabecular; Queilocistídeos presentes e pleurocistídeos ausentes.

1.2. Taxonomia

Os gêneros *Agaricus* L., *Chlorophyllum* Mass. e *Macrolepiota* Sing. pertencem à família Agaricaceae (Fr.) Chev., ordem Agaricales, subclasse Agaricomycetidae, classe Agaricomycetes, subfilo Agaricomycotina, filo Basidiomycota, reino Fungi (Kirk et al. 2008).

A família tem sido foco de vários estudos com dados moleculares (Johnson & Vilgalys 1998; Vellinga, 2004), tendo a sua circunscrição e a caracterização de alguns gêneros, consideravelmente alteradas (Moncalvo et al. 2000, 2002; Vellinga, 2002, 2004; Vellinga et al. 2003, Vellinga & Yang, 2003; Kerrigan et al. 2006). Vellinga (2004) em trabalho de circunscrição da família Agaricaceae, concluiu que esta apresenta 10 clados: *Agaricus*, *Chlorophyllum*, *Macrolepiota*, *Leucoagaricus/Leucocoprinus*, *Lepiota*, *Podaxis*, *Lycoperdaceae*, *Chamaemyces*, *Tulostomataceae* e *Coprinus comatus*. No entanto ainda é cedo para uma definição mais precisa, sendo imperioso ampliar os trabalhos de campo e revisões de coleções, especialmente para a região tropical para poder aprofundar os estudos moleculares.

1.3. Importância Ecológica e Econômica

Os fungos desempenham um papel importante dentro dos ecossistemas como decompositores, mutualistas e/ou agentes patogênicos, mas na maioria dos casos o potencial individual dos fungos na natureza é desconhecido. Cabe lembrar também que apresentam grande importância econômica como agentes de biocontrole e produtores de químicos para o setor industrial (Alexopoulos et al. 1996). Também são importantes como fonte de alimento, muito apreciada na Europa, Ásia e América do Norte. No Brasil, o consumo ainda é muito restrito.

Mesmo sendo conhecido o imenso potencial dos fungos e dos representantes dos gêneros em estudo, as pesquisas têm sido focadas preferencialmente na descoberta de processos biotecnológicos, e ligados à gastronomia. Além do valor nutricional, os cogumelos são fonte de compostos bioativos, utilizados como medicamentos e de enzimas lignolíticas com potencial industrial (Bala et al, 2011).

Informações relativas à produção de enzimas lignolíticas por parte dos fungos degradadores de serrapilheira ainda são escassas (Durrant et al. 1991; Steffen et al. 2000). As principais enzimas lignolíticas produzidas pelas espécies de Agaricaceae já analisadas são manganês peroxidase e lacases (Hatakka, 2001; Steffen, 2003). Como exemplos, temos espécies de *Agaricus* e *Coprinus* que produzem diferentes tipos de lacases e uma peroxidase funcional e estruturalmente semelhante a bem conhecida peroxidase de Rábano Silvestre, utilizada como marcador histoquímico em microscopia óptica e eletrônica, e também, como antígeno em experimentos de imunologia (Morita et al. 1988; Baunsgaard et al. 1993; Heinzkill et al. 1998).

As fenol oxidases são enzimas lignolíticas de interesse industrial com uma série de aplicações, tais como: branqueamento de polpa de celulose, descoloração de corantes têxteis, remoção de fenóis, tratamento de efluentes, degradação dos herbicidas (que são potenciais poluentes do solo), tratamento de alimentos, oxidação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, e transformação de antibióticos e esteroides. As celulasas também apresentam capacidade lignolítica e já foram descritas para outros basidiomicetos, sendo estas aplicadas na indústria têxtil e de detergentes (Arora & Sharma, 2010).

1.4. Estudos no Brasil e Região Sul

Diferentes pesquisadores contribuíram para o conhecimento da diversidade de Agaricaceae no Brasil (Albuquerque *et al.* 2006; Heinemann, 1993; Heinemann & Meijer, 1996; Meijer, 2001, 2006; Pereira, 1982, 1998, 2000, 2001; Pereira & Putzke, 1990; Raithelhuber 1987a, 1987b, 1987c; Rick 1906, 1907, 1920, 1926, 1930, 1937, 1938a, 1938b, 1938c, 1939, 1961; Rother & Silveira, 2009; Singer, 1953; Sobestiansky, 2005 e Spielmann & Putzke, 1998). Seus estudos basearam-se em coletas esporádicas, inventários em áreas específicas ou revisão de espécimes depositados em herbários. Para a Mata Atlântica podemos citar alguns estudos recentes: para o estado de São Paulo (Capelari e Rosa 2006) *Agaricus abruptibulbus*, *A. arvensis*, *A. bisporus*, *A. campestris*, *A. lanipes*, *A. maskae*, *A. martineziensis*, *A. semotus*, *A. silvicola*, *A. Xanthoderma*, *Chlorophyllum brunneum* e (Gimenes 2007) *C. pulchellum*, *Macrolepiota bonaerensis* e *M. Mastoidea*; para Minas Gerais (Capelari e Rosa 2009) *Agaricus cf. brunneostictus*, *A. junquitensis*, *A. nigrescentulus*, *A. parasilvaticus*, *A. purpurellus*, *A. silvaticus*, *A. singeri*, *A. trinitatensis*, *A. cf. Violaceosquamulosus*; para o Rio de Janeiro (Albuquerque *et al.* 2010) *Agaricus subrufescens*, *A. dulcidulus*; para Pernambuco (Wartchow *et al.* 2008) *Agaricus aff. parasilvaticus*, *A. purpurellus*, *A. rufoaurantiacus*; para o Ceará (Nascimento e Alves 2014) *Agaricus stijvei*, *Chlorophyllum hortense*; para o Paraná (Meijer 2008) *Agaricus cf. dicystis*, *A. mediofuscus*, *A. meijeri*, *A. cf. ochrascens*, *A. parasilvaticus*, *A. cf. riberaltensis*, *A. stijvei*, *A. volvatulus*, *Macrolepiota aff. mastoidea* e *M. pulchella*, (Meijer *et al.* 2007) *Chlorophyllum molybdites*, (Ferreira e Cortez 2013) *Macrolepiota colombiana*; para o Rio Grande do Sul (Rother e Silveira 2008) *Agaricus porphyrizon*, *A. pseudoargentinus*, *A. aff. silvaticus*, *A. cf. litoralis*, *Chlorophyllum molybdites* e *Macrolepiota procera*. Para o Pampa, no Brasil: (Alves *et al.* 2013) *Agaricus endoxanthus*; na Argentina: *Agaricus abruptibulbus*, *A. alabamensis*, *A. angelicus*, *A. annae*, *A. argentinus*, *A. argyropotamicus*, *A. arvensis*, *A. augustus*, *A. bisporus*, *A. bruchii*, *A. brunneolus*, *A. campestris*, *A. Cinereus*, *A. comtulus*, *A. devoniensis*, *A. farinosus*, *A. farinosus* var. *gracilis*, *A. farinosus* var. *laevipes*, *A. fiardii*, *A. ficophilus*, *A. fulveolus*, *A. heinnemanii*, *A. horakii*, *A. litoralis*, *A. lividus*, *A. luteomaculatus*, *A. luteotactus*, *A. martineziensis*, *A. osecanus*, *A. pampeanus*, *A. phaeocyclus* var. *pucatrihuensis*, *A. phaleopidotus* var. *minimus*, *A. pilatianus*, *A. placomyces*, *A. platensis*, *A. porosporus*, *A. porphyrizon*, *A. pseudoargentinus*, *A. rosalamellatus*, *A. santacatalinensis*, *A. semotus*, *A. singeri*, *A. spegazzinianus*, *A. subfloccosus*, *A. subrufescens*, *A. subperonatus*, *A. valdiviae*, *A. valdiviae* var. *saturatus*, *A. xanthodermus*, *A. xanthodermus* var. *croceus*, *Chlorophyllum molybdites*, *C. rachodes*, *Macrolepiota bonaerensis*, *M. gracilenta*, *M. kerandi* e *M. procera* (Niveiro & Albertó 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a necessidade da ampliação do conhecimento da micobiota brasileira, especialmente para os gêneros *Agaricus*, *Chlorophyllum* e *Macrolepiota*, a possibilidade de descobrimento de novos táxons com novos arsenais enzimáticos e motivado pelo (a):

- grande diversidade dos fungos agaricóides, em especial de Agaricaceae, já evidenciada em estudos anteriores realizados na Região Sul;
- escassez de estudos taxonômicos na área, sendo que em sua maior parte os realizados tiveram enfoque apenas morfológico;
- a carência de informações sobre as espécies que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais, o que impossibilita conhecer melhor a filogenia do grupo;
- poucos trabalhos sobre o potencial enzimático e aplicabilidade das espécies ocorrentes na região.

Propomos o estudo dos gêneros *Agaricus*, *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* encontradas em áreas de Mata Atlântica e Pampa, através de uma abordagem morfológica e bioquímica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Ampliar o conhecimento sobre a diversidade e aplicabilidade dos gêneros *Agaricus*, *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* (Agaricaceae, Basidiomycota) em áreas de Mata Atlântica e Pampa, através da avaliação de dados morfológicos e bioquímicos.

3.2. Objetivos específicos

- Conhecer as espécies dos gêneros *Agaricus*, *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* presentes na em áreas de Mata Atlântica e Pampa;
- Descrever novas espécies para a ciência e novos registros para as áreas estudadas;
- Elaborar descrições, ilustrações e chaves para identificação das espécies encontradas;
- Verificar a distribuição das espécies encontradas;
- Utilizar caracteres morfológicos e, quando possível, moleculares para a identificação das espécies encontradas na área de estudo;
- Avaliar qualitativamente a atividade de fenol oxidases e celulasas produzidas por espécies de Agaricaceae; e
- Analisar quantitativamente a produção de fenol oxidases e celulasas em cultivos de micélio, em estado sólido e submersos, de espécies selecionadas.

4. METODOLOGIA

4.1. Excursões e coletas

Os espécimes dos gêneros *Agaricus*, *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* (Agaricaceae, Agaricales, Basidiomycota) serão coletados em diferentes localidades do Brasil, abrangendo áreas de Mata Atlântica com Floresta Ombrófila Densa e Floresta Ombrófila Mista e do Pampa, percorrendo áreas bem conservadas em Unidades de Conservação. As licenças de coletas para as áreas que as exigirem serão encaminhadas junto aos órgãos competentes.

No momento da coleta, os basidiomas serão fotografados e anotados dados referentes ao ambiente e substrato. Os espécimes serão removidos do substrato com auxílio de faca ou pá de jardinagem e logo em seguida acomodados em recipientes individuais ou caixas compartimentadas para evitar a mistura dos esporos de diferentes exemplares.

4.2. Estudo morfológico

4.2.1. Análise macroscópica

O material coletado passará por uma análise macroscópica a olho nu e com auxílio de um microscópio estereoscópico, logo após o término das coletas e antes do processo de desidratação, para que não sejam perdidas características importantes para a identificação. Fichas de análise macroscópica serão especialmente confeccionadas para os fungos deste grupo. Fotos e/ou esquemas dos basidiomas serão incluídos. A nomenclatura e metodologia utilizadas seguirão a proposta de Largent (1977).

4.2.2. Análise microscópica

Para análise microscópica, serão realizados cortes manuais no basidioma, utilizando lâminas de aço. Os cortes serão montados em solução aquosa de hidróxido de potássio a 5% (KOH), corante vermelho congo a 2%, azul de cresil a 2% e reagente de Melzer. Para cada espécime, será preenchida uma ficha de análise microscópica, com espaço para observações da morfologia e anotação das medições das microestruturas, especialmente elaborada para fungos dessa família. Serão feitas medições (mínimo de 25 para cada elemento) e ilustrações e ou fotografias das microestruturas, férteis e estéreis, como basídios, basidiósporos, cistídios, hifas da trama e superfície pilear (pileipelis), com o auxílio de uma ocular micrometrada e câmara clara acoplada ao

microscópio óptico. A nomenclatura das microestruturas será baseada na obra de Largent *et al.* (1986).

4.3. Identificação do material

Para a identificação do material será utilizada bibliografia especializada, principalmente os trabalhos de Bon (1981), Breitenbach & Kranzlin (1995), Candusso & Lanzoni (1990), Cappelli (1984), Dennis (1952, 1961, 1970), Heinemann (1977, 1986, 1990, 1993), Pegler (1972, 1977, 1983, 1986, 1997), Rick (1961), Singer (1986), Singer & Digilio (1951), Vellinga (2001), Wasser (1993) e Wright & Albertó (2002).

4.4. Revisão de Herbários

Serão feitas revisões de coleções de herbários nacionais e internacionais que possuem exsiccatas da família em questão, a fim de incrementar a lista das espécies ocorrentes **na Mata Atlântica e Pampa**, esclarecer possíveis dúvidas taxonômicas e confirmar a identificação das espécies.

4.5. Conservação dos basidiomas

Todo material, após ter sido analisado e identificado, será incorporado ao acervo do Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN) e, quando possível, duplicatas serão enviadas a outros herbários nacionais e internacionais indexados.

4.6. Obtenção de cultivos

A partir do material coletado serão obtidos cultivos polispóricos. Em laboratório, os basidiomas serão colocados em câmara úmida para a obtenção da esporada. Os esporos serão transferidos para placas de Petri com meio Agar Extrato de Malte (AEM: ágar 20,0g; extrato de malte 12,5g e água destilada 1000 mL; esterilizado em autoclave a 121°C e 1-1,5 atm, durante 20 minutos). As placas serão incubadas a 25°C, no escuro, até o desenvolvimento do micélio e então, repicadas para tubos de ensaio com meio AEM. Estes tubos permanecerão em estufa até o desenvolvimento do micélio e depois, serão conservados em geladeira a 4°C para utilização nas análises químicas.

Também poderão ser obtidos cultivos a partir de basidiomas frescos. Neste caso, serão extraídos pequenos fragmentos do contexto ou da zona das lamelas. Estes fragmentos serão colocados em placas de Petri com meio AEM. Os demais procedimentos são realizados da mesma forma como foi descrito anteriormente para os cultivos polispóricos. Será dada preferência à obtenção dos cultivos a partir da esporada porque a probabilidade de contaminação é menor.

4.7. Estudo Bioquímico

4.7.1. Análise qualitativa de enzimas

Para a análise qualitativa, as linhagens isoladas serão repicadas em placas de Petri com meio de cultivo suplementado com ácido gálico e meio suplementado com o corante *Reactive Blue 220* (fenol oxidases) e meio celulose (celulases). Os isolados serão mantidos a 28°C ± 1°C e acompanhados por 7 dias começando no 2º dia. Será observada a progressão do halo e a intensidade da cor, através do aparecimento de uma zona acastanhada ao redor da colônia, que indica a oxidação do ácido gálico e, conseqüentemente, a presença de fenol oxidases. No meio *Reactive Blue 220* será avaliado o halo de degradação de corante e para celulases, será avaliado o halo de degradação da celulose. O procedimento será realizado em triplicata, em duas placas. Com os dados obtidos diariamente das medidas do halo e da colônia será calculada a relação halo/colônia.

4.7.2. Produção de celulases e fenol oxidases em cultivo submerso

Frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio para produção de celulases (Camassola & Dillon, 2009) e do meio para produção de fenol oxidases em cultivo submerso

(Bettin *et al.*, 2009), serão inoculados com um disco de 1,5 cm de diâmetro de micélio das espécies a serem avaliadas. Os frascos serão mantidos sob agitação recíproca de 180 rpm, a 28°C, sendo realizadas coletas de amostras a cada 3 dias. Os experimentos serão realizados durante 15 dias. As amostras serão centrifugadas, sendo que do sobrenadante serão determinadas as atividades enzimáticas.

4.7.3. Produção de celulases e fenol oxidases em cultivo sólido

Os experimentos em meio sólido serão realizados em sacos de polipropileno de 1L, contendo 25g de substrato com umidade ajustada para 66 a 70%. O meio será formulado com 94% serragem, 5% farelo de trigo e 1% CaCO₃ e autoclavados a 121°C por 2 horas (Silva, 2004). O inóculo consistirá de um disco de 1,5 cm de diâmetro das placas de Petri dos diferentes isolados e da linhagem de *Pleurotus pulmonarius* PS-2001, que será utilizada como referência. O ensaio será mantido em estufa a 25°C ± 3°C. As amostras serão coletadas no 4°, 8°, 12° e 16° dias. Na sequência, será realizada a extração enzimática, e o caldo obtido utilizado para as determinações enzimáticas de proteínas solúveis.

4.7.4. Obtenção do extrato enzimático de cultivos sólidos

O conteúdo será homogeneizado manualmente e 25g serão suspensas em 50 mL de água destilada a 4°C, agitadas por 30 minutos a 160rpm. Após, os sólidos serão removidos por centrifugação 4000 rpm durante 30 minutos. O extrato enzimático obtido será utilizado para as determinações enzimáticas e de proteínas solúveis.

4.7.5. Análise dos Dados

Todas as análises espectrofotométricas serão realizadas em espectrofotômetro Molecular Devices, modelo Spectra Max 190. O pH de cada amostra será determinado em um pHmetro PHTEK modelo PHS-3B. As proteínas solúveis presentes nas amostras serão determinadas pela quantificação do complexo azul resultante da ligação das proteínas do extrato enzimático ao corante *Comassie Brilliant Blue G-250*, de acordo com Bradford (1976). A mistura reacional irá conter: 0,5mL do reagente de Bradford e 1 mL de extrato enzimático devidamente diluído. As amostras serão agitadas e após 10 minutos será realizada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm, em uma placa de 96 poços. As concentrações de proteínas totais serão estimadas correlacionando a absorbância das amostras a uma curva padrão de dezenove pontos, com concentrações de albumina bovina variando entre 2 e 70 mg.L⁻¹.

4.7.6. Determinações enzimáticas

Todas as atividades enzimáticas serão expressas em unidades internacionais por grama de massa seca (U.g⁻¹), para o cultivo sólido e em unidades internacionais por mL (U.mL⁻¹), para cultivo líquido. Serão definidas como a quantidade de enzima que libera um μmol do produto por mL, por minuto (U = μmol.min⁻¹).

4.7.6.1. Fenol oxidases

A atividade de lacases será determinada, segundo Wolfenden & Wilson (1982), através da quantificação do produto da oxidação do 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato), ABTS, utilizado como substrato.

A determinação da atividade de manganês peroxidases será realizada de acordo com o método proposto por Kuwahara *et al.* (1984).

A atividade específica de fenol oxidases dos experimentos será calculada utilizando a seguinte fórmula: AE Fenol Oxidases = U / [PS] Onde: AE Fenol Oxidases = atividade específica de lacases

ou fenol oxidases (U.mg-1) e U = unidades enzimáticas de lacases (U.mL-1) ou (U.g-1)[PS] = concentração de proteínas solúveis (mg.L-1).

Os resultados serão expressos em unidades enzimáticas de lacases ou manganês peroxidases produzidas por mg de proteínas solúveis totais (U.mg-1).

4.7.6.2. Enzimas do complexo celulasas

Para a dosagem de celulasas totais será utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel filtro (FPA), conforme Mandels *et al.* (1976).

As atividades sobre papel filtro presentes nas amostras serão determinadas através de curva de calibração construída com soluções de glicose em tampão citrato de sódio 0,05M pH 4,8 com concentrações de 0, 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg.mL⁻¹, por meio de regressão linear, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007.

As unidades de FPA serão assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1μM de açúcar redutor por minuto (Miller, 1959).

Determinação de endoglicanases

A determinação da atividade de endoglicanases será realizada segundo Ghose (1987) com modificações, empregando-se carboxi metil celulose como substrato. A leitura, em espectrofotômetro, e a determinação da atividade de endoglicanases procederam-se tal como para FPA. As unidades de endoglicanases foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1μM de açúcar redutor por minuto (Miller, 1959).

Determinação de β-glicosidases

Para a determinação da atividade de β-glicosidases serão utilizados dois substratos: salicina e p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pNPG). Para o primeiro, será empregada a metodologia descrita por Chahal (1985) com adaptações. A determinação da atividade será realizada tal como para FPA. As unidades de β-glicosidases foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1μM de açúcar redutor por minuto (Miller, 1959). A determinação da atividade de β-glicosidases também será realizada empregando-se a metodologia adaptada de Daroit *et al.* (2008). Uma unidade de atividade de β-glicosidase utilizando-se como substrato o pNPG foi definida como a quantidade de enzima requerida para a hidrólise de 1μM de p-nitrofenol por minuto.

4.7.7. Análises estatísticas

Neste trabalho, os testes estatísticos serão realizados pela análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey, utilizando nível de probabilidade (P) inferior a 5% (p < 0,05).

5. RESULTADOS ESPERADOS

- Confirmar as espécies dos gêneros *Agaricus*, *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* (Agaricaceae) presentes na Mata Atlântica e Pampa;
- Acrescentar novas espécies para a ciência e novos registros para as regiões estudadas;
- Fornecer chaves dicotômicas, descrições e ilustrações para identificação das espécies encontradas;
- Detectar e quantificar a produção de fenol oxidases e celulasas pelas espécies de Agaricaceae encontradas.

6. CRONOGRAMA

Atividades	Semestre								
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	
Obtenção dos créditos do PPG	X	X	X	X					
Proficiência em língua estrangeira		X							
Revisão de herbários	X	X	X	X	X				

Coleta de material	X	X	X	X				
Obtenção de cultivos	X	X	X	X				
Análise morfológica	X	X	X	X	X	X		
Análise bioquímica / enzimas				X	X			
Análise dos dados				X	X	X	X	
Discussão dos resultados					X	X	X	
Exame de qualificação							X	
Elaboração dos artigos						X	X	X

7. FINANCIAMENTO

Serão utilizados recursos obtidos pela orientadora Dra. Rosa Mara Borges da Silveira, e co-orientadora Dra. Marli Camassola, assim como a estrutura do Laboratório de Micologia do Departamento de Botânica da UFRGS e do Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da UCS.

O projeto será submetido a Editais da CAPES, CNPq e FAPERGS para complementação dos recursos financeiros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque, M.P.; Victoria, F.C.; Pereira, A.B. 2006. Ecologia e distribuição do gênero *Leucocoprinus* Pat. no Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Biologica Leopoldense* 28 (1): 11-16.

Albuquerque M.P.; Pereira A.B.; Carvalho Jr.A.A. 2010. A família Agaricaceae Chevall. em trechos de Mata Atlântica da Reserva Biológica do Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil: Gêneros *Agaricus*, *Cystolepiota* e *Lepiota*. *Acta Botanica Brasílica*, v. 24, p. 497-509.

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

Alves G.C.; Victoria F.C.; Albuquerque M.P.; Pereira A.B. 2013. Primeiro relato de fungos Agaricales no município de São Gabriel, RS, Brasil. *Caderno de Pesquisa, série Biologia*, volume 24, número 2. pp 7-20.

Arora, D.S.; Sharma, R.K. 2010. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160:1760–1788.

Bala, N.; Aitken, E.A.B.; Fechner, N.; Cusack, A.; Steadman, K.J. 2011. Evaluation of antibacterial activity of Australian basidiomycetous macrofungi using a high-throughput 96-well plate assay. *Pharmaceutical Biology* 49 (5): 492-500.

Baunsgaard, L.; Dalbøge, H.; Houen, G.; Rasmussen, E.M.; Welinder, K.G. 1993. Amino acid sequence of *Coprinus macrorhizus* peroxidase and cDNA sequence encoding *Coprinus cinereus* peroxidase. A new family of fungal peroxidases. *European Journal of Biochemistry* 213: 605-611.

Bettin, F.; Montanari, Q.; Calloni, C.; Gaio, T.A.; Silveira, M.M.; Dillon, A. J. P. 2009. Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36:1–9.

Binder, M.; Larsson, K-H.; Larsson, E.; Langer, E.; Langer, G. 2005. The phylogenetic distribution of resupinate forms across the major clades of mushroom-forming fungi (Homobasidiomycetes). *Systematic Biodiversity* 3: 113–157.

Blackwell, M.; Hibbett, D.S.; Taylor, J.W.; Spatafora, J. W. 2006. Research Coordination Networks: a phylogeny for kingdom Fungi (Deep Hypha). *Mycologia* 98(6): 829–837.

Bon, M. 1981. *Cle Monographique Des “Lepiotes” D’Europe*. *Documents Mycologiques* 11(43): 1-77.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Breitenbach, J.; Kränzlin, F. 1995. *Champignons de Suisse, Tome 4: Champignons à lames, 2ème partie: Entolomataceae, Pluteaceae, Amanitaceae, Agaricaceae, Coprinaceae, Bolbitiaceae, Strophariaceae*. Edition Mycologia, Lucerne, 371 pp.

Camassola, M.; Dillon, A.J.P. 2009. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. *Industrial Crops and Products* 29: 642-647.

Candusso, M.; Lanzoni, G. 1990. *Lepiota s.l.*. *Fungi Europei* 4. Saronno, Giovanna Biella. 743 pp.

Capelari M.; Rosa L.F.; Lachance M.-A. 2006. Description and affinities of *Agaricus martineziensis*, a rare species. *Fungal Diversity* 21: 11-18.

Cappelli, A. 1984. *Agaricus*. Saronno, Giovanna Biella. 560 pp.

Celio, G.J.; Padamsee, M.; Dentinger, B.T.M.; Bauer R.; McLaughlin D.J. 2006. Assembling the Fungal Tree of Life: constructing the Structural and Biochemical Database. *Mycologia* 98(6): 850-859.

- Chahal, D.S. 1985. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 205-10.
- Daroit, D.J.; Simonetti, A.; Hertz, P.F.; Brandelli, A. 2008. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(5):933-941.
- Dennis, R.W.G. 1952. *Lepiota* and allied genera in Trinidad, British West Indies. *Kew Bulletin* 7: 459-499.
- Dennis, R.W.G. 1961. Fungi Venezuelani: IV Agaricales. *Kew Bulletin* 15: 67-156.
- Dennis, R.W.G. 1970. Fungus Flora of Venezuela and Adjacent Countries. *Kew Bulletin Additional Series* 3: 1-531.
- Durrant, A.J.; Wood, D.A.; Cain, R.B. 1991. Lignocellulose biodegradation by *Agaricus bisporus* during solid state fermentation. *Journal Microbiology* 137: 751-755.
- Ferreira A.J.; Cortez V.G. 2013. Lepiotoid Agaricaceae (Basidiomycota) from São Camilo State Park, Paraná State, Brazil. *Mycosphere*, v. 3, p. 962-976.
- Furali, RPZ; Godoy, H.T. 2007. Nutritional value of edible mushrooms. *Ciência e Tecnologia Alimentar* 27(1): 154-157.
- Fries, E.M. 1821. *System Mycologicum* 1. Gryphiswaldiae: sumtibus Ernesti Mayritii.
- Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* 59: 257-268.
- Gimenes JL. 2007. A tribo *Leucocoprineae* (Agaricaceae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. *Instituto de Botânica de São Paulo*. 84 p.
- Hatakka A. 2001. Biodegradation of lignin. In: Hofrichter M, Steinbchel A (eds) *Biopolymers: biology, chemistry, biotechnology, applications, Lignin, humic substances and coal*. Wiley VCH, Weinheim, p. 129-180.
- Heinemann, P. 1977. Flore Illustrée Des Champignons d'Afrique Centrale. *Leucocoprinus* (Agaricaceae). *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* 5: 87-109.
- Heinemann, P. 1986. Agarici Austroamericani VI Aperçu sur lês *Agaricus* de Patagonie et de la Terre de Feu. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* 56: 417-446.
- Heinemann, P. 1990. Agarici Austroamericani VII. Agaricaceae dès zones tempérées de l'Argentine et du Chili. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* 60: 331-370.
- Heinemann, P. 1993. Agarici Austroamericani VIII. Agaricaceae dès régions intertropicales d'Amérique du Sud. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* 62: 355-384.
- Heinemann, P.; Meijer, A.A.R. 1996. The status of *Volvolepiota* Singer. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* 65 (2-3): 405-412.
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P. and Anke, T. 1998 Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology* 64:1601-1606.
- 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 Science* 12002-12006.
- Johnson, J.; Vilgalys, R. 1998. Phylogenetic systematic of *Lepiota* sensu lato based on nuclear large subunit rDNA evidence. *Mycologia* 90: 971-979.
- Kerrigan, R.W.; Callac, Ph.; Guinberteau, J.; Challen, M.P.; Parra, L.A. 2006. *Agaricus* Section Xanthodermatei: a phylogenetic reconstruction with commentary on taxa. *Mycologia* 97:1292-1315.
- Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; Minter, D.W.; Stalpers, J.A. 2008. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the Fungi*. 10 ed. Wallingford, UK: CAB International.
- Kuwahara, M.; Glenn, J.K.; Morgan, M.A.; Gold, M.H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ – dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 169, 247-250.
- Largent, D.L. 1977. How to identify mushrooms to genus I: macroscopic features. *Mad River Press Inc*. 86 pp.
- Largent, D.L.; Johnson, D.; Watling, R. 1986. How to identify mushrooms to genus III: microscopic features. *Mad River Press Inc*.
- Larsson, K-H.; Larsson, E.; Kořljalg, U. 2004. High phylogenetic diversity among corticioid homobasidiomycetes. *Mycological Research* 108: 983-1002.
- Mandels, M.; Andreotti, R.; Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and bioengineering symposium* 6: 21-33.
- Meijer, A.A.R. 2001. Mycological work in the Brazilian state of Paraná. *Nova Hedwigia* 72: 105-159.
- Meijer, A.A.R. 2006. Preliminary List of the Macromycetes from the Brazilian State of Paraná. *Boletim do Museu Botânico Municipal* 68: 1-59.
- Meijer, A.A.R.; Amazonas MALA; Rubio GBG; Curial RM. 2007. Incidences of poisonings due to *Chlorophyllum molybdites* in the state of Paraná, Brazil. *Braz. arch. biol. technol.* vol.50, n.3, pp. 479-488.
- Meijer, A.A.R. 2008. Notable macrofungi from Brazil's Paraná pine forests. *EMBRAPA*. 431 p.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Moncalvo, J.M.; Lutzoni, F.M.; Rehner, S.A.; Johnson, J.; Vilgalys, R. 2000. Phylogenetic relationships of agaric fungi based Matheny, P. B. Major Clades of Agaricales 993 on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *System Biology* 49: 278-305.

Moncalvo, J. M.; Vilgalys, R.; Redhead, S.A.; Johnson, J.E.; James, T.Y.; Aime, M.C.; Hofstetter, V.; Verduin, S.; Larsson, E.; Baroni, T.J.; Thorn, R.G.; Jacobsson, S. 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23:357–400.

Morita, Y.; Yamashita, H.; Mikami, B.; Iwamoto, H.; Aibara, S.; Terada, M.; Minami J. 1988 Purification, crystallization, and characterization of peroxidase from *Coprinus cinereus*. *Journal of Biochemistry* 103:693-699.

Niveiro, N.; Albertó E. 2013. Checklist of the Argentine Agaricales 5. Agaricaceae. *Mycotaxon* 122: 491.

Pegler, D.N. 1972. A revision of the genus *Lepiota* from Ceylon. *Kew Bulletin Additional Series* 27: 155-202.

Pegler, D.N. 1977. A preliminary Agaric Flora of East Africa. *Kew Bulletin Additional Series* 6: 1-615.

Pegler, D.N. 1983. Agaric Flora of the Lesser Antilles. *Kew Bulletin Additional Series* 9: 1-668.

Pegler, D.N. 1986. Agaric flora of Sri Lanka. *Kew Bulletin Additional Series* 12: 1-519.

Pegler, D.N. 1997. The agarics of São Paulo, Brazil. London: HMSO, Royal Botanic Gardens, Kew. 68 p.

Peintner, U.N.L.; Bougher, M. A.; Castellano, J.-M.; Moncalvo, M.M.; Moser, J.M.; Trappe, R.; Vilgalys. 2001. Multiple origins of sequestrate fungi related to *Cortinarius* (Cortinariaceae). *American Journal Botanic* 88: 2168-2179.

Pereira, A.B. 1982. Contribuição ao estudo dos fungos Agaricales da mata nativa de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kze. Da floresta de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Curso de Pós-Graduação em Botânica. Porto Alegre, RS. 101pp.

Pereira, A.B. 1998. Espécies novas do gênero *Lepiota* (Agaricaceae) do Sul do Brasil. *Iheringia Série Botânica* 51(2): 227-247.

Pereira, A.B. 2000. Contribuição ao conhecimento do gênero *Lepiota* no Brasil – I. *Pesquisa Botânica* 50:27-77.

Pereira, A.B. 2001. Contribuição ao conhecimento do gênero *Lepiota* no Brasil. II. *Pesquisa Botânica* 51: 7-30.

Pereira, A.B.; Putzke, J. 1990. Famílias e gêneros de fungos Agaricales (cogumelos) no Rio Grande do Sul. Santa Cruz do Sul, Ed. FISC.

Raithelhuber, J. 1987a. Die gattung *Leucocoprinus* in den ABC-Staaten. *Metrodiana* 15(1): 5-17.

Raithelhuber, J. 1987b. Die gattung *Leucocoprinus* in den ABC-Staaten (Schlub). *Metrodiana* 15 (2): 35-44.

Raithelhuber, J. 1987c. Die gattung *Macrolepiota* in Südamerika. *Metrodiana* 15 (3): 59-71.

Rick, J. 1906. Pilze aus Rio Grande do Sul. *Brotéria Série Botânica* 5: 5-53.

Rick, J. 1907. Contributio ad monographiam Agaricacearum et Polyporaceum Brasiliensium. *Broteria Série Botânica* 6: 65-92.

Rick, J. 1920. Contributio ad Monographiam Agaricacearum Brasiliensium. *Brotéria Série Botânica* 18: 48-63.

Rick, J. 1926. Descrição de algumas espécies novas da micoflora Rio Grandense. *Egatea* 11: 16-17.

Rick, J. 1930. Contributio ad monographiam Agaricacearum et Polyporaceum Brasiliensium. IV. *Broteria, Série Botânica* 24: 27-114.

Rick, J. 1937. Agarici Riograndensis. *Lilloa* 1: 307-346.

Rick, J. 1938a. Agarici Riograndensis II. *Lilloa* 2: 251-316.

Rick, J. 1938b. Agarici Riograndensis III. *Lilloa* 3: 399-455.

Rick, J. 1938c. Agarici Riograndensis IV. *Lilloa* 4: 75-104.

Rick, J. 1939. Agarici Riograndensis III. *Lilloa* 4: 75-104.

Rick, J. 1961. Basidiomycetes Eubasidii in Rio Grande do Sul – Brasília 5. Agaricaceae. *Iheringia Série Botânica* 8: 296-450.

Rosa LH, Capelari M. 2009. Agaricales Fungi from atlantic rain forest fragments in Minas Gerais, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* vol.40, n.4, pp. 846-851.

Rother, M. S.; Silveira, R.M.S. 2008. Família Agaricaceae (Agaricales, Basidiomycota) no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 6(3): 259-268.

Rother, M.S.; Silveira, R.M.B. 2009. *Leucoagaricus lilaceus* (Agaricaceae), a poorly known Neotropical agaric. *Mycotaxon* 107: 473–481.

Silva, S.M. 2004. Otimização das condições de cultivo sólido de *Pleurotus sajor-caju* em meio constituído de serragem de Pinus spp. Dissertação de Mestrado. Universidade de Caxias do Sul. 94p.

Singer, R. 1953. Type studies on Basidiomycetes VI. *Lilloa* 26: 57-159.

Singer, R. 1986. The Agaricales in Modern Taxonomy. 4th ed. Koenigstein: Koeltz Scientific Books.

Singer, R.; Digilio, A.P.L. 1951. Pródromo de la flora Agaricina Argentina. *Lilloa* 25: 5-461.

Sobestiansky, G. 2005. Contribution to a macromycete survey of the states of rio Grande do Sul and Santa Catarina in Brazil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 48 (3): 437-457.

Spielmann, A.A.; Putzke, J. 1998. *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales, Basidiomycota) em ninho ativo de formigas Attini (*Acromyrmex aspersus*). *Caderno de Pesquisa Série Botânica* 10 (1/2): 27:36.

Steffen, K. 2003. Degradation of recalcitrant biopolymers and polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Dissertationes Biocentri Viikki Universitatis Helsingiensis*, 23/2003. Ph.D. Thesis. Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Helsinki. 68 p.

Steffen, K.T.; Hofrichter, M.; Hatakka, A. 2000. Mineralisation of 14C-labelled synthetic lignin and ligninolytic enzyme activities of litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54:819-825.

Vellinga, E.C. 2002. New combinations in *Cholophyllum*. *Mycotaxon* 83: 415-417.

Vellinga, E.C.; Yang, Z.L. 2003. *Volvolepiota* and *Macrolepiota* – *Macrolepiota velosa*, a new species from China. *Mycotaxon* 85: 183-186.

Vellinga, E.C. 2004. Genera in the family Agaricaceae – Evidence from nrITS and nrLSU sequences. *Mycological Research* 108: 354-377.

Wartchow F., Putzke J., Cavalcanti M.A.Q. 2008. Agaricaceae Fr. (Agaricales, Basidiomycota) from areas of Atlantic Forest in Pernambuco, Brazil. *Acta Botanica Brasílica*, v. 22, p. 287-299.

Wasser, S.P. 1993. Tribes Cystodermateae Sing. and Leucocoprineae Sing. of the CIS and Baltic States. *Libri Botanici* 9: 1-105.

Wolfenden, R.S.; Wilson, R.L. 1982. Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Journal of the Chemical Society Perkin 2*, 805-812.

Wright, J.E.; Albertó, E. 2002. *Guía de los Hongos de La Región Pampeana. I. Hongos con Laminillas*. Buenos Aires: Lola, p. 280.