

**CONTROLE DE FUNGOS CONTAMINANTES NO CULTIVO
DO COGUMELO COMESTÍVEL SHIITAKE (*Lentinula edodes*)
EM TOROS DE EUCALIPTO (*Eucalyptus urophylla*)**

MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE

Bióloga

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Sistemas de Produção.

Ilha Solteira – SP

Maio/ 2003

**CONTROLE DE FUNGOS CONTAMINANTES NO CULTIVO
DO COGUMELO COMESTÍVEL SHIITAKE (*Lentinula edodes*)
EM TOROS DE EUCALIPTO (*Eucalyptus urophylla*)**

MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Graciolli

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Sistemas de Produção.

Ilha Solteira – SP

Maio/ 2003

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Graciolli pelos ensinamentos, paciência e orientação.

À Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realizar este Curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo que financiou a pesquisa através do Projeto Temático Processo nº. 98/07726-5.

Ao prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira pelo fornecimento das linhagens de *Lentinula edodes*.

Aos Professores Dr. Mário Luiz Teixeira de Moraes, Dra. Ana Maria Rodrigues Cassiolato, Dra. Marli de Fátima Stradioto Papa e Dr. Salatiér Buzetti, pela ajuda em algumas etapas do trabalho.

Aos professores Dr. Walter Valério Valeriano Filho, Dr. João Antônio da Costa Andrade e Dr. Pedro Cezar dos Santos pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos funcionários da Fazenda de Ensino e Pesquisa da UNESP, pela ajuda no corte e transporte dos toros de *Eucalyptus urophylla*.

Aos funcionários Juarez, Circélia, Vera e Valdivino pelo auxílio direto nos experimentos.

Aos colegas de pós-graduação e a todos que de uma forma ou outra contribuíram com a realização deste trabalho.

E finalmente, agradeço especialmente aos meus pais Salvador e Lidia, aos meus irmãos Marcelo e Eduardo e a minha amiga Sueli Castro, que sempre me incentivaram e apoiaram, mesmo nas horas difíceis.

ANDRADE, M. C. N. de. **Controle de fungos contaminantes no cultivo do cogumelo comestível shiitake (*Lentinula edodes*) em toros de eucalipto (*Eucalyptus urophylla*)**. Ilha Solteira, 2003. 54p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A ocorrência de fungos contaminantes e competidores é comum durante o cultivo de shiitake em toros. No Brasil, poucos são os trabalhos que identificam e analisam os efeitos destes microrganismos na produção de shiitake. No entanto, sabe-se que a incidência destes fungos em grandes proporções pode levar à improdutividade dos toros. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo testar o efeito da cal hidratada e do fungicida benomyl no controle de fungos contaminantes e sua resposta na produção de shiitake em toros. Para tanto, testou-se anteriormente *in vitro* o efeito do benomyl nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 µg/mL no crescimento micelial das linhagens de shiitake JAB-L; JAB-K; LE-96/17; LE-95/01 e LE-96/22, de modo a selecionar a linhagem mais tolerante as concentrações de benomyl propostas, comparando com o crescimento das mesmas sem a presença deste fungicida (testemunha). O delineamento deste experimento foi inteiramente casualizado em fatorial 5X7, tendo no total trinta e cinco tratamentos, cada qual com três repetições, sendo cada repetição correspondente a uma placa de Petri. Observou-se que a única linhagem de shiitake a não sofrer qualquer efeito do benomyl nas concentrações propostas foi a LE-96/17, sendo a escolhida para ser utilizada no experimento em toros, a qual foi submetida a maior concentração de benomyl (16,0 µg/mL). O delineamento do experimento em toros foi inteiramente casualizado, com três tratamentos: testemunha; cal (8 kg de cal/ 60 litros de água) aplicados nos toros de produção logo após a inoculação e após cada choque de indução; e benomyl (16,0 µg/mL) aplicados quinzenalmente a partir da inoculação dos toros. Cada tratamento conteve 60 repetições, sendo a unidade experimental correspondente a um toro. Os toros utilizados foram de *Eucalyptus urophylla*, os

quais foram inoculados com a linhagem LE-96/17 em ambiente semi-controlado de temperatura e umidade relativa. Foram realizados três choques de indução. As variáveis avaliadas por tratamento foram: porcentagem de orifícios com inóculos inativos, porcentagem de toros contaminados e área afetada por fungos, número de basidiomas por toro (NB/T), diâmetro do píleo (DP), massa de basidiomas frescos (MBF), massa de basidiomas secos (MBS), produtividade (P), eficiência biológica (EB) e resíduo de benomyl. Como resultados verificou-se que houve correlação negativa entre o número de orifícios com inóculos inativos e a produção de shiitake em todos os tratamentos, concluindo-se que quanto maior a quantidade de orifícios com inóculos inativos menor a P, EB, MBF, MBS e o NB/T. Em relação aos fungos contaminantes, os principais gêneros identificados foram o *Trichoderma* e o *Poria*. No tratamento testemunha observando-se que houve correlação negativa da produção com a área contaminada por fungos na segunda colheita do shiitake e, no tratamento cal esta correlação ocorreu na primeira colheita do shiitake. Já no benomyl não foi verificado qualquer correlação da produção com a área contaminada por fungos, evidenciando que neste tratamento os fungos contaminantes não tiveram qualquer efeito na produção. O NB/T, MBS e MBS em todos os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si. Porém o DP obteve maiores médias na testemunha, seguido da cal e do benomyl. Em relação a P e EB, testemunha e cal não diferiram entre si, e novamente o benomyl obteve médias inferiores. Em todas as colheitas não foi constatado resíduo de benomyl nos basidiomas.

Palavras-chave: produção, cal hidratada, fungicida benomyl, *Trichoderma* spp., *Poria* spp.

ANDRADE, M. C. N. de. **Control of contaminants fungus in the shiitake (*Lentinula edodes*) edible mushroom cultivation in eucalyptus logs (*Eucalyptus urophylla*)**. Ilha Solteira, 2003. 54p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The occurrence of contaminants fungus and competitors are common during the shiitake cultivation in logs. In Brazil, few are the works that identify and they analyze the effects of these microorganisms in the shiitake production. However, it is known that the incidence of these fungus in great proportions can take to the unproductiveness the logs. Therefore, the present work had as objective to test the effect of the moisturized whitewash and of the fungicide benomyl in the control of contaminant fungus and his answer in the shiitake production in logs. For so much, it was tested in vitro previously the effect of the benomyl in different concentrations (0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 8.0 and 16.0 mg/mL) in the mycelial growth of five shiitake lineages (JAB-L; JAB-K; LE-96/17; LE-95/01 and, LE-96/22), in way to select the most tolerant lineage to the concentrations of proposed benomyl, comparing with the growth of the same ones without the presence of this fungicide (control). A completely randomized design in a factorial scheme 5X7, tends in the total 35 treatments, each one with three repetitions, corresponding to a plate of Petri. It was observed that only shiitake lineage did not suffer any effect of the benomyl in the proposed concentrations was the LE-96/17, being the chosen to be used in the experiment in logs, when the largest benomyl concentration was submitted (16.0 mg/mL). The other study was conducted in logs in an interely randomized design, with three treatments: control; whitewash (8 kg of whitewash / 60 liters of water) applied in the production logs soon after the inoculation and after each induction shock; and benomyl (16.0 mg/mL) applied biweekly starting from the inoculation of the logs. Each treatment contained 60 repetitions, being the experimental unit corresponding to a log. The used logs were of *Eucalyptus urophylla*, which were inoculated with the lineage LE-96/17 in semi-controlled atmosphere of temperature

and humidity. The appraised variables for treatment in three induction shocks were: percentage of holes without the growth of the shiitake (black inoculum), percentage of logs contaminated for fungus and affected area for the same ones, basidiomes number for log (NB/T), basidiomes diameter (DP), mass of fresh basidiomes (MBF), mass of dry basidiomes (MBS), productivity (P), biological efficiency (EB) and benomyl residue. As results were verified that there was negative correlation between the number of black holes and the shiitake production in all of the treatments, being ended that as larger the amount of holes with inactive inoculate smaller P, EB, MBF, MBS and NB/T. In relation to the contaminants fungus, the main identified types were the *Trichoderma* spp. and the *Poria* spp., being also made the correlation analysis between the contaminated area for mushrooms and the production. It was observed that there was negative correlation in the second crop of shiitake in the treatment control and, in the whitewash treatment in the first crop. Already benomyl did not affect any correlation, evidencing that in this treatment the contaminants fungus did not have any effect in the production. NB/T, MBS and MBS in all of the treatments did not differ statistically among themselves. However, the DP averages was larger in the control, following by the whitewash and of the benomyl. In relation to P and EB, the control and whitewash did not differ among themselves, and again with benomyl was obtained lower averages. In all of the crops the presence of benomyl residues was not verified in the basidiomes.

Key-words: production, whitewash, benomyl, *Trichoderma* spp., *Poria* spp.

3.2.10.5. Massa média de basidiomas frescos (MBF)	19
3.2.10.6. Massa média de basidiomas secos (MBS)	20
3.2.10.7. Produtividade (P)	20
3.2.10.8. Eficiência biológica (EB).....	20
3.2.10.9. Resíduo de benomyl.....	20
3.2.11. Análise estatística	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Experimento <i>in vitro</i>	22
4.2. Experimento em toros.....	26
5. CONCLUSÕES.....	45
5.1. Experimento <i>in vitro</i>	45
5.2. Experimento em toros.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01	Efeito do fungicida benomyl no crescimento micelial da linhagem JAB-K de <i>Lentinula edodes</i> , <i>in vitro</i> 23
02	Efeito do fungicida benomyl no crescimento micelial da linhagem LE-95/01 de <i>Lentinula edodes</i> , <i>in vitro</i> 23
03	Efeito do fungicida benomyl no crescimento micelial da linhagem JAB-L de <i>Lentinula edodes</i> , <i>in vitro</i> 24
04	Efeito do fungicida benomyl no crescimento micelial da linhagem LE-96/22 de <i>Lentinula edodes</i> , <i>in vitro</i> 24
05	Aspecto superficial dos orifícios inoculados com shiitake em toros de eucalipto 27
06	Porcentagem média de orifícios sem crescimento do shiitake (inóculo inativo) e com crescimento do shiitake (inóculo ativo) em cada tratamento, seis meses após a inoculação 28
07	Porcentagem de toros contaminados em cada tratamento antes de cada choque de indução 31
08	Aspecto do crescimento de <i>Trichoderma</i> spp. em toros de eucalipto 33
09	Aspecto do crescimento de <i>Poria</i> spp. em toros de eucalipto 33

10	Aspecto do crescimento do fungo não identificado (A)	33
11	Aspecto do crescimento do fungo não identificado (B)	33
12	Porcentagem de área contaminada por fungos de ocorrência natural em cada tratamento, realizado antes de cada choque de indução.....	34
13	Porcentagem de área contaminada por fungos de ocorrência natural realizado antes do primeiro choque de indução. Dados médios de 60 repetições por tratamento	35
14	Porcentagem de área contaminada por fungos de ocorrência natural realizado antes do segundo choque de indução.....	36
15	Porcentagem média de área contaminada por fungos de ocorrência natural realizado antes do terceiro choque de indução.....	36
16	Número médio de basidiomas por toro em cada choque de indução nos tratamentos testemunha, cal e benomyl	40
17	Diâmetro médio do píleo em cada choque de indução nos tratamentos testemunha, cal e benomyl	41
18	Porcentagem total de basidiomas pequenos ($\phi \leq 5$), médios ($5 < \phi \leq 7$) e grandes ($\phi > 7$) em cada tratamento nos três choques de indução.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
01	Efeito <i>in vitro</i> das diferentes concentrações do fungicida benomyl no crescimento micelial (mm) de cinco linhagens de <i>Lentinula edodes</i> , em meio batata-dextrose-ágar, após oito dias de desenvolvimento, a 25 °C 25
02	Correlação das variáveis de produção das três colheitas do shiitake: produtividade (P), eficiência biológica (EB), massa de basidiomas frescos (MBF), massa de basidiomas secos (MBS) e número de basidiomas por toro (NB/T), em função do número de orifícios com inóculo inativo (II), nos tratamentos testemunha, cal e benomyl 29
03	Correlação das variáveis de produção da primeira colheita do shiitake: produtividade (P), eficiência biológica (EB), massa de basidiomas frescos (MBF), massa de basidiomas secos (MBS), e número de basidiomas por toro (NB/T), em função da área contaminada (AC), nos tratamentos testemunha, cal e benomyl..... 37
04	Correlação das variáveis de produção da segunda colheita do shiitake: produtividade (P), eficiência biológica (EB), massa de basidiomas frescos (MBF), massa de basidiomas secos (MBS) e número de basidiomas por toro (NB/T), em função da área contaminada (AC), nos tratamentos testemunha, cal e benomyl..... 38
05	Correlação das variáveis de produção da terceira colheita do shiitake: produtividade (P), eficiência biológica (EB),

	massa de basidiomas frescos (MBF), massa de basidiomas secos (MBS) e número de basidiomas por toro (NB/T), em função da área contaminada (AC), nos tratamentos testemunha, cal e benomyl.....	38
06	Valores totais médios do número de basidiomas por toro (NB/T); do diâmetro do píleo (DP); da massa de basidiomas frescos (MBF); e secos (MBS); da produtividade (P) e eficiência biológica (EB), nos três choques de indução	39

1. INTRODUÇÃO

O shiitake - *Lentinula edodes* (Berk) Pegler - é atualmente produzido de duas formas: em toros, que é o método tradicional utilizado a mais de 900 anos (ZHANXI & ZHANHUA, 2001), e em cultivo axênico (blocos de serragem suplementada com nutrientes) (MONTINI, 2001). O cultivo axênico tem a desvantagem do alto custo de esterilização, exige um controle ambiental rigoroso, além de mão-de-obra especializada (ROYSE, 1985). Já o cultivo em toros é menos exigente em relação ao manejo e às instalações. Por isso no Brasil, o cultivo de shiitake tem sido realizado quase que exclusivamente em toros, e dentre as espécies arbóreas, o eucalipto tem sido o mais utilizado, dado sua grande disponibilidade nacional (EIRA & MONTINI, 1997).

Durante o cultivo de shiitake em toros, algumas exigências mínimas muitas vezes são desconsideradas por parte dos produtores, comprometendo a produtividade. Entre estes fatores estão as condições climáticas (temperatura e umidade relativa) (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990), as características do toro e do inóculo (interação entre linhagem e espécie de eucalipto) (TEIXEIRA, 2000) e o nível de contaminação dos toros (ANDRADE, 1999; PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).

Os problemas causados pelos fungos contaminantes à produção do shiitake em toros, ainda não estão bem esclarecidos. Sabe-se que as perdas podem variar de acordo com o índice e grau de penetração dos contaminantes no interior dos toros (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). Toros de eucalipto

quando submetidos a inoculações artificiais com os contaminantes *Hypoxylon* spp., *Poria* spp., *Trichoderma* spp. e *Stemonitis* spp., em elevado potencial de inóculo tornaram-se improdutivos (ANDRADE, 1999).

Para o combate e prevenção dos fungos contaminantes, tem sido sugerido um acurado controle do manejo (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990), borrifar álcool comercial (70%) ou uma solução de hipoclorito de sódio (alvejante) na concentração de 3:1 (água: hipoclorito) diretamente sobre os fungos competidores (PASCHOLATI et al., 1998) ou um banho dos toros com cal hidratada logo após a inoculação do shiitake (EIRA & MONTINI, 1997; ANDRADE, 1999). O fungicida benomyl também tem sido utilizado, porém, em cultivo axênico (MATA & GAITÁN-HERNÁNDEZ, 1994; WORRALL & YANG, 1992; GIL, 1993; SONG et al., 1987).

Dessa maneira, este trabalho teve como propósito avaliar o efeito da cal hidratada e do fungicida benomyl no controle de fungos contaminantes, que naturalmente ocorrem durante o cultivo de shiitake em toros, e seus possíveis efeitos no número de basidiomas, diâmetro do píleo, massa de basidiomas frescos, massa de basidiomas secos, produtividade e eficiência biológica. Também foi analisado o resíduo de benomyl nos basidiomas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais

A maioria dos cogumelos comestíveis está na Divisão Basidiomycota e os mais cultivados, são o *Ágaricus bisporus*, *Pleurotus* spp. e o *Lentinula edodes* (ZADRAZIL & GRABBE, 1983). Este último é conhecido popularmente por diversos nomes, sendo comum a palavra japonesa shiitake (“shii” = árvore e “take” = cogumelo) (HARRIS, 1993).

O shiitake é um basidiomiceto aeróbico lignolítico, pertencente à Classe Basidiomycetes, Subclasse Holobasidiomycetidae, Ordem Agaricales, Família Tricholomataceae (URBEN et al., 2001). Em seu habitat natural, cresce como saprófita em madeiras de árvores de florestas da zona temperada e subtropical da China, Japão, Coreia, nas montanhas do Himalaia, norte de Bornéu, Filipinas e na parte norte da Tailândia (LEVANON, et al., 1993). Essas árvores pertencem às famílias Betulaceae e Fagaceae, sendo comum a castanheira (*Castanea* spp.), a faia (*Fagus* spp.), o carvalho (*Quercus* spp.) e o olmo (*Catanopsis* spp.) (BONONI et al., 1995).

O ciclo de vida dos basidiomicetos pode ser dividido em duas etapas: vegetativa e reprodutiva. A fase vegetativa corresponde ao micélio, o qual é formado por um conjunto de hifas. O cogumelo, também conhecido como basidioma corresponde a fase reprodutiva, sendo macroscopicamente constituído pelo estipe e píleo. No píleo, situam-se as lamelas, cujas superfícies estão localizados os basídios

que produzem e ejetam os basidiósporos (esporos sexuais) (GUGLIOTA & CAPELARI, 1998).

Naturalmente, o shiitake tem origem de basidiospos, que quando em contato com o substrato em condições favoráveis, germinam e dão origem a hifas haplóides unicelulares (micélio primário). Quando duas hifas originárias de basidiospos diferentes, contendo materiais genéticos compatíveis se unem, ocorre a fusão do citoplasma, resultando em duas hifas dicarióticas (micélio secundário). O shiitake passa a maior parte do seu ciclo de vida na forma de micélio secundário. Neste estágio vegetativo o micélio coloniza e decompõe a madeira, secretando enzimas que hidrolizam os materiais existentes na madeira que, de outra forma, seriam insolúveis. Isto acontece com a celulose, hemicelulose e a lignina que se transformam em açúcares simples que são absorvidos pelas células, sendo estas as principais fontes de carbono e de energia para o shiitake. Uma vez estimulados com condições ambientais favoráveis, inicia-se a diferenciação do micélio secundário em terciário (o basidioma), ocorre então o surgimento do primórdio, que aumenta em tamanho e, à medida que o basidioma cresce, desenvolvem-se as lamelas na fase inferior do píleo. Após maduros, seus basidiosporos são ejetados dos basídios e dispersos pelo ar, para colonizar novos substratos (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).

Seu cultivo teve início na China, por volta de 960 d.C., e em 1500 d.C., foi introduzido no Japão pelos agricultores chineses (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). Posteriormente foi expandido para os demais países da Ásia Oriental, (LEVANON et al., 1993), tornando-se para estes países, um importante produto agrícola e industrial (CHANG & MILES, 1989). Na América central e do Sul, o cultivo comercial vem se desenvolvendo nos últimos 25 anos, especialmente desde 1990 (LAHMANN & RINKER, 1991).

O shiitake é um cogumelo comestível de alto valor nutritivo, contendo minerais essenciais (zinco, cálcio, fósforo, ferro, sódio, cobre, magnésio e potássio) e com quantidades significativas de vitaminas e/ou seus precursores tais como, tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), niacina, biotina, ácido ascórbico (vitamina C), ergosterol (precursor da vitamina D), ácido pantotênico (vitamina A), além das vitaminas E, B₆ e B₁₂ (MANZI et al., 1999; ROYSE et al., 1985). O shiitake é rico em compostos biológicos que lhe confere potencial anticancerígeno (lentinan, KS-2, LAP1, polifenol oxidases), antiviral (KS-2,

eritadenina, lentinan, JLS, Ac2P), imunopotenciador (EP3, EPS4), hipocolesterolêmico (eritadenina), agente hepatoprotetor, antibactericida (lentinan, cortinellin, lentinamicin), antifúngico (lentinan) (HATVANI, 2001; MANZI & PIZZO FERRATO, 2000; WASSER & WEIS, 1999; CHANG & MILES, 1984), propriedades antioxidantes (YANG et al., 2002), na proteção de plantas e contra infecção do vírus do tabaco TMV (FBP) (LEATHAM, 1982), sendo, portanto utilizado há muitos anos em medicina experimental no tratamento de diversas doenças.

Os fatores que podem interferir na concentração dos compostos nutracêuticos e na produtividade do shiitake são: linhagem, substrato, diâmetro dos toros, condições climáticas, número de orifícios inoculados e os métodos de manejo (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990; SAN ANTONIO, 1981; TEIXEIRA & MACHADO, 1997).

A escolha da linhagem é um fator de fundamental importância para se obter sucesso no cultivo de shiitake, pois as mesmas podem diferir quanto à velocidade de crescimento, resistência a fungos contaminantes, temperatura e umidades ótimas de frutificação e incubação, tamanho e forma dos basidiomas e produtividade (TEIXEIRA, 2000; CAMPBELL & RACJAN, 1999; PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). Portanto é importante conhecer as exigências químicas e físicas de cada linhagem, para posteriormente adotar procedimentos para otimizar o cultivo e assim obter melhor produtividade.

Entre as variáveis ambientais, a temperatura e a umidade relativa têm sido fatores muito importantes no cultivo de shiitake, pois influencia o tempo de colonização do substrato, a produção, o período de frutificação e a morfologia do basidioma (CAMPBELL & RACJAN, 1999; PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). Durante o período de colonização micelial nos toros a faixa ótima de temperatura situa-se entre 24 a 28 °C, sendo 25 °C a temperatura ideal (SAN ANTONIO, 1981; EIRA & MONTINI, 1997). Abaixo de 5 °C e acima de 35 °C o crescimento micelial é interrompido. O shiitake sobrevive nos toros mesmo em temperaturas de -30 °C, e acima de 45 °C o micélio morre (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). Em relação à umidade relativa, o nível ideal situa-se entre 70 a 80 %, não devendo ultrapassar 90 %, pois os toros seriam facilmente contaminados (CHANG & MILES, 1989).

2.2. Cultivo em toros

No cultivo de shiitake em toros, a escolha da espécie arbórea deve ser feita em função de suas características químicas, físicas, de fatores econômicos e ambientais (SAN ANTONIO, 1981). A casca deve ser grossa, para evitar a invasão por fungos e bactérias e a perda da umidade, e o alburno deve ser maior em proporção que o cerne, pois é a região colonizada pelo fungo.

No Brasil, toros de eucalipto têm sido o mais comumente utilizado, devido sua maior disponibilidade, baixo custo, densidade baixa e conter pouco cerne (EIRA & MONTINI, 1997). No entanto, muitos produtores reclamam da sua produtividade variável, o que vem de encontro com os resultados obtidos por MONTINI (1997), onde verificou trabalhando com o *Eucalyptus saligna*, que alguns toros chegavam a produzir 660 g de cogumelo no primeiro fluxo e, em contrapartida, muitos nada produziram. Um dos principais fatores responsáveis por estas diferenças pode ser os fungos contaminantes (ANDRADE, 1999). Nos casos em que o shiitake está estressado por uma condição ambiental não favorável ao seu desenvolvimento, ou mesmo ao longo dos fluxos de produção, onde os níveis de nutrientes do toro tendem ao esgotamento, sua capacidade de resistir a estes fungos é diminuída (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).

Apesar de não estarem ainda bem claras as conseqüências causadas pelos fungos contaminantes à produção de shiitake, sabe-se que as perdas podem variar de acordo com o índice e grau de penetração dos contaminantes no interior dos toros (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). Em Botucatu, cidade localizada no oeste do estado de São Paulo, que de acordo com a classificação de Köppen é uma região constantemente úmida caracterizada por clima Csa temperado (mesotérmico), com temperatura média anual de aproximadamente 17 °C, foram isolados de toros de eucalipto inoculados com shiitake, os seguintes contaminantes: *Hypoxylon* spp., *Poria* spp., *Trichoderma* spp. e *Stemonitis* spp. Em toros propositalmente contaminados por fungos logo após a inoculação do shiitake, ANDRADE (1999) verificou a inexistência de produção, devido à penetração e instalação do contaminante ter ocorrido antes que o shiitake se estabelecesse no toro. Já os toros testemunhas produziram, mesmo apresentando superficialmente os contaminantes. Portanto, com base nesses experimentos, observa-se que as contaminações tornam-se um problema mais

grave quando ocorrem internamente, antecipando-se a colonização do shiitake, pois nestes casos é que tem se verificado quedas significativas de produção ou improdutividade total.

Alguns cuidados devem ser tomados durante o manejo dos toros: transporte, tendo o máximo de cuidado para não lesionar a casca, pois qualquer orifício torna-se uma porta de entrada para contaminantes (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990; EIRA & MONTINI, 1997); a inoculação deve ser realizada logo após o corte das árvores e os orifícios devem ser feitos com equipamento adequado, evitando-se assim que o inóculo entre em contato com rebarbas que possam ser levadas para dentro do orifício, ocasionando as contaminações internas no toro, que como já salientado por ANDRADE (1999), será desastrosa para a produtividade.

2.3. Contaminantes no cultivo

Existem aproximadamente 150 espécies de fungos que podem afetar os toros, o micélio ou o cogumelo durante as fases do cultivo, entre elas estão aquelas que ocasionam doenças. Estes fungos liberam compostos antifúngicos que podem danificar ou mesmo matar as hifas do shiitake e, neste sentido, os mais críticos são fungos contaminantes da Divisão Ascomycota; por outro lado, aqueles que competem por espaço e nutrientes na madeira são predominantemente da Divisão Basidiomycota; os que colonizam a madeira, vindo nos toros a partir do campo, normalmente não afetam o shiitake e somente em condições extremamente adversas podem agir como competidores (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).

Entre os fungos competidores, os basidiomicetos são maioria. Caso estes infectarem o toro antes que o shiitake se estabeleça, podem dominar rapidamente o toro, limitando o shiitake a pequenas áreas. A espécie *Coriolus versicolor* e o gênero *Stereum* são os fungos desse tipo mais comum encontrados em toros previamente inoculados com o shiitake. O *Coriolus versicolor* tem listras claras e escuras alternadas, sobre um corpo de frutificação cinza ou marrom. Na parte inferior branca do corpo de frutificação, pequenos poros são claramente visíveis, cobrindo toda a superfície. *Stereum* spp. têm aparência semelhante ao *Coriolus* exceto que tanto a sua parte superior como a inferior é colorida variando entre marrom, verde-oliva, amarelo-claro, lilás, vermelho e laranja. Os poros na parte

inferior são muito pequenos, quase invisíveis a olho nu. Geralmente, os corpos frutificantes de *Stereum* spp. surgem mais nas proximidades da superfície do toro do que os de *Coriolus* spp., formando uma série pequena de prateleiras. Seu corpo de frutificação fino, que pode ter forma de concha, permanecendo preso pelo centro e, apenas as bordas erguem-se em relação à da superfície do toro (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).

Outros competidores levam vantagem sobre o shiitake quando os toros estão muito secos durante o período de produção. É o caso dos membros dos gêneros *Poria*, *Phellinus* e *Polystictus*. Por outro lado, irrigações curtas e freqüentes podem favorecer estes fungos, pois mantêm úmida a parte externa do toro, sendo que a parte interna não recebe a umidade adequada (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).

Entre os contaminantes, existem fungos que se adaptam a uma grande variedade de condições climáticas. É o caso do *Trichoderma* spp., o qual possui espécies que preferem toros localizados em regiões quentes e secas; outras se desenvolvem bem em condições de alta umidade, tanto quentes como frescas ("bolor verde"). O shiitake torna-se suscetível ao *Trichoderma* spp. em determinados casos tais como: antes da colonização do toro pelo shiitake, quando o nível de umidade ultrapassa 90 % de umidade relativa; quando o shiitake está enfraquecido por estresses ambientais e logo após a frutificação. Estes fungos, na fase inicial, surgem como manchas brancas e à medida que envelhecem são produzidos os conídios coloridos deixando as colônias geralmente verdes (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).

O shiitake também possui seu aparato enzimático de defesa. A presença de *Trichoderma* spp., em toros de *Quercus serrata*, em cultivo de shiitake, em condições naturais e com idade entre 1 e 5 anos, demonstra que o shiitake inibe a invasão do *Trichoderma* spp., pela produção de um pigmento amarronzado e um antibiótico na área de contato entre os dois fungos (TOKIMOTO, 1985). Em cultura *in vitro*, utilizando meio de cultura semi-sintético, contendo glucose como fonte de carbono, o shiitake também foi capaz de repelir o *Trichoderma* spp., porém, em meio de xilose, o micélio do shiitake foi severamente invadido e dissolvido pelo *Trichoderma* spp. Portanto, o antagonismo entre shiitake e *Trichoderma* spp. varia em função das condições nutricionais (TOKIMOTO, 1985).

As condições climáticas também representam um fator limitante ao desenvolvimento dos fungos. Em um experimento *in vitro*, BADHAM (1991) observou que o *Trichoderma harzianum* apresentou altas taxas de crescimento a temperaturas entre 29 e 31 °C, enquanto que o *Lentinula edodes* apresentou temperaturas ótimas entre 22 e 24 °C. Em relação à umidade do substrato, não houve diferenças de competitividade entre 70 e 39 %, porém houve diferenças significativas entre 39 e 30 % de umidade do substrato sendo o *Trichoderma harzianum* favorecido por esta condição.

Outro fungo contaminante muito comum que pode parasitar o crescimento do shiitake é o *Hypoxylon* spp., o qual surge inicialmente como pequenos pontos escuros, geralmente em rachaduras na casca, evoluindo gradualmente para pequenos extrusos duros. Em estágios mais avançados, a casca dos toros cai. Em relação às condições climáticas, sabe-se que alta umidade favorece seu desenvolvimento, crescendo muito rápido após se estabelecer no toro (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). Em condições *in vitro* em meio batata-dextrose-ágar, *Lentinula edodes* obteve melhor crescimento micelial que *Hypoxylon truncatum* à temperaturas menores que 10 °C e que *Hypoxylon truncatum* mostrou-se melhor em relação ao crescimento micelial à temperaturas acima de 25 °C (ABE, 1989).

O *Stemonitis* spp., é formado por uma massa de citoplasma multinucleada semelhante a uma grande ameba (fase plasmoidal) que pode espalhar-se rapidamente sobre a superfície dos toros e em condições de alta umidade. Sob condições secas, por outro lado surgem como áreas marrons-escuras ou pretas, formadas por um emaranhado de hastes finas de corpos frutificados de até 1 cm de altura. A fase plasmodial alimenta-se de micélio, esporos, primórdios em desenvolvimento e bactérias, reduzindo a produção (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).

2.4. Controle de fungos contaminantes

No combate e prevenção dos organismos que prejudicam o desenvolvimento do shiitake em toros, não têm sido utilizados defensivos agrícolas, mas apenas acurado controle de manejo.

A presença de fungos competidores não significa necessariamente que haverá danos, morte ou queda da produção de shiitake. É muito importante verificar o momento em que esta competição está ocorrendo; com relação ao controle, recomenda-se isolar os toros infectados para diminuir a concentração de esporos próximos aos toros sadios (EIRA & MONTINI, 1997).

Em pesquisas desenvolvidas no Módulo de Cogumelos da Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu/UNESP, têm sugerido no combate de fungos contaminantes um banho dos toros logo após a inoculação do shiitake com cal hidratada, na proporção de 8kg de cal para 60 litros de água (EIRA & MONTINI, 1997). As vantagens na utilização da cal hidratada no controle de contaminantes são: os toros produzem basidiomas perfeitos e de sabor similar aos obtidos em toros sem a cal; diminui a incidência de pragas da madeira (brocas e larvas da casca); não é considerada um agrotóxico e seu impacto ambiental é mínimo, posto que a cal converte-se naturalmente em carbonato de cálcio; pode ser usado como um recuperador de toras em estágio avançado de contaminações superficiais (EIRA & MONTINI, 1997).

No cultivo axênico do shiitake, onde o substrato de produção é serragem suplementada com farelos de cereais, ou ainda em substratos alternativos, tais como polpa de café (MATA & GAITÁN-HERNÁNDEZ, 1994), resíduo de maçã (WORRALL & YANG, 1992) e de algodão (SONG et al., 1987) é muito comum a utilização de benomyl. Este fungicida é utilizado tanto no preparo do substrato, ou seja, antes da inoculação do shiitake ou após o substrato já ter sido colonizado. A invasão de *Trichoderma* spp. é evitada misturando-se no substrato 20 ppm de benomyl. Se ocorrer a invasão de *Trichoderma* spp. após a colonização do shiitake a eliminação é facilmente realizada mediante um tratamento rápido e superficial com benomyl (GIL, 1993). No cultivo de *Pleurotus* spp. e *Ágaricus bisporus* ("champignon de Paris"), tanto na Europa como na América, tem sido utilizado benomyl no combate de fungos competidores (MUEZ OROBIA, 1993).

O *Penicillium* spp. é um competidor ativo que se desenvolve diretamente no substrato, em cultivo axênico, durante o período de incubação, tanto no cultivo do shiitake como de *Pleurotus* spp. No início apresenta-se como pequenas manchas esbranquiçadas, com aspecto pulverulento. Se a contaminação for intensa a perda de produtividade pode chegar a 50 %. O controle pode ser feito com benomyl numa concentração de 25 ppm de princípio ativo diluído em água,

submergindo o substrato nesta solução por 18 horas. Concentrações acima de 150 ppm causam crescimento anormal dos corpos de frutificação de *Pleurotus* spp. (BANO & RAJARATHANAM, 1988).

O benomyl foi o primeiro fungicida sistêmico introduzido na agricultura, possuindo atividades preventivas, curativas e sistêmicas contra numerosos grupos de fungos. Apresenta, ainda, baixa toxicidade e, de modo geral, não provoca fitotoxicidades. No Brasil, existem duas marcas comerciais (Benlate 500 e Benomyl Nortox), ambas contendo 500 g de benomyl por kg do produto comercial (PICININI, 1994).

Assim como os demais benzimidazóis, o benomyl trouxe grandes benefícios no controle de contaminações fúngicas. Seu inovador e único mecanismo de ação inibe a polimerização da beta-tubulina (proteína constituinte do citoesqueleto de células eucarióticas), prejudicando as divisões celular e nuclear, essenciais ao crescimento micelial e a produção de esporos (PICININI, 1994). No entanto, exemplos de resistência a este fungicida são numerosos (PEARSON & TASCHENBERG, 1980; KEINATH & ZITTER, 1998; McGRATH & SHISHKOFF, 2001). Portanto, antes de recomendar a utilização deste ou de qualquer outro fungicida, é necessário conhecer sua eficiência no controle de fungos não desejáveis e suas eventuais consequências no cultivo.

A alta incidência de pragas e doenças no cultivo de shiitake é responsável por importantes perdas econômicas tanto pela redução total ao rendimento das colheitas, como pela perda da qualidade do produto. Não são raros os casos de perda total dos toros devido ao ataque de pragas e doenças. A situação atual de vários produtores no Estado de São Paulo é no mínimo preocupante.

Se medidas urgentes mais eficientes não forem tomadas no controle dos contaminantes, poderá acontecer o mesmo que aconteceu com o cultivo de *Ágaricus bisporus*, no início da produção comercial em 1953, um desanimo por parte dos produtores, devido ao ataque de doenças com conseqüente queda da produção (AMARAL, 1960).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos no período de Janeiro/ 2002 à Novembro/ 2002, ambos conduzidos nas dependências do Departamento de Biologia e Zootecnia, UNESP, Campus de Ilha Solteira - SP, de coordenadas geográficas 20°22'S e 51°22'W Gr, altitude de 335 m, temperatura anual de 23,6 °C, e precipitação pluviométrica anual de 1330 mm. Segundo classificação de Köppen a região é definida como tropical quente e úmida (CENTURION, 1982).

O primeiro experimento foi realizado *in vitro*, onde se avaliou o efeito de diferentes concentrações do fungicida benomyl no crescimento micelial de cinco linhagens de shiitake. A linhagem mais tolerante ao benomyl foi utilizada no segundo experimento, em toros, e teve como objetivo avaliar o efeito do benomyl e da cal hidratada no controle de fungos contaminantes e sua resposta no número de basidiomas, diâmetro do píleo, massa de basidiomas frescos, massa de basidiomas secos, produtividade e eficiência biológica. Também foi analisado o resíduo de benomyl nos basidiomas.

3.1. Experimento *in vitro*

Utilizou-se cinco linhagens de shiitake oriundas da Micoteca do Módulo de Cogumelos da Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP, Campus de Botucatu, identificadas como JAB-L, JAB-K, LE-96/17, LE-95/01 e LE-96/22. As linhagens (matrizes primárias) foram armazenadas em tubos de ensaio, após

crescimento em meio batata-dextrose-ágar (BDA – Biobrás), cobertas com óleo mineral esterilizado, em geladeira a 6 °C, na Micoteca do Departamento de Biologia e Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira.

Em câmara de fluxo laminar, a partir do meio de cultura estoque, pequenos fragmentos foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo o meio BDA. As placas de Petri foram incubadas em BOD a 25 °C, no escuro. Após a colonização de $\frac{3}{4}$ da área das placas de Petri, ou seja, quando todas as linhagens estavam com a mesma idade fisiológica, retirou-se, com o auxílio de um vazador de 4 mm, discos da periferia da colônia que foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA com o benomyl em diferentes concentrações.

Para avaliar a sensibilidade do shiitake ao fungicida benomyl (metil-1 (butilcarbamoil) 2-benzimidazol carbamato (MBC)), este foi pesado e misturado em água destilada esterilizada e adicionado ao meio BDA fundente (45–50 °C), em condições assépticas, de modo a se obter concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 e 16,0 µg/mL. Para as testemunhas foi utilizado somente o BDA.

Após a identificação, as placas foram distribuídas casualmente e mantidas na estufa incubadora a 25 °C, por oito dias. Após este período, foi realizada a avaliação do crescimento micelial do shiitake nos diferentes tratamentos por meio de medição do crescimento linear do fungo na superfície do meio. Com o uso de uma régua graduada em milímetros, foram feitas duas medidas em sentidos diametralmente opostos, estabelecendo-se uma média para cada uma das repetições. As médias foram comparadas com as respectivas testemunhas.

3.1.1. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5X7, cujos tratamentos corresponderam as combinações das cinco linhagens de shiitake e as sete concentrações de benomyl, tendo no total trinta e cinco tratamentos. Cada tratamento constou de três repetições, sendo cada repetição correspondente a uma placa de Petri.

As médias de crescimento micelial dentro de cada linhagem de shiitake entre as diferentes concentrações de benomyl (fator quantitativo) foram comparadas através de gráficos de regressão, após análise de variância. Já a

comparação das médias de crescimento micelial entre as linhagens de shiitake (fator qualitativo) dentro de cada concentração de benomyl foram feitas através do teste de Tukey a 5% de significância.

3.2. Experimento em toros

O manejo dos toros foi baseado na metodologia proposta por SAN ANTÔNIO (1981) e BONONI & TRUFEM (1986), com algumas adaptações descritas a seguir:

3.2.1. Matriz primária

Como matriz primária optou-se por apenas uma das cinco linhagens de shiitake testadas no experimento *in vitro*, sendo o meio de cultura utilizado para a multiplicação desta linhagem descrito no item 3.1.

3.2.2. Inóculo

O substrato base para a produção do inóculo constitui-se de serragem de *Eucalyptus urophylla*, passada em malha de 3mm, com teor de umidade ajustada para 60% (STAMETS & CHILTON, 1983) e suplementada com farelo de arroz na proporção de 4:1 (TEIXEIRA, 1996). O teor de umidade da serragem foi obtido deixando-a de molho em água por 24h, e em seguida, comprimindo-a com as mãos até que a água deixasse de escorrer.

A mistura foi distribuída em sacos de polipropileno com capacidade para 1000 g, medindo 250 mm de altura e 150 mm de largura. Cada saco plástico, contendo 600 g do substrato úmido, foi selado deixando uma pequena abertura que foi vedada com algodão e em seguida, autoclavado a 120 °C durante 90 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, os sacos foram inoculados, em câmara de fluxo laminar, com um disco (10 x 10 mm) de diâmetro da matriz primária do shiitake, tomando-se o cuidado para que a parte colonizada

estivesse voltada para baixo. Após 30 dias de incubação a 25 °C no escuro, todo substrato estava colonizado e pronto para ser inoculado nos toros.

3.2.3. Obtenção dos toros

Os toros utilizados foram de árvores de *Eucalyptus urophylla*, primeiro corte, com dez anos de idade, cultivadas na Fazenda de Ensino e Pesquisa da UNESP, localizada no município de Selvíria-MS, em latossolo vermelho-escuro de textura argilosa, originalmente coberto com vegetação de cerrado. As árvores foram cortadas com o auxílio de uma moto serra, com o cuidado de não causar danos na casca. Foram selecionados 180 toros medindo 1m de comprimento e diâmetro em torno de 12 cm. Após o corte, os toros foram transportados para as dependências do Departamento de Biologia e Zootecnia (FE-UNESP) onde foram colocados em posição horizontal, até a inoculação no dia seguinte.

3.2.4. Inoculação dos toros

A inoculação dos toros foi realizada no dia 16/01/02. Inicialmente foram abertos orifícios com 20mm de profundidade, alinhados em sentido longitudinal ao toro, num padrão de “zig-zag”, com auxílio de uma furadeira elétrica (6000 rpm) própria para o cultivo de shiitake, com broca de aço para madeira de 12 mm de diâmetro e 20 mm de profundidade. O número total de orifícios foi equivalente a 4 vezes o diâmetro do toro, em média 48 orifícios, dispostos em filas paralelas, distanciadas cerca de 5 cm entre linhas e cerca de 15 cm entre orifícios de uma mesma linha. Imediatamente após a realização dos orifícios, os mesmos foram preenchidos com o inóculo, utilizando-se uma inoculadora manual, de modo que cada orifício recebesse a mesma quantidade. Em seguida, com o auxílio de um bastão com esponja de aço na extremidade, os orifícios foram vedados com parafina, fundida a 115° C, contendo 20 % de breu.

3.2.5. Incubação

Os toros inoculados foram dispostos em três pilhas de 60 toros, sendo cada pilha composta de 10 camadas de 6 toros, espaçados 5 cm entre si e dispostas perpendicularmente às camadas subjacentes. A identificação dos toros foi feita com plaquetas de alumínio estampadas com o número da repetição e uma letra para identificação do tratamento.

A primeira camada da pilha foi colocada sobre tijolos, distanciada 30 cm da superfície do solo. A incubação ocorreu em um barracão de alvenaria coberto com telha de barro e piso recoberto com areia grossa e pedregulhos. As paredes laterais estavam dotadas de pequenas aberturas a fim de serem fechadas quando necessário para melhor controle da luminosidade, ventilação e umidade.

A irrigação foi diária, com auxílio de mangueira de jardim, sendo a umidade relativa do ar mantida acima de 60 %, por meio de microaspersores instalados em todo o barracão, com vazão de cinco litros por hora. Os toros permaneceram nessas condições por seis meses. Para que houvesse crescimento uniforme neste período, foi feito o remonte das pilhas a cada dois meses, invertendo-se as camadas de toros na pilha. As camadas superiores foram transferidas para as camadas inferiores e vice-versa. Além disso, a posição dos toros sofreu um giro de 180°.

Durante todo o ciclo produtivo, a contaminação por fungos ocorreu naturalmente.

3.2.6. Tratamento dos toros com benomyl e cal hidratada

Cada pilha com 60 toros correspondeu a um tratamento, tendo no total três tratamentos: benomyl, cal e testemunha. A aplicação do benomyl foi quinzenal e a partir da inoculação do shiitake nos toros, sendo que a indução da frutificação foi sempre quinze dias após a aplicação do benomyl. A concentração de benomyl, misturado em água, foi definida em função dos resultados do experimento *in vitro*. Foi aplicado um volume de 15 litros da solução, o que foi suficiente para irrigar todos os toros com o auxílio de um pulverizador costal.

Para a avaliação do efeito protetor da cal hidratada, os toros foram banhados com cal hidratada (8 kg de cal/ 60 litros de água) logo após a vedação dos orifícios e após cada choque de indução.

3.2.7. Indução da frutificação

Após o período de incubação, a frutificação foi estimulada artificialmente. Para isso, os toros foram transferidos para o tanque de imersão e presos ao fundo com o auxílio de uma corrente para que não flutuassem. Em seguida, os toros foram recobertos com água fria mantida a uma temperatura próxima a 8 °C abaixo da temperatura ambiente, pela adição de gelo à água do tanque de imersão, por um período de doze horas. Ainda para estimular a frutificação, após os choques de indução hídrica e térmica, os toros sofreram um choque de indução mecânica por meio de sua queda livre em posição vertical, de uma altura de 30 cm, em superfície de concreto. No total foram realizados três choques de indução por tratamento.

3.2.8. Frutificação

A cada choque de indução os toros foram dispostos no mesmo barracão, onde permaneceram em posição vertical inclinada, com espaçamento de 10 cm entre eles. Os toros foram mantidos úmidos, através de irrigação diária, até o aparecimento dos primórdios. O monitoramento da temperatura e umidade relativa do ar dentro do barracão foram feitos por meio de termômetro de bulbo seco e bulbo úmido. A umidade relativa do ar foi mantida elevada devido às regas nas paredes, no chão e no telhado do barracão e quando necessário as pequenas aberturas existentes nas paredes foram fechadas para manter a temperatura entre 25 °C e 30 °C e umidade acima de 60%.

3.2.9. Colheita

Os basidiomas foram colhidos quando o píleo apresentou abertura em torno de 80 %, que ocorreu entre o quinto e o sétimo dia após cada choque de indução. Porém, no oitavo dia todos foram colhidos, mesmo os que não alcançaram abertura do píleo de 80 %.

Depois de colhidos todos os basidiomas, os toros foram novamente empilhados e submetidos à irrigação diária até o próximo choque de indução.

3.2.10. Parâmetros avaliados

3.2.10.1. Levantamento da porcentagem de orifícios sem o crescimento do shiitake (inóculo inativo)

Após o período de incubação, fez-se o levantamento da porcentagem de orifícios com inóculo inativo, sob a parafina, em cada toro, para posteriormente realizar a análise de correlação entre estes dados e a produção, já que este aspecto é um indicativo da morte do inóculo.

3.2.10.2. Ocorrência natural de contaminações fúngicas

Durante a incubação, os toros foram removidos das pilhas mensalmente, um a um, para fazer o levantamento da porcentagem de toros contaminados, atribuindo valor 1 quando constatado colônias, esporulações ou corpos de frutificação de fungos contaminantes nos toros, e valor 0 quando não constatado. Ao final deste período, além deste levantamento, fez-se também a identificação de alguns destes fungos e analisou-se a área ocupada pelos mesmos, levando-se em consideração apenas a superfície da casca. Este mesmo procedimento foi repetido por mais duas vezes, antecedendo o segundo e terceiro choque de indução.

A porcentagem da área contaminada por um ou mais contaminantes foi determinada com auxílio de um paquímetro para medir o diâmetro dos toros; um elástico, que dividia imaginariamente cada toro em duas faces no sentido longitudinal, e uma régua graduada em milímetros.

Ainda para facilitar a localização das colônias fúngicas, cada face do toro foi subdividida em cinco setores de 20 cm. Cada setor foi analisado individualmente, levantando-se os fungos encontrados e anotando o diâmetro médio (d) de ocupação destes no toro, para posteriormente calcular a área (A) ocupada por cada fungo contaminante por meio da fórmula: $A = \pi/4 \cdot d^2$.

Após cada choque de indução, fez-se a análise de correlação entre as variáveis de produção em função da área contaminada por fungos.

3.2.10.3. Número de basidiomas por toro (NB/T)

Após cada colheita, quantificou-se o número de basidiomas por toro, feito a partir de simples contagem. Ao final do ciclo produtivo (após as três colheitas), obteve-se o número médio de basidiomas.

3.2.10.4. Diâmetro do píleo (DP)

Em todos os basidiomas produzidos, foram medidos seu diâmetro do píleo, com o auxílio de um paquímetro.

3.2.10.5. Massa média de basidiomas frescos (MBF)

Depois de contados e medidos, os basidiomas foram pesados com o auxílio de uma balança eletrônica para 600 g ($\pm 1g$).

3.2.10.6. Massa média de basidiomas secos (MBS)

Uma vez pesados, os basidiomas foram secos em uma estufa de circulação forçada a 50 °C até massa constante.

3.2.10.7. Produtividade (P)

A produtividade foi obtida a partir dos dados de produção em gramas de cogumelo seco por gramas de toro seco, conforme a fórmula: $P (\%) = (MBS / MTS) \times 100$. A densidade da madeira considerada foi de $0,541 \text{ cm}^{-3}$, cujo cálculo foi feito de acordo com a metodologia proposta por BRASIL (1983).

3.2.10.8. Eficiência biológica (EB)

A porcentagem da eficiência biológica foi calculada pela fórmula: $EB = (MBF / MTS) \times 100$.

3.2.10. 9. Resíduo de benomyl

A análise do resíduo de benomyl nos basidiomas foi feita no Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP, Campus de Araraquara – SP, por cromatografia a líquido de alta eficiência, empregando coluna de fase reversa, fase móvel composta de metanol: solução aquosa 1 % de fosfato ácido de potássio (65:35) e detecção e quantificação na faixa ultra violeta visível a 286 nm (NAVICKIENE & RIBEIRO, 2000).

3.2.11. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos (testemunha, cal e benomyl) e 60 repetições por tratamento, sendo

que a unidade experimental foi um toro. Após análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento *in vitro*

A procura de fungicidas seletivos para o controle de fungos contaminantes no cultivo de cogumelos é cercado de muitos cuidados, uma vez que ambos pertencem ao mesmo grupo de microrganismos, os fungos. Além disso, os cogumelos comestíveis devem ser isentos de resíduos quando tratados com fungicidas para não causar problema na alimentação e não alterar sua qualidade.

Vários experimentos já foram realizados na procura desses fungicidas de ação seletiva no controle de doenças que afetam o desenvolvimento do cogumelo. A grande maioria desses trabalhos estão relacionados com *Ágaricus bisporus* (CHALLENGE & ELLIOTT, 1985; FLETCHER et al., 1983; SAMUELS & JOHNSTON, 1980; EIKER, 1987; COUTINHO et al., 1996), sendo raros os trabalhos envolvendo *Lentinula edodes* (QUEIROZ, 2000).

Os resultados obtidos no presente experimento demonstraram que a exposição das cinco linhagens de *Lentinula edodes* a benomyl evidenciaram efeitos de concentrações e/ou de linhagem nos tratamentos. As concentrações de benomyl em que as linhagens JAB-K, LE-95/01, JAB-L e LE-96/22 foram submetidas exerceu influência significativa no crescimento micelial das mesmas, ou seja, houve uma redução progressiva no crescimento do shiitake à medida que as concentrações de benomyl foram aumentando, resultando em decréscimo quadrático para as linhagens JAB-K ($Y=47,7203-0,0027x-0,0184x^2$), LE-95/01 ($Y=55,3716-1,3888x+0,0571x^2$) e LE-96/22 ($Y=66,6870-0,1152x-0,0230x^2$) e linear

para a linhagem JAB-L ($Y=55,3807-0,6982x$) (figuras 1, 2, 3 e 4, respectivamente). Já a linhagem LE-96/17 não sofreu influência significativa de nenhuma das concentrações testadas.

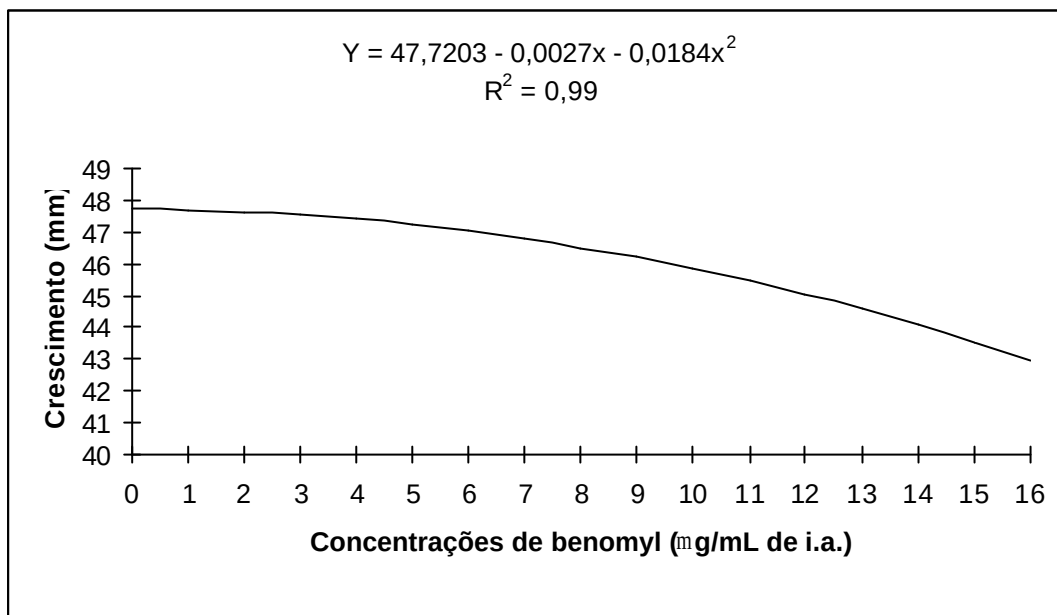


Figura 1. Efeito do fungicida benomyl no crescimento micelial da linhagem JAB-K de *Lentinula edodes*, *in vitro*.

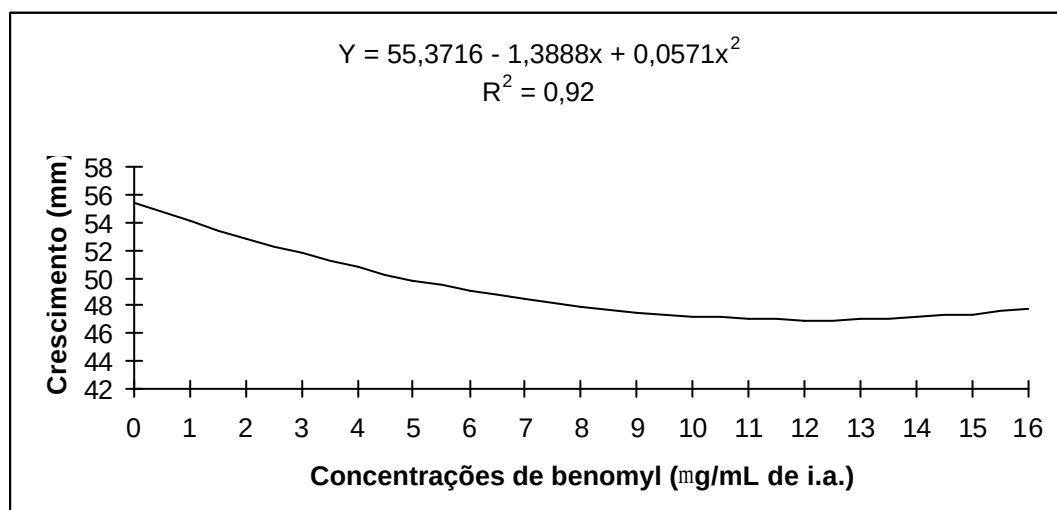


Figura 2. Efeito do fungicida benomyl no crescimento micelial da linhagem LE-95/01 de *Lentinula edodes*, *in vitro*.

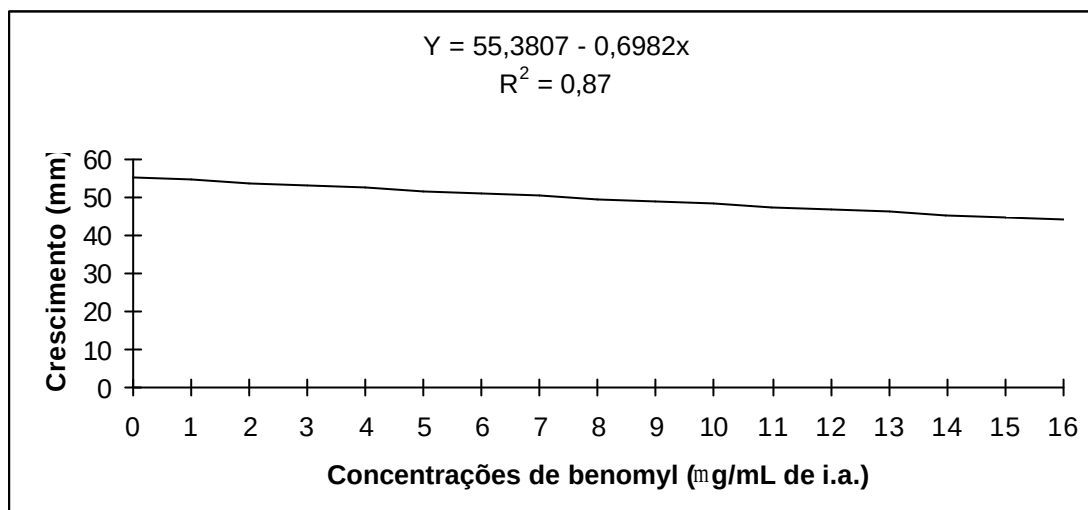


Figura 3. Efeito do fungicida benomyl no crescimento micelial da linhagem JAB-L de *Lentinula edodes*, *in vitro*.

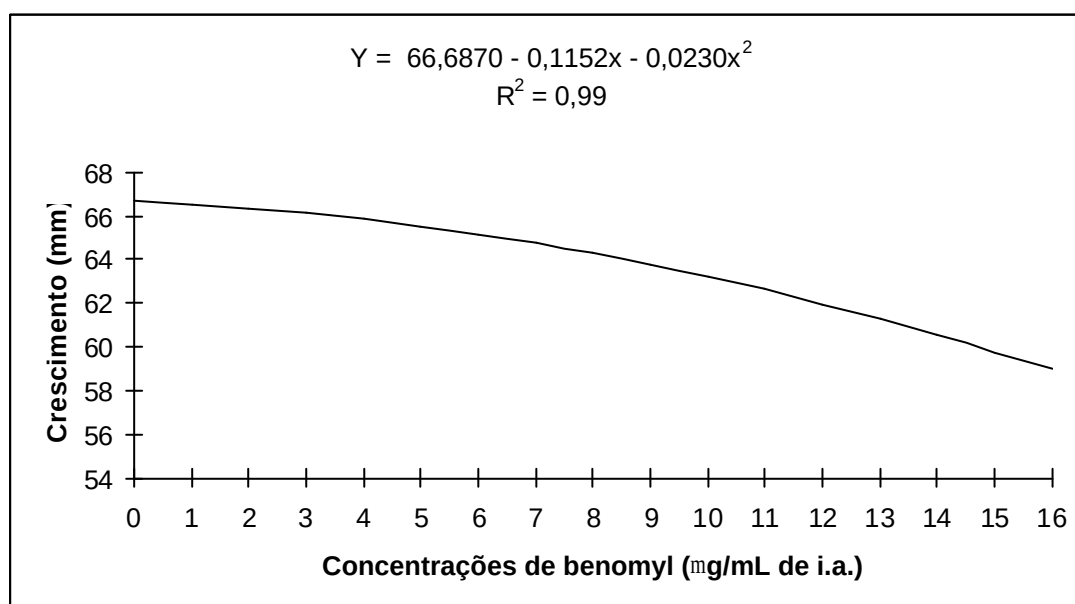


Figura 4. Efeito do fungicida benomyl no crescimento micelial da linhagem LE-96/22 de *Lentinula edodes*, *in vitro*.

Recentemente, *in vitro*, foi testado o efeito do benomyl no crescimento micelial do shiitake e de vários fungos contaminantes isolados do cultivo tradicional em toros (QUEIROZ, 2000). Os resultados mostraram uma baixa sensibilidade de *L. edodes* (JAB-K) ao benomyl, mesmo em altas concentrações (100 µg/mL). No presente trabalho a única linhagem a não sofrer qualquer efeito das concentrações de benomyl foi a LE-96/17. No entanto, a influência do benomyl nas demais linhagens, pode ser considerada baixa, estando de acordo com os resultados obtidos por QUEIROZ (2000), evidenciando um comportamento semelhante entre todas as linhagens, mesmo apresentando pouca similaridade genética entre elas (TEIXEIRA, 2000).

Comparando as médias de crescimento das linhagens dentro de cada concentração de benomyl (tabela 1), observou-se que a linhagem LE-96/22 foi a que apresentou o maior crescimento micelial em todas concentrações testadas. Entretanto, a mesma sofreu efeitos significativos das concentrações (figura 4).

Tabela 1. Efeito *in vitro* das diferentes concentrações do fungicida benomyl no crescimento micelial (mm) de cinco linhagens de *Lentinula edodes*, em meio batata-dextrose-água, após oito dias de desenvolvimento, a 25 °C*.

Concentrações (µg/mL de i.a.)	Linhagens				
	JAB-K	LE-95-01	JAB-L	LE-96/17	LE-96/22
Testemunha	47,7 c	55,0 b	55,7 b	46,3 c	66,7 a
0,5	47,7 c	55,0 b	54,3 b	46,3 c	66,7 a
1,0	47,7 c	54,0 b	53,7 b	46,3 c	66,3 a
2,0	47,7 c	54,0 b	53,3 b	45,2 c	66,3 a
4,0	47,7 c	49,0 c	53,0 b	45,7 c	66,3 a
8,0	46,4 c	48,7 c	53,0 b	45,7 c	64,0 a
16,0	43,0 c	47,7 b	42,7 c	45,7 bc	59,0 a

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05), sendo letras minúsculas nas linhas.

Como o propósito do experimento I era selecionar a linhagem mais tolerante ao benomyl, descartou-se a possibilidade de utilização da linhagem LE-96/22 e optou-se por utilizar a LE-96/17 no experimento II com a maior concentração (16 µg/mL), pois foi a única linhagem a não sofrer influência significativa das concentrações de benomyl, embora esta, juntamente com a JAB-K, tenham apresentado os menores desempenhos de crescimento dentro de todas as concentrações testadas (tabela 1). No entanto, este desempenho pode ser considerado normal já que em outros experimentos (MONTINI, 2001; TEIXEIRA, 2000) o crescimento micelial foi semelhante aos aqui observados.

A linhagem LE-96/17 quando cultivada em toros de eucalipto, mostrou-se precoce e com boa produtividade (TEIXEIRA, 2000). Considerando ainda que este trabalho é parte de um Projeto Temático (FAPESP, processo nº. 98/07726-5) envolvendo cogumelos comestíveis e medicinais, a utilização da linhagem LE-96/17 vem de encontro com as necessidades da equipe, onde toda a produção deverá ser utilizada para dar continuidade a outros projetos, já que foi a única entre várias linhagens testadas a apresentar atividades antimutagênicas (LIMA et al., 2001).

4.2. Experimento em toros

Sabe-se que o período de incubação tem influência direta na produção e que produções satisfatórias só são obtidas em toros bem colonizados pelo shiitake durante este período. Quanto mais rápida for a colonização pelo shiitake, menor a chance de ocorrer contaminação dos toros (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). No Brasil, o período de incubação para a maioria das linhagens testadas tem sido de seis meses (PAULA, 2000; TEIXEIRA, 2000; SANT ANNA, 1998; MONTINI, 1997). No presente experimento, o shiitake apresentou um bom desenvolvimento no interior dos toros desde a fase inicial deste período. Logo após dois meses de incubação observou-se em todos os tratamentos uma descoloração da casca na região ao redor de alguns orifícios (figura 5A). Esta região mostrou-se mole quando pressionada pelos dedos e a cor do inóculo visto sob a parafina era branca, o que segundo vários autores (CAMPBELL & RACJAN, 1999; EIRA & MONTINI, 1997; PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990) é um indicativo da boa

colonização do shiitake (inóculo ativo). Por outro lado, outros orifícios estavam escuros e com aspecto farináceo e seco, evidenciando que o micélio do shiitake inoculado havia morrido (inóculo inativo) (figura 5B). Este fato foi confirmado com a retirada do inóculo de alguns destes orifícios, que após serem transferidos para meio BDA, seguido da incubação a 25 °C no escuro, verificou-se que não houve qualquer desenvolvimento micelial do shiitake. Ao invés disso, observou-se crescimento de outros fungos, sendo os mais freqüentes o *Aspergillus* spp., muito comumente encontrado no substrato de produção (LIAO, 1993), e o *Trichoderma* spp., cuja ocorrência é comum tanto no cultivo axênico como no cultivo em toros, devido sua rápida adaptação às condições adversas do ambiente (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).



Figura 5. Aspecto superficial dos orifícios inoculados com shiitake em toros de eucalipto. **A.** inóculo ativo, com descoloração na região ao redor do orifício, indicando boa colonização. **B.** inóculo inativo, sem descoloração ao redor do orifício, indicando morte do inóculo.

A porcentagem de orifícios com crescimento do shiitake (inóculo ativo) e sem o crescimento (inóculo inativo) estimados antes do primeiro choque de indução (seis meses após a inoculação) em todos os tratamentos encontram-se na figura 6. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que os tratamentos cal e benomyl tiveram médias de orifícios com inóculo inativo semelhantes, 33,5 e 35,1 %, respectivamente, e que no tratamento testemunha esta média foi um pouco inferior (26,5 %).

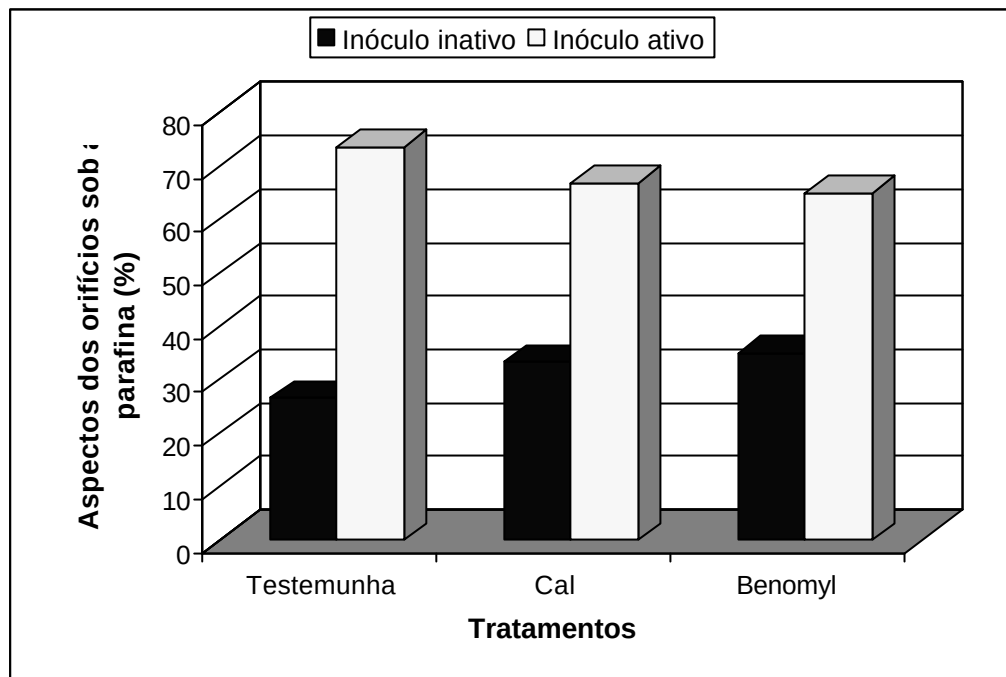


Figura 6. Porcentagem média de orifícios sem crescimento do shiitake (inóculo inativo) e com crescimento do shiitake (inóculo ativo) em cada tratamento, seis meses após a inoculação.

Considerando que cada toro utilizado neste experimento continha em média 48 orifícios, o número médio de orifícios com inóculo inativo nos tratamentos testemunha, cal e benomyl foram respectivamente 13, 16 e 17. Esses números podem ser considerados altos uma vez que todos os cuidados com assepsia foram tomados durante a inoculação.

Ao final do ciclo de produção (após as três colheitas do shiitake), foi feita a correlação entre o número de orifícios com inóculo inativo e as variáveis de produção, verificando-se que em todos os tratamentos houve correlação negativa entre ambos (tabela 2).

Tabela 2. Correlação das variáveis de produção das três colheitas do shiitake: produtividade (P), eficiência biológica (EB), massa de basidiomas frescos (MBF), massa de basidiomas secos (MBS) e número de basidiomas por toro (NB/T), em função do número de orifícios com inóculo inativo (II), nos tratamentos testemunha, cal e benomyl.

Variável	Variável	Testemunha	Cal	Benomyl
II	P	-0.6040**	-0.3672**	-0.5241**
II	EB	-0.6351**	-0.4203**	-0.5574**
II	MBF	-0.6723**	-0.4355**	-0.5897**
II	MBS	-0.6613**	-0.3560**	-0.5530**
II	NB/T	-0.6065**	-0.3777**	-0.5949**

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Os resultados indicam que a produção do shiitake é prejudicada à medida que aumenta o número de orifícios com inóculo inativo, independente do tratamento (tabela 2). Estes dados estão de acordo com EIRA & MONTINI (1997), PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE (1990), que associam o bom desenvolvimento do shiitake quando os orifícios dos toros estão com aspecto cottonoso e coloração branca.

Entre o terceiro e o quarto mês de incubação surgiram espontaneamente os primeiros primórdios de cogumelos, evidenciando o bom desenvolvimento da linhagem LE-96/17 nas condições em que foi realizado o presente trabalho. A precocidade desta linhagem (LE-96/17) já foi relatada por TEIXEIRA (2000), utilizando a mesma espécie de eucalipto (*Eucalyptus urophylla*). No total foram colhidos, num período de 30 dias, no tratamento testemunha: 179 basidiomas, o que correspondeu a 2124,64 g de massa de basidioma fresco e 329,38 g de massa de basidioma seco; no tratamento cal: 87 basidiomas, o que correspondeu a 1111,48 g de massa de basidioma fresco e 176,16 g de massa de basidioma seco; e no tratamento benomyl: 73 basidiomas, o que correspondeu a 1078,12 g de massa de basidioma fresco e 181,27 g de massa de basidioma seco.

Os basidiomas de cada toro, depois de analisados, foram acondicionados em sacos de polietileno e juntados aos demais após o primeiro choque de indução. A partir do surgimento espontâneo dos primeiros primórdios a quantidade de água aplicada nos toros foi reduzida em aproximadamente 1/3, a fim de evitar o aparecimento de novos primórdios antes da primeira indução artificial, que ocorreu após seis meses de incubação.

Durante o cultivo de shiitake em toros, por ser um sistema não asséptico, é comum a presença de outros organismos que podem influenciar em seu desenvolvimento nos toros e conseqüentemente na produtividade de cogumelos. Além das bactérias, lesmas, caramujos e moscas, existem aproximadamente 150 espécies de fungos que podem prejudicar a produção (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). No Brasil foi relatado que *Hypoxylon* spp., *Poria* spp., *Trichoderma* spp. e *Stemonitis* spp. quando em grande quantidade nos toros, comprometem totalmente a produção (ANDRADE, 1999). No presente experimento foram observadas apenas contaminações por fungos. As primeiras contaminações na superfície dos toros foram observadas na testemunha, aos 60 dias após a inoculação do shiitake. Dos 60 toros inoculados 13 (22%) estavam contaminados. Aos 90 dias, os demais tratamentos também apresentavam contaminações, sendo que o tratamento com cal apresentou 8 toros contaminados (13 %) enquanto que o tratamento com benomyl apresentou 3 toros (5 %).

A aplicação de benomyl (16 µg/mL), a cada 15 dias, durante todo o ciclo de produção (10 meses) ou um banho de cal, no início do experimento e logo após cada choque de indução, num total de três banhos de cal, não foram suficientes para eliminar os fungos contaminantes presentes na superfície dos toros. No entanto, nesses tratamentos, o número de toros contaminado sempre foi inferior quando comparado com os toros não tratados (figura 7). Estes dados estão de acordo com ANDRADE (1999) que trabalhando com toros de eucalipto inoculados com shiitake e não protegidos por cal hidratada observou que estes apresentaram mais sinais do desenvolvimento externo de contaminantes que as parcelas protegidas pela cal hidratada.

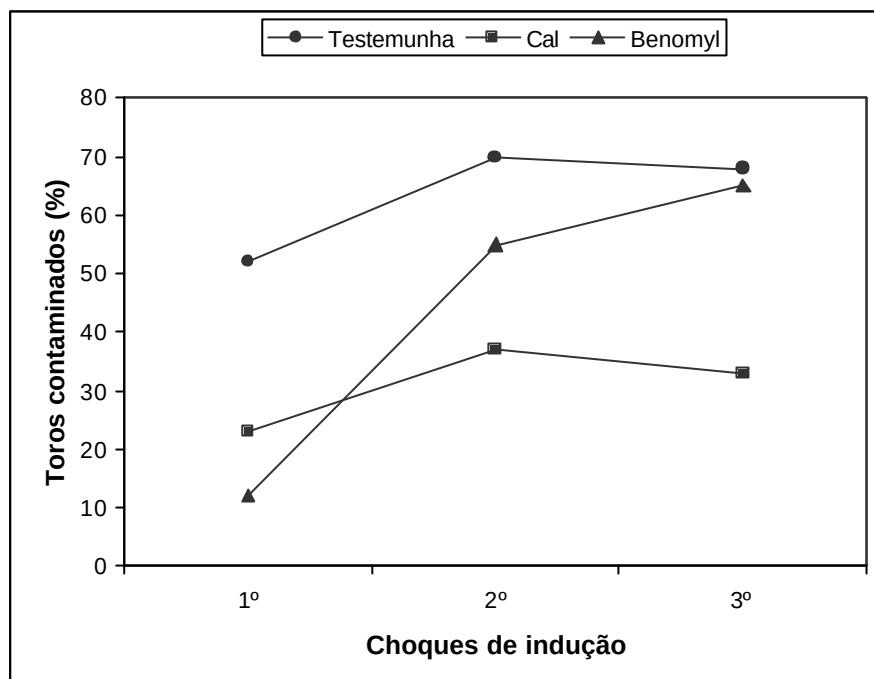


Figura 7. Porcentagem de toros contaminados em cada tratamento antes de cada choque de indução.

Aos seis meses de incubação, antes do primeiro choque de indução, o menor número de toros contaminados foi observado no tratamento benomyl. Dos 60 toros inoculados, apenas 7 toros (12 %) estavam contaminados. Nos toros com cal hidratada 14 toros (23 %) estavam contaminados enquanto que, na testemunha, a presença de pelo menos um fungo contaminante foi verificada em 31 toros (52 %) (figura 7).

Os resultados obtidos mostram que tanto o benomyl como a cal hidratada, nas condições em que foi realizado o presente trabalho, foram eficientes no controle de fungos contaminantes. No entanto, antes do segundo choque de indução, ou seja, 60 dias após a primeira avaliação, houve um aumento do número de toros contaminados em todos os tratamentos. O total de toros contaminados observados na testemunha, cal e benomyl foram 42 (70 %), 22 (37 %) e 33 (55 %), respectivamente (figura 7). Vários são os fatores que podem ter contribuído para este aumento, entre estes a alta umidade dos toros, após o primeiro choque de indução (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). Além disso, a manipulação dos toros, principalmente após doze horas submersos na água, deixa a casca muito

frágil e qualquer orifício ou rachadura pode tornar-se uma entrada para os fungos contaminantes. Outro fator importante seria o baixo nível de nutrientes no toro que vão se esgotando durante a produção, causando o enfraquecimento do micélio do shiitake, ficando mais suscetível às contaminações (EIRA & MINHONI, 1996; PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).

Na terceira e última avaliação realizada antes do terceiro choque de indução, observou-se uma tendência da estabilização no número de toros contaminados nos tratamentos testemunha e cal, enquanto que no tratamento com benomyl ocorreu aumento de 10 %, sendo no total observado 39 toros contaminados (65 %). Esse aumento observado nos toros tratados com benomyl praticamente igualou aos toros contaminados do tratamento testemunha (figura 7). Assim, levando em conta o período total de produção de dez meses, observa-se um controle mais eficiente dos fungos contaminantes nos toros tratados com a cal hidratada. A cal deixa a superfície dos toros brancos, dificultando a avaliação, mas todo o cuidado foi tomado para não subestimar as contaminações.

Muitos fungos contaminantes causam prejuízos na produção de shiitake (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). No Brasil, são raros os trabalhos que identificam esses fungos e seus efeitos na produção. Recentemente, foi relatado em toros de eucalipto a presença dos seguintes fungos: *Hypoxylon* spp., *Poria* spp., *Trichoderma* spp., *Stemonitis* spp. e *Pycnillorus* spp. (ANDRADE, 1999). Desses fungos, somente o *Trichoderma* spp. e o *Poria* spp. foram encontrados no presente experimento (figuras 8 e 9) e os demais fungos presentes não identificados (figuras 10 e 11), pelos aspectos das colônias nos toros, são diferentes daqueles encontrados por ANDRADE (1999). A presença do *Trichoderma* spp. é muito comum, pois algumas espécies são adaptadas a uma grande variedade de condições ambientais (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990; URBEN et al, 2001; ROLLAN, 1998). Sendo assim, as condições de alta umidade dos toros após cada choque de indução, seguido de uma redução de umidade no intervalo de cada choque, não é um fator limitante para este gênero de fungos.



Figura 8. Aspecto do crescimento de *Trichoderma* spp. em toros de eucalipto.



Figura 9. Aspecto do crescimento de *Poria* spp. em toros de eucalipto.



Figura 10. Aspecto do crescimento do fungo não identificado (A).



Figura 11. Aspecto do crescimento fungo não identificado (B).

Em relação à porcentagem média de área contaminada por fungos de ocorrência natural em cada tratamento realizado antes de cada choque de indução, verificou-se que os tratamentos com cal e benomyl foram eficientes no controle destes fungos. Enquanto que para o tratamento testemunha as médias de área contaminada ao longo do ciclo de produção foram 3,1, 5,9 e 14,4 % , para o tratamento cal hidratada foram 0,7, 0,0 e 0,1 % , e para o tratamento benomyl foram 0,5, 0,0 e 0,1 % (figura 12). Resultados semelhantes foram obtidos por ANDRADE (1999) trabalhando com a cal hidratada, o qual verificou um menor índice de contaminação nos toros tratados com a cal hidratada quando comparado aos toros não tratados.

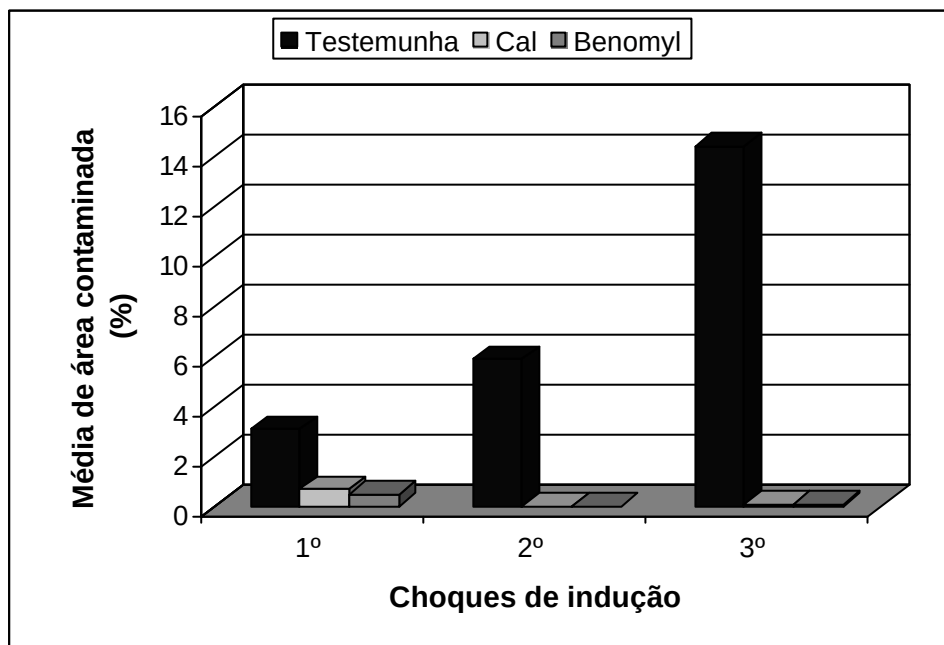


Figura 12. Porcentagem de área contaminada por fungos de ocorrência natural em cada tratamento, realizado antes de cada choque de indução. Dados médios de 60 repetições por tratamento.

Analisando as médias de área contaminada por cada fungo, pode-se dizer que foram muito baixas (figuras 13, 14 e 15). Possivelmente este fato tenha ocorrido devido ao rápido desenvolvimento do shiitake nos toros, o que segundo PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE (1990), faz com que os fungos contaminantes

fiquem restritos a pequenas áreas. Antes do primeiro choque de indução, observou-se no tratamento testemunha, as maiores médias de área contaminada pelos fungos contaminantes: 1,18 % pelo *Trichoderma* spp., 1,13 % pelo contaminante A e 0,76 % pelo contaminante B. *Poria* spp. não foi observado (figura 13). No tratamento cal estas médias foram respectivamente 0,01 % de *Trichoderma* spp., 0,03 % de contaminante A e 0,67 % de contaminante B, o *Poria* spp. também neste tratamento não foi observado. Já no tratamento benomyl *Trichoderma* spp., *Poria* spp. e contaminante B tiveram média de área contaminada de 0,24, 0,11 e 0,15 %, respectivamente, enquanto que o contaminante A não foi observado (figura 13).

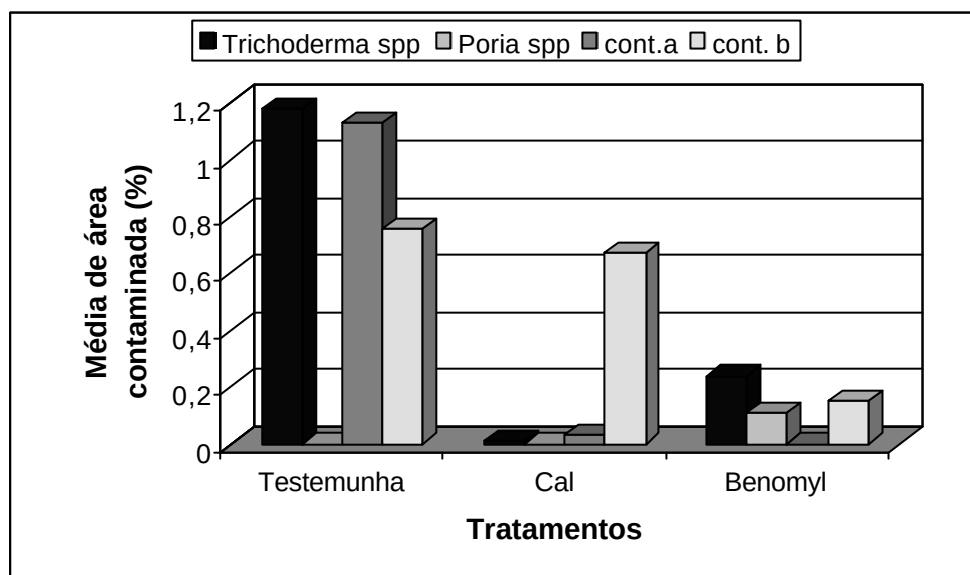


Figura 13. Porcentagem de área contaminada por fungos de ocorrência natural realizado antes do primeiro choque de indução. Dados médios de 60 repetições por tratamento.

Na segunda análise, feita antes do segundo choque de indução, observou-se no tratamento testemunha o *Poria* spp. pela primeira vez com média de área de 0,75 % enquanto que os contaminantes A e B tiveram um aumento de ocupação de área nos toros de 1,31 e 1,09 % respectivamente; já o *Trichoderma* spp. sofreu pequena redução de 0,35 %. Nos tratamentos cal e benomyl estas médias foram nulas ou quase nulas (figura 14).

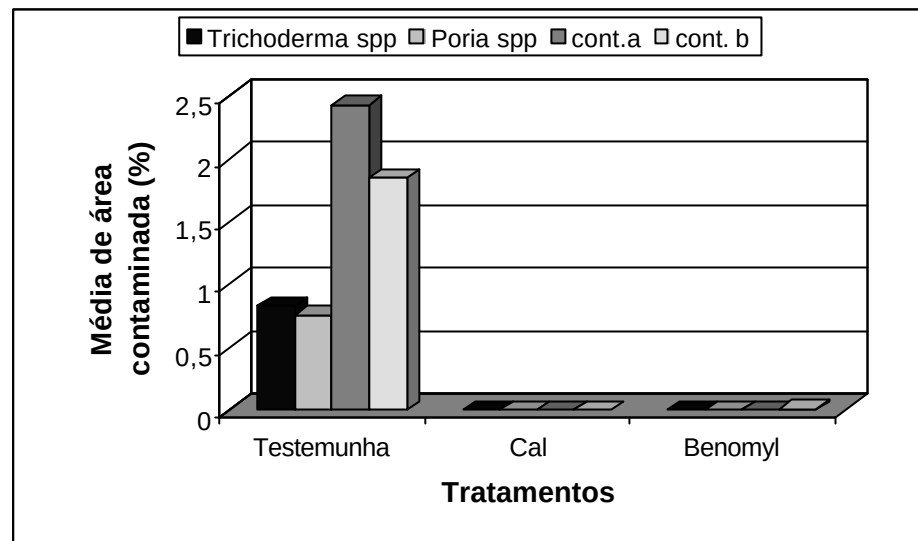


Figura 14. Porcentagem de área contaminada por fungos de ocorrência natural realizado antes do segundo choque de indução. Dados médios de 60 repetições por tratamento.

Finalmente, na terceira e última análise, as médias de área contaminada na testemunha por *Trichoderma* spp., *Poria* spp. e contaminante A na testemunha tiveram aumento de 0,67, 5,83 e 3,34 %, o que possivelmente tenha ocorrido devido ao excesso de umidade nos toros que ocorre após cada choque de indução, e o contaminante B uma redução para 1,35 %. Nos tratamentos cal e benomyl estas médias se mantiveram praticamente nulas (figura 15).

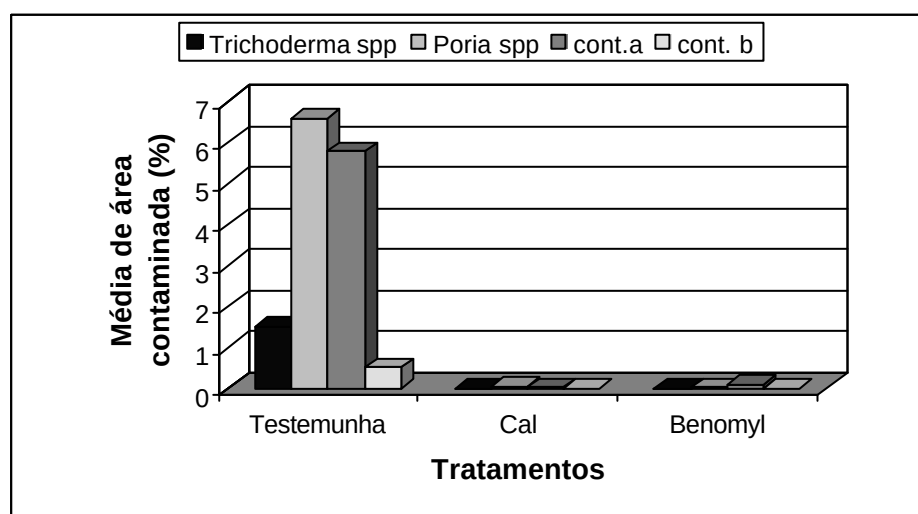


Figura 15. Porcentagem média de área contaminada por fungos de ocorrência natural realizado antes do terceiro choque de indução. Dados médios de 60 repetições por tratamento.

Após cada choque de indução, fez-se a análise de correlação entre as variáveis de produção em função da área contaminada por fungos (tabelas 3, 4 e 5). A intenção desta verificação é saber se há ou não influência dos fungos contaminantes na produção e, em caso afirmativo, quais as variáveis de produção suscetíveis, e em qual etapa da produção isto está ocorrendo. Na primeira análise, verificou-se que nos tratamentos testemunha e benomyl não houve correlação entre as variáveis de produção e a área contaminada por fungos. Já no tratamento cal, as variáveis P, EB, MBF e MBS correlacionaram-se negativamente com a área contaminada por fungos, com exceção do NB/T (tabela 3). Dois meses depois, fez-se a segunda análise de correlação nos tratamentos. Foi verificado que as variáveis de produção nos tratamentos cal e benomyl não tiveram correlação com a área contaminada por fungos. Por outro lado, no tratamento testemunha, todas as variáveis de produção correlacionaram-se com a área contaminada por fungos (tabela 4). Na terceira análise, observou-se que em todos os tratamentos não houve correlação entre as variáveis de produção e a área contaminada por fungos (tabela 5).

Tabela 3. Correlação das variáveis de produção da primeira colheita do shiitake: produtividade (P), eficiência biológica (EB), massa de basidiomas frescos (MBF), massa de basidiomas secos (MBS), e número de basidiomas por toro (NB/T), em função da área contaminada (AC), nos tratamentos testemunha, cal e benomyl.

Variável	Variável	Testemunha	Cal	Benomyl
AC	P	-0.1243 ^{NS}	-0.2386*	0.0949 ^{NS}
AC	EB	-0.1481 ^{NS}	-0.2416*	0.1286 ^{NS}
AC	MBF	-0.1179 ^{NS}	-0.2290*	0.2024 ^{NS}
AC	MBS	-0.0864 ^{NS}	-0.2277*	0.1581 ^{NS}
AC	NB/T	-0.1139 ^{NS}	-0.1949 ^{NS}	0.1856 ^{NS}

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade.

^{NS} Não significativo.

Tabela 4. Correlação das variáveis de produção da segunda colheita do shiitake: produtividade (P), eficiência biológica (EB), massa de basidiomas frescos (MBF), massa de basidiomas secos (MBS) e número de basidiomas por toro (NB/T), em função da área contaminada (AC), nos tratamentos testemunha, cal e benomyl.

Variável	Variável	Testemunha	Cal	Benomyl
AC	P	-0.3180 ^{**}	-0.2013 ^{NS}	-0.1203 ^{NS}
AC	EB	-0.3190 ^{**}	-0.1870 ^{NS}	-0.1249 ^{NS}
AC	MBF	-0.3205 ^{**}	-0.1781 ^{NS}	-0.1165 ^{NS}
AC	MBS	-0.3196 ^{**}	-0.1987 ^{NS}	-0.1120 ^{NS}
AC	NB/T	-0.3504 ^{**}	-0.1371 ^{NS}	-0.1243 ^{NS}

^{**}Significativo ao nível de 1 % de probabilidade.

^{NS}Não significativo.

Tabela 5. Correlação das variáveis de produção da terceira colheita do shiitake: produtividade (P), eficiência biológica (EB), massa de basidiomas frescos (MBF), massa de basidiomas secos (MBS) e número de basidiomas por toro (NB/T), em função da área contaminada (AC), nos tratamentos testemunha, cal e benomyl.

Variável	Variável	Testemunha	Cal	Benomyl
AC	P	-0.1352 ^{NS}	-0.1596 ^{NS}	0.0325 ^{NS}
AC	EB	-0.1279 ^{NS}	-0.1591 ^{NS}	0.0343 ^{NS}
AC	MBF	-0.0853 ^{NS}	-0.1591 ^{NS}	0.0959 ^{NS}
AC	MBS	-0.0965 ^{NS}	-0.1600 ^{NS}	0.0950 ^{NS}
AC	NB/T	-0.1077 ^{NS}	-0.1487 ^{NS}	0.0929 ^{NS}

^{NS}Não significativo.

Analisando de forma geral os dados de correlação, pode-se dizer que no tratamento benomyl a área contaminada pelos fungos contaminantes não teve qualquer influência na produção do shiitake (tabelas 3, 4 e 5). No entanto, o diâmetro do píleo (DP), a produtividade (P) e a eficiência biológica (EB) neste tratamento foram significativamente inferiores aos demais (tabela 6). Como as condições climáticas, a quantidade de água aplicada, a linhagem e o substrato foram semelhantes em todos os tratamentos, possivelmente isto tenha ocorrido devido ao efeito do fungicida benomyl no desenvolvimento do shiitake.

Tabela 6. Valores totais médios do número de basidiomas por toro (NB/T); do diâmetro do píleo (DP); da massa de basidiomas frescos (MBF); e secos (MBS); da produtividade (P) e eficiência biológica (EB), nos três choques de indução*.

Tratamento	NB/T	DP (cm)	MBF (g)	MBS (g)	P (%)	EB (%)
Testemunha	24a	4,61a	233,27a	33,53a	0,82a	5,66a
Cal	23a	4,30 b	202,37a	31,89a	0,71a	4,60a
Benomyl	18a	3,57 c	170,16a	23,24a	0,51 b	3,69 b

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

No tratamento cal foi relatada influência da área contaminada por fungos nas variáveis de produção da primeira colheita do shiitake, com exceção do número e basidiomas por toro (NB/T) (tabela 3). Como consequência, verificou-se na análise total de produção, que o diâmetro do píleo (DP) dos basidiomas deste tratamento foi inferior ao da testemunha (tabela 6). É possível que a cal hidratada também tenha prejudicado a qualidade dos basidiomas, mesmo não sendo considerado um agrotóxico, já que a influência dos contaminantes só foi significativa na primeira colheita do shiitake. Os toros de madeira utilizados no cultivo de shiitake caracterizam-se por relação C/N/P alta (TEIXEIRA, 2000). Com a aplicação

superficial da cal nos toros ocorre alteração de pH, o que pode provocar mudanças na proporção destes nutrientes e conseqüentemente prejudicar seu desenvolvimento.

No tratamento testemunha, a área contaminada por fungos não influenciou na primeira e terceira colheita, apenas na segunda. Porém esta influência não refletiu nos dados finais de produção (tabela 6).

O número médio de basidiomas por toro (NB/T) em todos os tratamentos não diferiu estatisticamente entre si (tabela 6). No entanto, houve uma tendência desse número diminuir ao longo do ciclo de produção (figura 16). Possivelmente isto tenha ocorrido devido ao aumento do número de aborto de primórdios após cada choque de indução em todos os tratamentos, o que segundo EIRA & MONTINI (1997) é conseqüência da diminuição do nível de nutrientes do toro ao longo do ciclo de produção, o qual é indispensável à formação dos basidiomas.

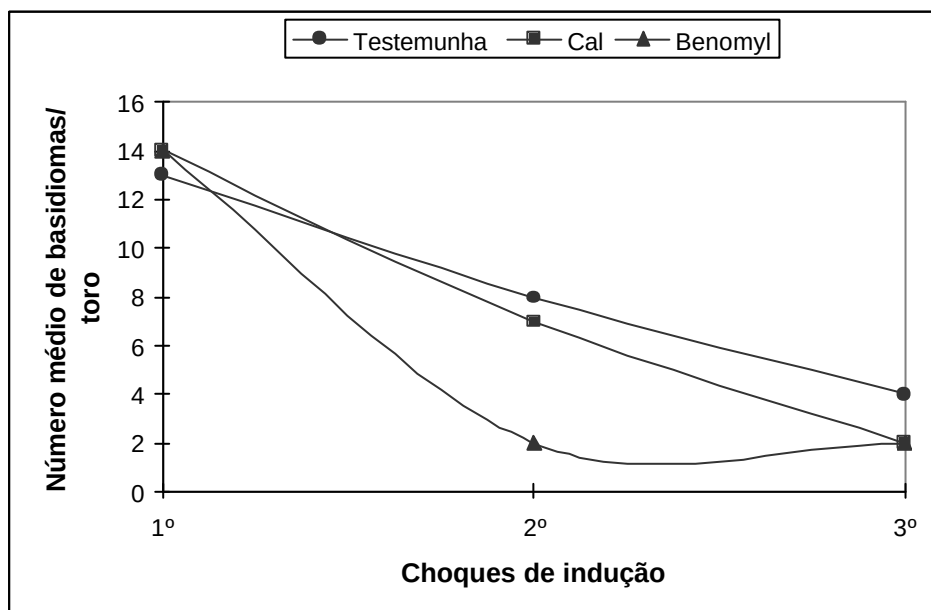


Figura 16. Número médio de basidiomas por toro em cada choque de indução nos tratamentos testemunha, cal e benomyl.

Em relação à qualidade dos basidiomas, avaliada através do diâmetro do píleo (DP), verificou-se diferenças significativas entre todos os tratamentos (tabela 6). Os basidiomas pertencentes ao tratamento testemunha obtiveram a maior média de diâmetro do píleo (4,61 cm), seguido pela cal (4,30 cm) e benomyl (3,57 cm) (tabela 2). Analisando estas médias por choque de indução, os tratamentos tiveram comportamento semelhante, ou seja, houve uma redução da média do diâmetro do píleo no segundo choque de indução seguido de aumento no terceiro (figura 17).

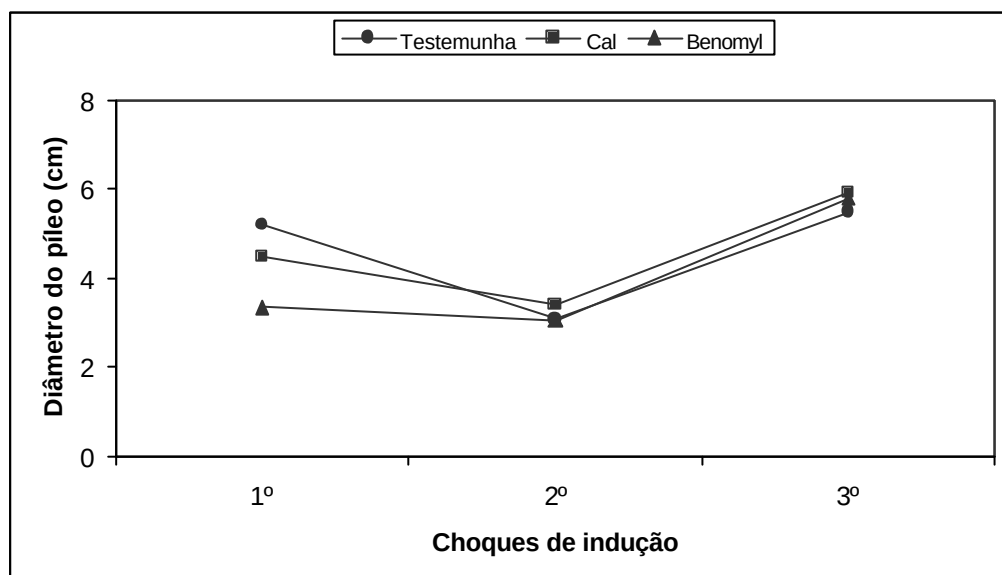


Figura 17. Diâmetro médio do píleo em cada choque de indução nos tratamentos testemunha, cal e benomyl.

O aumento do diâmetro do píleo, verificado no terceiro choque de indução (figura 17) pode ser consequência da diminuição do número de basidiomas (figura 16), fazendo com que a reserva de nutrientes acumulada pelo shiitake durante a incubação, passe a ser investida em um menor número de basidiomas (EIRA & MONTINI, 1997).

A porcentagem de basidiomas pequenos, médios e grandes, em cada tratamento, consta na figura 18. De acordo com estes resultados, observou-se que todos os tratamentos tiveram mais de 60 % do total de basidiomas com diâmetro

abaixo ou igual a 5 cm, ou seja pequenos, estando de acordo com TEIXEIRA (2000), que trabalhando com dez diferentes linhagens de shiitake relatou que a linhagem LE-96/17 apesar de estar entre as mais produtivas, foi a que apresentou maior quantidade de basidiomas do tipo I, com diâmetro inferior a 3 cm.

Entre os tratamentos, a testemunha apresentou a menor porcentagem de basidiomas pequenos (67,7%) e a maior porcentagem de basidiomas médios (24,7 %) e grandes (7,6 %). No tratamento cal estas médias foram respectivamente 72,8 % de basidiomas pequenos, 22,5 % de médios e 4,7 % de grandes. Já o tratamento benomyl obteve o maior número de basidiomas pequenos (83,0 %) e os menores números de basidiomas médios (12,9 %) e grandes (4,1 %) (figura 18). Estes dados demonstram que os tratamentos cal e benomyl tiveram efeito negativo no tamanho dos basidiomas quando comparado à testemunha, conforme já apresentado na tabela 6.

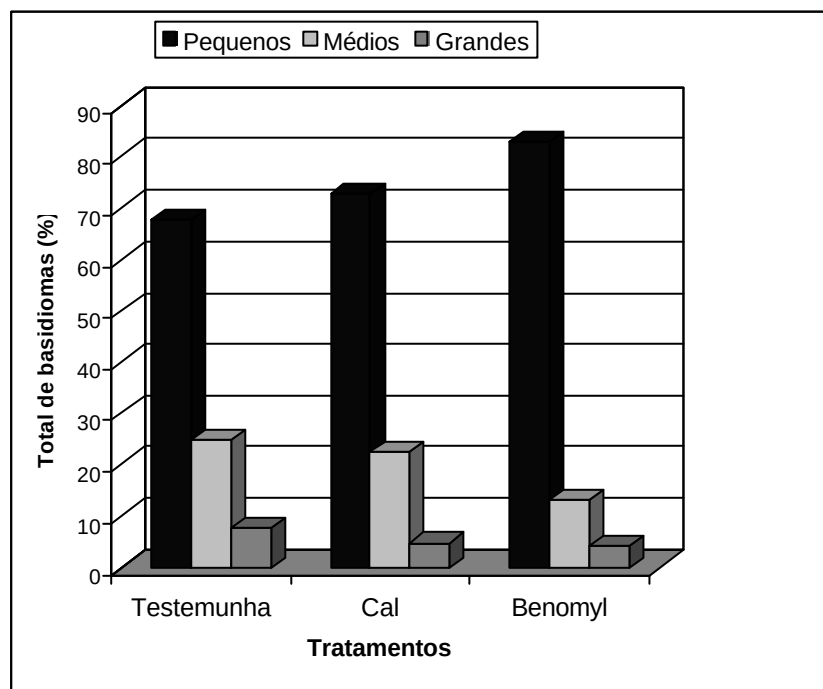


Figura 18. Porcentagem total de basidiomas pequenos ($\phi \leq 5$), médios ($5 < \phi \leq 7$) e grandes ($\phi > 7$) em cada tratamento nos três choques de indução.

A massa de basidiomas frescos (MBF) nos tratamentos testemunha, cal e benomyl foi, em gramas, respectivamente 233,27, 202,37 e 170,16 (tabela 6), não havendo diferenças significativas entre estes. O mesmo ocorreu com a massa de basidiomas secos (MBS), cujos valores foram, em gramas, 33,53, 31,89 e 23,24 (tabela 6).

A produção total de massa de basidiomas frescos é estimada por alguns autores (EIRA & MINHONI, 1996; BONONI et al., 1995; CHANG & MILES, 1989) em 15 a 20 % da massa inicial do toro, para diferentes espécies arbóreas. Em trabalhos mais recentes (PAULA, 2000; SANT ANNA, 1998; MONTINI, 1997) verificou-se que estas estimativas estão extrapoladas e não condizem com a realidade, já que os toros não apresentam uniformidade de produção. SANT´ANNA (1998), em três choques de indução, com o cultivo da linhagem CCB-48, obteve produção média de 729,7 g de basidiomas frescos por toro de *E. urophylla*, o que corresponde à produção de 7,08 % de massa de basidiomas frescos em relação à massa úmida inicial dos toros. PAULA (2000) com a linhagem Y602, em quatro choques de indução, obteve 167,83 g de basidiomas frescos por toro de *E. saligna*, o que corresponde a 2,2 % de massa de basidiomas frescos em relação à massa úmida inicial dos toros. No presente experimento obteve-se as seguintes porcentagens de massa de basidiomas frescos em relação à massa úmida inicial dos toros: 2,33 % no tratamento testemunha, 2,02 % no tratamento cal e 1,70 % no tratamento benomyl.

Na avaliação da produtividade observou-se que o tratamento cal (0,71 %) não diferiu da testemunha (0,82 %) (tabela 6). Resultados semelhantes foram obtidos por ANDRADE (1999), concluindo que apesar dos toros não protegidos por cal hidratada apresentarem mais sinais do desenvolvimento externo de contaminantes que os toros protegidos, não houve diferenças significativas de produtividade entre ambos os tratamentos. Já no tratamento benomyl (0,51 %), os toros foram significativamente menos produtivos que os tratamentos testemunha e cal (tabela 6). Provavelmente isto tenha ocorrido devido a uma inibição de crescimento provocada por este fungicida não apenas aos contaminantes (figura 10), mas também ao shiitake. De acordo com PICININI (1994), o benomyl controla os fungos por afetarem processos essenciais à sobrevivência e reprodução, entre os quais, o crescimento do micélio. Portanto, mesmo que o experimento *in vitro* tenha demonstrado que a linhagem LE-96/17 não sofreu qualquer influência do benomyl

em meio BDA nas concentrações testadas, é possível que nos toros, em um meio totalmente diferente daquele controlado em laboratório da primeira etapa, o shiitake tenha adquirido sensibilidade ao benomyl e conseqüentemente reduzido seu desenvolvimento nos toros. Prova disto é a qualidade dos basidiomas deste tratamento, cujo diâmetro médio foi inferior aos demais (tabela 6). BANO & RAJARATHANAM (1988) no cultivo do cogumelo *Pleurotus* spp., cita que em concentrações muito elevadas de benomyl (150 ppm), o cogumelo passa a apresentar anormalidades nos corpos de frutificação.

A variável eficiência biológica obteve comportamento semelhante à produtividade, com testemunha (5,66 %) e cal hidratada (4,60 %) não diferindo significativamente entre si, e com benomyl diferindo de ambos (3,69 %) (tabela 6). Estes resultados estão bem abaixo dos 20 % de eficiência biológica superestimada pela literatura (BONONI, 1995; EIRA & MONTINI, 1997). A diferença significativa do tratamento benomyl em relação aos demais (testemunha e cal) é possivelmente resultante da influência deste fungicida à cultura, refletida não apenas na eficiência biológica, mas também na produtividade e diâmetro do píleo (tabela 6), como já dito anteriormente.

Em relação à análise química do resíduo de benomyl nos basidiomas, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica (CLAE-UV), não foram observados resíduos de benomyl em nenhuma das amostras de basidiomas das três colheitas, devido principalmente à aplicação indireta do fungicida (nos toros) sempre antes do período de formação de primórdios. O benomyl quando aplicado diretamente nos basidiomas em doses elevadas, deixa resíduos acima do permitido pela legislação brasileira (GRACIOLLI et al., 2002).

5. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, nas condições e metodologia propostas para este trabalho, obteve-se as seguintes conclusões:

5.1. Experimento *in vitro*

- A linhagem de shiitake LE-96/17 foi a única entre todas as testadas neste experimento (JAB-K, LE-95/01, JAB-L e LE-96/22) que não sofreu qualquer influência do benomyl nas concentrações propostas (0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 e 16,0 µg/mL).

5.2. Experimento em toros

- Os principais fungos contaminantes identificados foram o *Trichoderma* spp. e o *Poria* spp.
- Quanto maior a quantidade de orifícios sem o crescimento do shiitake (inóculo inativo) menor a produtividade, eficiência biológica, massa de basidiomas frescos, massa de basidiomas secos e número de basidiomas por toro.

- O tratamento cal reduziu a porcentagem de área contaminada por fungos, porém não impediu totalmente sua influência na produção da primeira colheita do shiitake.
- O melhor controle de fungos contaminantes nos toros foi obtido com benomyl, porém a produtividade e a eficiência biológica neste tratamento foram inferiores aos demais.
- A qualidade dos cogumelos, expressa pelo diâmetro do píleo, foi menor nos tratamentos cal e benomyl, quando comparado ao da testemunha.
- Os basidiomas produzidos nos toros tratados com benomyl não apresentaram resíduos do fungicida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y. Effect of moisture on the colonization by *Lentinula edodes* and *Hypoxylum truncatum* in wood. **European Journal Of Forest Pathology**, Hamburg, v.19, p. 423-434, 1989.

AMARAL, J. F. A cultura de cogumelo. **Chácaras e Quintais**, São Paulo, v.102, p. 206-264, 1960.

ANDRADE, F. A. **Efeitos de fungos contaminantes na produção de shiitake (*Lentinula edodes* (Berk) Pegler) em toras de *Eucalyptus saligna* Sm.** Botucatu, 1999. 61p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

BADHAM, E. R. Growth and competition between *Lentinula edodes* and *Trichoderma harzianum* on sawdust substrates. **Mycologia**, New York, v.83, n.4, p.455-463, 1991.

BANO, Z.; RAJARATHNAM, S. *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.27, p.87-158, 1988.

BONONI, V. L. R.; CAPELARI, M.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Ícone, 1995. 206p.

BONONI, V.L.R; TRUFEM, S.F.B. **Cogumelos comestíveis**. São Paulo: Ícone, 1986. 86p.

BRASIL, M A. M. **Variação da densidade básica da madeira entre e dentro de procedências de *Eucalyptus urophylla***. S. T. Blake. Botucatu, 1983. 89p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

CAMPBELL, A. C.; RACJAN, M. The commercial exploitation of the white rot fungus *Lentinula edodes* (shiitake). **International Biodeterioration & Biodegradation**, Amsterdam, v. 43, p. 101-107, 1999.

CENTURION, J. F. Balanço hídrico da região de Ilha Solteira. **Científica**, Jaboticabal, v.10, n.1, p.57-61, 1982.

CHALLEN, M. P.; ELLIOTT, T. J. The in vitro responses to a range of fungicides of two strains of the mushroom *Agaricus bisporus* and the pathogen *Verticillium fungicola*. **Mycopathologia**, A. H. Dordrecht, v. 90, p. 161-164, 1985.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. A new look at cultivated mushrooms. **Bioscience**, Washington, v.3, p. 358-362, 1984.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Edible mushrooms and their cultivation**. Florida: Boca Raton: CRC Press, 1989. p.189-223.

COUTINHO, L. N.; AZEVEDO, J. L.; FIGUEIREDO, M. B. Taxonomia, viabilidade e patogenicidade do *Verticillium* causador de doença no cogumelo comestível (*Agaricus bisporus*), no estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1, p. 61-76, 1996.

EIKER, A. A report on the use of prochloraz-manganese complex for controlling of major fungal pathogens of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) in the South Africa. **Journal of South African Botany**, New Lands, Cape Province, v. 53, p. 345-348, 1987.

EIRA, A. F.; MINHONI, M.T.A. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. Botucatu: ELO/ Instituto de Economia Associativa, 1996. 68p.

EIRA, A. F.; MONTINI, R. M. C. **Manual de cultivo do shiitake: *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1997. 38p.

FLETCHER, J. T.; HIMS, M. J.; HALL, R. T. The control of dry brebble and cobweb disease of mushroom with prochloraz. **Plant Pathology**, Oxford, v. 32, p. 123-131, 1983.

GIL, F. H. Introducción al cultivo de shiitake (*Lentinula edodes*). In: JORNADAS TÉCNICAS DEL CHAMPIÑÓN Y OTROS HONGOS COMESTIBLES EM CASTILLA-LA MANCHA, I, 1993, Castilla-la Mancha, **Anais...** Cuenca: Consejería de Agricultura y Medio Ambiente, 1993. p.143-149.

GRACIOLLI, L. A.; NAVICKIENE, S.; BRITO, N. M.; AMARANTE Jr, O. P.; RIBEIRO, M. L. Determinação de resíduos do fungicida benomyl em cogumelos shiitake (*Lentinula edodes*) por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NA ALIMENTAÇÃO, SAÚDE, TECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE NO BRASIL, I, 2002, Brasília. **Anais...** Brasília, 2002.

GUGLIOTA, A. M.; CAPELARI, M. Taxonomia de basidiomicetos. In: BONONI, V. L. R. (Org.). **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica/Secretaria do Estado do Meio Ambiente, 1998. cap. 3, p.69-106.

HARRIS, B. **Growing shiitake commercially**. 2.ed. Tennessee: Foundation Publications, 1993, v. 2, 71p.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 71-74, 2001.

KEINATH, A. P.; ZITTER, T. A. Resistance to benomyl and thiophanate-methyl in *Didymella bryoniae* from South Carolina and New York. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 479-484, 1998.

LAHMANN, O.; RINKER, D. L. **Historical development of commercial mushroom production in central and South America**. In: PROCEEDINGS PHASE OF A SHIITAKE (*Lentinula edodes*) CULTURE, v. 3. New York: Marcel Dekker, 1991. p.221-40.

LEATHAN, G. F. Cultivation of shiitake, the Japanese forest mushroom, on logs: a potential industry for the United States. **Forest Products Journal**, Madison, v.32, n. 8, p.29-35, 1982.

LEVANON, D.; ROTHSCCHILD, N.; MASAPHY, S. Bulk treatment of substrate for the cultivation of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) on straw. **Bioresource Technology**, Essex, v.45, p.63-64, 1993.

LIAO, Y. M. Microorganisms contaminated in the process of cultivation and their effect on the production of shiitake. **Journal of Agricultural Engineering Research**, China. v. 42, n.2, p. 187-199, 1993.

LIMA, P. L. A.; DELMANTO, R. D.; SUGUI, M. M.; EIRA, A. F.; SALVADORI, D. M. F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents *in vivo*. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 496, p. 23-32, 2001.

MACGRATH, M. T.; SHISHKOFF, N. Resistance to triadimefon and benomyl: dynamics and impact on managing cucurbit powdery mildew. **Plant Disease**, Saint Paul, v.85, p.147-154, 2001.

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

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. Betaglucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, Oxford, v.68, n. 3, p. 315-318, 2000.

MATA, G.; GAITÁN-HERNÁNDEZ, R. Avances en el cultivo del shiitake em pulpa de café. **Revista Ibero-Americana de Micologia**, Castilla-la Mancha, v.11, p.90-91, 1994.

MONTINI, R. M. C. **Produtividade de shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler), no primeiro choque de indução, em função de características dos toros do *Eucalyptus saligna*, Sm, variáveis do ambiente e período de incubação.** Botucatu, 1997. 61p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

MONTINI, R.M.C. **Efeito de linhagens e substratos no crescimento miceliano e na produtividade em cultivo axênico de shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler).** Botucatu, 2001. 104p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

MUEZ OROBIA, M. A. Bases para o cultivo de *Pleurotus*. In: JORNADAS TÉCNICAS DEL CHAMPIÑÓN Y OTROS HONGOS COMESTIBLES EM CASTILLA-LA MANCHA, I, 1993, Castilla-la Mancha, **Anais...** Cuenca: Consejería de Agricultura y Medio Ambiente, 1993. p. 129-137.

NAVICKIENE, S.; RIBEIRO, M.L. Procedimento simplificado de extração para análise de resíduos de carbendazim em uva por cromatografia à líquido de alta eficiência. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.10, p. 23-30, 2000.

PASCHOLATI, S. F.; STANGARLIN, J. R.; PICCININ, E. **Cogumelos: cultivo e comercialização (shiitake e cogumelo do sol).** Cuiabá: SEBRAE/ MT, 1998. 85p.
PAULA, D. P. **Cultivo do cogumelo comestível shiitake (*Lentinula edodes* Berk.; Pegler) em toros de abacateiro (*Persea americana*) e de mangueira (*Mangifera indica* L.).** Ilha Solteira, 2000. 48p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Sistemas

de Produção) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.

PEARSON, R. C.; TASCHENBERG, E. F. Benomyl-resistant strains of *Uncinula necator* on grapes. **Plant Disease**, Saint Paul, v.64, p.677-680, 1980.

PICININI, E. C. Fungicidas benzimidazoles. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo fundo, v.2, p. 357-407, 1994.

PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J. **Shiitake grower's handbook**: the art and science of mushroom cultivation. Dubuque: Kendall, 1990. 217p.

QUEIROZ, D. R. **Efeitos de fungicidas “in vitro” sobre o crescimento micelial do shiitake e de fungos contaminantes isolados do cultivo tradicional em toros**. Ilha Solteira, 2000. 29p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.

ROLLAN, M. G. **Cultivo de setas y trufas**. Madrid: Mundi-prensa libros, 1998. 217p.

ROYSE, D. J.; SCHISLER, L. C.; DIEHLE, A. Shiitake mushrooms: consumption, production and cultivation. **Interdisciplinary Science Reviews**, Bristol, v.10, n.4, p. 329-335, 1985.

SAMUELS, G. L.; JOHNSTON, J. P. Benomyl and the *Verticillium* disease of cultivated mushrooms. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v.23, p. 155-157, 1980.

SAN ANTONIO, J. P. Cultivation of the shiitake mushroom. **HortScience**, Alexandria, v.16, n.2, p. 151-156, 1981.

SANT'ANNA, A. **Cultivo do cogumelo shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler em serragem e em toros de eucalipto**. Rio Claro, 1998. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/ Microbiologia aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

SONG, C. H.; CHO, K. Y.; NAIR, N. G. A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinula edodes*. **Mycologia**, New York, v.79, n.6, p.866-879, 1987.

STAMETS, P.; CHILTON, J. S. **The mushroom cultivator**. Washington: Agarikon Press, 1983. 415p.

TEIXEIRA, E. M. **Efeito da suplementação de serragem de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden), na velocidade e intensidade de colonização do substrato para produção de matriz de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler e sua eficiência na produção**. Jaboticabal, 1996. 37p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias de Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

TEIXEIRA, E. M.; MACHADO, J. O. **O cultivo do cogumelo shiitake em toros**. Jaboticabal: FUNESP, 1997. 44p.

TEIXEIRA, E. M. **Caracterização e avaliação de linhagens de shiitake (*Lentinula edodes* (Berk) Pegler) inoculadas em *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, cultivadas em clima cwa subtropical, em função da produtividade e qualidade dos basidiomas**. Araraquara, 2000. 149p. Tese (Doutorado em Biotecnologia/ Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.

TOKIMOTO, T. Physiological studies on antagonism between *Lentinula edodes* and *Trichoderma* spp. in bedlogs of the former. **Reply Tottori Mycology Institute**, Japan, v.23, p. 1-54, 1985.

URBEN, A. F.; OLIVEIRA, H. C. B. de; VIEIRA, W.; CORREIA, M. J.; URIARTT, A. H. **Produção de cogumelos comestíveis por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 151p.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspective (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, New York, v. 1, p. 31-62, 1999.

WORRALL, J. J.; YANG, C. S. Shiitake and oyster mushroom production on apple pomace and sawdust. **Hortscience**, Alexandria, v.27, n.10, p.1131-1133, 1992.

YANG, J.; LIN, H.; MAU, J. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, Oxford, v. 77, n. 2, p. 229-235, 2002.

ZADRAZIL, F.; GRABBE, K. Edible mushrooms. **Biotechnology**, Weinheim, v.3, n.1, p. 145-187, 1983.

ZHANXI, L.; ZHANHUA, L. **Juncao technology**. China: China Agricultural Sciencetech Press, 2001. 250p.