

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**PRODUTIVIDADE E TEOR DE β -GLUCANA DE *Agaricus subrufescens*
Peck [*Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann], EM FUNÇÃO DE
DIFERENTES PRÁTICAS DE CULTIVO E CONVERSÕES
ENERGÉTICAS.**

DIEGO CUNHA ZIED

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Campus de Botucatu, para qualificação ao título de Doutor em Agronomia (Energia na Agricultura).

BOTUCATU-SP

MAIO - 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**PRODUTIVIDADE E TEOR DE β -GLUCANA DE *Agaricus subrufescens*
Peck [*Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann], EM FUNÇÃO DE
DIFERENTES PRÁTICAS DE CULTIVO E CONVERSÕES
ENERGÉTICAS.**

DIEGO CUNHA ZIED

Orientadora: Professora Doutora Marli Teixeira de Almeida Minhoni

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Campus de Botucatu, para qualificação ao título de Doutor em Agronomia (Energia na Agricultura).

BOTUCATU-SP

MAIO – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E
DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Z65p Zied, Diego Cunha, 1982-
Produtividade e teor de β -glucana de *Agaricus
subrufescens* Peck [*Agaricus blazei* (Murrill) ss.
Heinemann], em função de diferentes práticas de
cultivos e conversões energéticas / Diego Cunha Zied.
- Botucatu : [s.n.], 2011
v, 99 f. : gráfs. color., tabs., fots. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2011
Orientador: Marli Teixeira de Almeida Minhoni

Inclui bibliografia

1. Adubos e fertilizantes. 2. *Agaricus
subrufescens*. 3. Cultivos de cobertura. 4.
Cogumelo - Cultivo. 5. Glucanas. 6. Linhagem
(Genética). I. Minhoni, Marli Teixeira de Almeida. II.
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências
Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PRODUTIVIDADE E TEOR DE β -glúcana de *Agaricus subrufescens* Peck [*A. blazei* (Murril) ss. Heinemann] EM FUNÇÃO DE DIFERENTES PRÁTICAS DE CULTIVO E CONVERSÕES ENERGÉTICAS

ALUNO: DIEGO DA CUNHA ZIED

ORIENTADOR: PROFA. DRA. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

Aprovado pela Comissão Examinadora



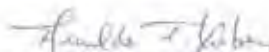
PROFA. DRA. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



PROF. DR. EUSTAQUIO SOUZA DIAS



PROFA. DRA. ARAILDE FONTES URBEN



PROF. DR. LUIZ ANTONIO GRACIOLI

Data da Realização: 18 de maio de 2011

DEDICO

À DEUS sobre todas as coisas !

Aos meus pais Tuffi e Sônia

A meu irmão Igor

Pelos exemplos de honestidade e responsabilidade

AGRADECIMENTO

À Profa. Marli Teixeira de Almeida Minhoni, ao Prof. José Emilio Pardo Gonzalez e ao Pesquisador Arturo Pardo Gimenez, pelas orientações, além do apoio, amizade, dedicação e paciência.

À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Agronomia, Área de Concentração Energia na Agricultura, em especial ao Professor Dr. Marco Antonio Martin Biaggioni pela oportunidade de execução deste trabalho.

Ao Prof. Eustáquio Souza Dias, pela realização das análises de β -glucana.

Aos funcionários e amigos do Módulo de Cogumelos José Antonio Fogaça e Ivando Roberto Fogaça, que nos deram todo o apoio necessário e trabalharam incansavelmente para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos do CIES (Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón) e da UCLM (Universidade de Castilla-La Mancha).

Aos Colegas de pós-graduação: Willian Bucker Moraes, Waylson Zancanella Quaterzani, Haroldo Hantunes Chagas, Alessandro José Marques Santos, Leonardo de Almeida Monteiro e Jairo Costa Fernandes e a todos que de uma forma ou outra contribuíram com a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida para a concretização deste trabalho.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP – Botucatu, pela paciência, consideração e apoio recebidos.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1 RESUMO	1
2 SUMMARY	4
3 INTRODUÇÃO GERAL	7
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
4.1 Cultivo de cogumelos no mundo.....	10
4.2 Cultivo de <i>Agaricus subrufescens</i> Peck [<i>A. blazei</i> (Murrill) ss. Heinemann no Brasil]	11
4.3 Características morfológicas de <i>A. subrufescens</i>	12
4.4 Fases de Cultivo	13
4.4.1 Produção de micélio	14
4.4.2 Compostagem (Fase I e II)	16
4.4.3 Inoculação do composto e corrida do micélio.....	19
4.4.4 Camada de cobertura	20
4.4.5 Indução de primórdios	22
4.4.6 Produtividade	24
4.5 Propriedades Medicinais	25
4.5.1 β -Glucana	26
CAPÍTULO I	29
Resumo	30
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Material e métodos.....	32
Resultados e discussão	36
Conclusões.....	39
Referências	39
CAPÍTULO II	48
Resumo	49

Abstract.....	49
Introdução.....	50
Material e métodos.....	52
Resultados e discussão	55
Conclusões.....	57
Referências	58
CAPÍTULO III	67
Resumo	68
Abstract.....	68
Introdução.....	69
Material e métodos.....	71
Resultados e discussão	75
Conclusões.....	77
Referências	78
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
6 CONCLUSÕES GERAIS	89
7 REFERÊNCIAS.....	91

1 RESUMO

O cogumelo *Agaricus subrufescens* [*A. blazei* (Murrill) ss. Heinemann] vem sendo muito estudado em várias partes do mundo devido às suas propriedades medicinais e farmacológicas. Como substância de interesse, na parede celular do fungo, tem-se a presença de polissacarídeos chamados β -glucanas, os quais possuem função estrutural. Poucos estudos são encontrados na literatura sobre quais fatores influenciam a concentração de β – glucana nos basidiomas; para isso foram realizados 3 experimentos a fim de se entender melhor o processo. O primeiro experimento teve como objetivo avaliar a influência do processo de compostagem “Indoor” no comportamento agrônômico do *A. subrufescens* e nas características químicas dos basidiomas, sendo analisados os cogumelos “in natura”, desidratados e liofilizados. Para isso, o experimento constou de um fatorial simples com 3 compostos (provindos de diferentes centrais de compostagem “Indoor”, os quais foram produzidos através de distintos métodos), com 5 repetições cada tratamento. O fator composto afetou a produtividade e o número de basidiomas, porém não afetou a massa de basidiomas, a precocidade e o tempo para o primeiro fluxo. O processo de compostagem para o cultivo de *A. subrufescens* não está totalmente conhecido, sendo necessárias maiores pesquisas com enfoque de manejo, métodos e formulações a serem utilizadas para a produção de composto. O método de desidratação de basidiomas para sua conservação se mostrou eficiente (pouca mudança nas características químicas dos cogumelos foram observadas) e não possui um custo elevado de processamento quando comparado com o método de liofilização. O segundo experimento teve como objetivo comparar o comportamento agrônômico (produtividade, número e massa de basidiomas,

precocidade e tempo para a primeira colheita) e o potencial medicinal (β -glucana) de *A. subrufescens*, em função da utilização de diferentes linhagens e substratos de cultivo (composto). Para isso o experimento constou de um fatorial duplo com 5 linhagens diferentes (ABL 99/28, ABL 99/30, ABL 03/44, ABL 04/49 e ABL 06/59) e 3 compostos (à base de palha de Massai e bagaço de cana, palha de aveia e bagaço de cana e finalmente palha de Aruana e bagaço de cana), com 8 repetições cada tratamento. Os fatores linhagem e composto afetaram todas as variáveis analisadas (produtividade, número de basidioma, precocidade, tempo para o primeiro fluxo e quantidade de β -glucana), exceto a massa média de basidiomas. As linhagens ABL – 99/30, 03/44 e 04/49 merecem extrema atenção e podem ser recomendadas para o cultivo de *A. subrufescens* devido ao comportamento agrônômico satisfatório e presença de β -glucana dentro dos valores médios obtidos pelos tratamentos. O composto pode ser preparado utilizando uma formulação adequada para se obter boa produtividade (sendo que um composto balanceado quimicamente correto apresenta pouca variação na produtividade e na quantidade de β -glucana). Finalmente o terceiro experimento teve como objetivo verificar a influência da camada de cobertura e do ambiente de cultivo no comportamento agrônômico (produtividade, número e massa de basidioma, precocidade e tempo para o primeiro fluxo) e no potencial medicinal (β -glucan) do cogumelo *A. subrufescens*. Para isso o experimento constou de um fatorial duplo com 4 camadas de cobertura diferentes (4 coberturas à base de solo misturado com carvão, fibra de coco, casca de *Pinus* compostada e turfa de musgo) e 4 ambientes de cultivo (1 câmara climatizada, com ausência de luz solar e 3 estufas com diferentes filmes plásticos), com 7 repetições cada tratamento. O fator cobertura e ambiente de cultivo afetaram a produtividade, número e a massa de basidioma, e o tempo para o primeiro fluxo; porém, não afetaram a precocidade e a quantidade de β -glucana nos basidiomas. Apesar de não influenciar estatisticamente a cobertura é um fator que apresenta grande influência sobre os valores de β -glucana nos basidiomas e também no sucesso do comportamento agrônômico dos cultivos, sendo uma boa sugestão a utilização de carvão vegetal e casca de *Pinus* adicionado ao solo (1:4, v/v). O ambiente de cultivo é um fator determinante junto aos valores de produtividade e uma das maiores fonte de desistência dos produtores em um cultivo comercial, sendo uma possibilidade a condução de cultivos em câmaras climatizadas, por não influenciar os valores de β -glucana nos basidiomas.

Palavras-chaves: *Agaricus subrufescens*, linhagens, composto, camada de cobertura, ambiente de cultivo, produtividade, β – glucana.

YIELD AND AMOUNT OF β -GLUCAN OF *Agaricus subrufescens* Peck [*A. blazei* (Murrill) ss. Heinemann], ACCORDING TO DIFFERENTS GROWING PRACTICES AND ENERGY CONVERSION. Botucatu, 2011. 100 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: DIEGO CUNHA ZIED

Adviser: MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

2 SUMMARY

The mushroom *Agaricus subrefescens* Peck [*A. blazei* (Murrill) ss. Heinemann] has been widely studied in various parts of the world, because their medical and pharmacological properties. As substances of interest, on the cell wall of fungi, there is the presence of polysaccharides called β -glucans, which have structural function. Few results are found in the literature about which factors influence the concentration of β - glucan in the mushrooms. For these, 3 experiments were carried out in order to better understand this particular case. The first experiment aimed to evaluate the influence of the "Indoor" composting process in the agronomic performance (yield, number and weight of basidiocarps, precociousness and earliness) of *A. subrufescens* and their chemical characteristics of basidiocarps, had been

analyzed the mushrooms in natura, dehydrated and freeze-dried. The experiment followed a simple factorial with 3 composts (coming from different composting "Indoor" installations, which were produced through varied methods) with five replicates per treatment. The compost factor affected the yield and the number of basidiocarps, but not affected the weight of the basidiocarps, the precociousness and the earliness. The compost process for the cultivation of *A. subrufescens* is still unknown, requiring further research with management approaches, methods and formulations to be used for the production of the compost. The method of dehydration of the basidiocarps for its conservation is efficient (little change in the chemical characteristics of the mushrooms was observed) and does not have a high cost of production when compared to the freeze-dried. The second experiment aimed to analyze the agronomic performance (yield, number and weight of basidiocarps, precociousness and earliness) and the medicinal potential (β -glucan) of *A. subrufescens*, according to the different strains and cultivation substrates (compost) used. The experiment followed a double factorial design with 5 different strains (ABL 99/28, ABL 99/30, ABL 03/44, ABL 04/49 and ABL 06/59) and 3 composts (based on Massai straw and sugar cane bagasse, oat straw and sugar cane bagasse and finally Aruana straw and sugar cane bagasse), with 8 replicates for each treatment. The factors strains and composts affecting all variables analyzed (yield, number of basidiocarps, precociousness, earliness and amount of β -glucan), except the weight of basidiocarps harvested. The strains ABL - 99/30, 03/44 and 04/49 deserve serious consideration and may be recommended for the cultivation of *A. subrufescens* because of its good agronomic performance and presence of β -glucan within the average values obtained by the treatments. The compost may be prepared using a suitable formulation to obtain good yield (a compost chemically balanced shows little variation in yield and the amount of β -glucan). Finally, the

third experiment was aimed to analyze the influence of the casing layer and the environment of growing on agronomic performance (yield, number and weight of basidiocarps, precociousness and earliness) and the medicinal potential (β -glucan) from the *A. subrufescens* mushroom. The experiment followed a double factorial design with 4 different casing layer (4 soil-based casing layers mixed with charcoal, coconut fiber, composted pine bark and peat moss) and 4 environment of growing (a climatized chamber with no sunlight and 3 greenhouses with different plastic films), with 7 replicates for each treatment. The factor casing and environment of growing affected the yield, number and weight of the basidiocarps and earliness, but did not affect the precociousness and the amount of β -glucan present in the mushrooms. Although not statistically influence the casing layer is a factor that had great influence on the values of β -glucan in the mushroom and also in the success of the agronomic performance of the crops, but a good suggestion is the use of charcoal and pine bark added to soil (4:1, v/v). The environment of growing is a factor determinant with the yield values and a major source of withdrawal of one cash crop growers, which can be conducted in controlled conditions because it does not influence the values of β -glucan in the mushroom.

Keywords: *Agaricus blazei*, strains, compost, casing layer, environments of growing, yield, β – glucan

3 INTRODUÇÃO GERAL

O termo fungicultura refere-se ao cultivo de fungo sob condições artificiais de laboratório ou de estufas e envolve diversas etapas de produção. As espécies produzidas são geneticamente conhecidas, e trazem benefícios para a saúde humana (tanto com relação ao valor proteico e mineral, quanto devido as suas propriedades farmacológicas). Os seus princípios ativos, como exemplo, β -glucanas e Lentinan, atuam aumentando as atividades do sistema imunológico.

Assim se caracteriza o cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais, uma alternativa biotecnológica rápida, viável e econômica de reciclar materiais orgânicos e agroindustriais, em alimentos de qualidade elevada, podendo colaborar de modo significativo na alimentação humana. O Brasil vem gerando e produzindo uma quantidade elevada de matéria prima de origem vegetal, principalmente oriunda das usinas sucroalcooleiras (bagaço e palha de cana-de-açúcar), a qual pode ser utilizada industrialmente na produção de cogumelos e também no desenvolvimento de pesquisas que potencializem esta área biotecnológica no mercado nacional e internacional.

Em todos os países desenvolvidos do mundo (EUA, Holanda, França, Japão, Alemanha, Canadá, Bélgica, Itália, etc.), o cultivo de cogumelos é uma atividade altamente controlada (com o cumprimento de normas e legislações), economicamente sustentável, industrial ou familiar, organizada em cooperativas e sociedades, sustentada por órgãos de pesquisa e extensão que geram recursos para o financiamento e o crescimento do

setor, além de ambientalmente correta que gera grande número de empregos de maneira direta e indireta junto à sociedade.

O Brasil possui pouca tradição de consumo e cultivo de cogumelos. A alimentação protéica nacional concentra-se em produtos de origem vegetal (soja, feijão, etc.) e animal (leite, ovos, carne, etc.). Porém, nas últimas décadas, com a presença de imigrantes de origem asiática e européia no Brasil, o consumo de cogumelos foi aumentando. Atualmente, pessoas de todas as nacionalidades consomem cogumelos, sendo este encontrado em restaurantes, pousadas, supermercados, mercearias vegetarianas, farmácias de manipulação, entre outros estabelecimentos comerciais, porém ainda em pequena quantidade devido ao custo elevado ao consumidor, resultado de uma tecnologia de cultivo ineficiente e o reduzido capital investido na atividade (tanto por parte governamental como privada).

Entre os cogumelos produzidos atualmente no Brasil, o *Agaricus subrufescens* merece extrema atenção, por se tratar de uma linhagem de origem brasileira e possuir elevada propriedade medicinal e farmacológica, ao contrário de outros cogumelos, tais como o *Agaricus bisporus* (Champignon), *Lentinula edodes* (Shiitake), *Pleurotus ostreatus* (Shimeji), que são cogumelos comestíveis ou medicinais de origem de outros países, o que normalmente requer elevado grau de investimento para a implantação dos cultivos, devido à baixa temperatura necessária para a frutificação.

O *A. subrufescens* possui aproximadamente 80% do seu comércio destinado à exportação, principalmente para o Japão, Taiwan, EUA e países da União Européia, onde é utilizado em tratamentos, terapias, atividades de imuno-proteção e produção de fármacos. Por se tratar de um cogumelo medicinal, como requisito mínimo para a importação deste cogumelo, o mercado externo solicita a adoção de manejo e/ou práticas de cultivo que potencializem a valor medicinal do mesmo. E é neste sentido que os objetivos desse trabalho foram: (1) avaliar a influência do processo de compostagem “Indoor” no comportamento agrônômico do *A. subrufescens* e suas características químicas, sendo analisados os basidiomas “in natura”, desidratados e liofilizados; (2) Verificar dados de produção de cogumelo (produtividade, o número e massa dos basidiomas, a precocidade e o tempo para o primeiro fluxo), variando diferentes práticas de cultivo; (3) Comparar a capacidade de *A. subrufescens* na produção de polissacarídeos (β – glucana), em função de linhagens genéticas, compostagem, camadas de cobertura e ambientes de cultivo; (4)

Valorização de novas áreas biotecnológicas que potencializem economicamente a agricultura familiar brasileira, tornando referência em pesquisas nacionais e internacionais visando a obtenção de maior apoio governamental, créditos nas áreas de fomento, desenvolvimento e sustentabilidade.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Cultivo de cogumelos no mundo

A produção de cogumelos no mundo vem crescendo gradativamente, com o desenvolvimento de novas tecnologias de acordo com a necessidade local de cultivo. Durante o ano de 1994, a produção mundial de cogumelos foi de 4.922.000 toneladas, sendo que mais de 90% dos cogumelos produzidos foram dos gêneros *Agaricus*, *Lentinula*, *Pleurotus*, *Auricularia*, *Volvariella* e *Flammulina* (NAVARRO LOZANO et al., 2003). No ano de 1997 a produção mundial alcançou as cifras de 6.344.000 toneladas, o que representou um crescimento de 30% em três anos (COURVOISIER, 1999).

São vários os países produtores de cogumelos, sendo os países europeus os que possuem os cultivos mais desenvolvidos (Holanda, França, Bélgica, Itália, Espanha, Alemanha, Polônia, etc.), seguidos pelos EUA, Canadá, Japão, Austrália, Nova Zelândia e finalmente, os países asiáticos (China, Coreia do Sul, etc.). O que mais se destaca é a China, por ter produzido 4.000.000 toneladas de cogumelos em 1997 (63% da produção mundial), seguidos pelos países da União Européia, com 14% da produção e dos países da América do Norte com 7%. O restante da produção mundial em 1997 (16%) foi produzido principalmente nos países do continente Asiático (COURVOISIER, 1999).

Ao contrário da China, onde se cultiva grande variedade de espécies de cogumelos, os países da União Européia e da América do Norte têm sua produção acima do cogumelo Champignon. Em 1991, 10,7% da produção mundial de Champignon foram

produzidos na China, sendo que a França, Holanda, Inglaterra e Itália produziram 38,7% e o EUA 21,5% (MILES e CHANG, 1997). Em 2001, países da União Européia, como Espanha e Itália começaram a se destacar no cenário mundial pela produção elevada de *Pleurotus* spp. (ZIED et al., 2010a).

Até a presente data poucos países produzem *A. subrufescens* em escala comercial, sendo estes: Brasil, China, EUA, Taiwan, etc. (ZIED et al., 2010b; WANG et al., 2010). Em escala experimental têm-se países como Espanha, França, Coreia do Sul, Canadá, Argentina, Japão, etc (OHNO et al., 2001; WANG et al., 2010; GONZÁLEZ MATUTE et al., 2010).

4.2 Cultivo de *Agaricus subrufescens* Peck [*A. blazei* (Murrill) ss. Heinemann] no Brasil

No Brasil, o *A. subrufescens* é conhecido como “Cogumelo do Sol[®]”, “Cogumelo Medicinal”, “Cogumelo Piedade” ou simplesmente “Blazei”. Já nos EUA, este pode ser encontrado como “Royal Sun Agaricus”; no Japão, “Himematsutake”, “Agarikusutake”; ou “Kawarihiratake”; e na China, “Ji Song Rong” (KOPYTOWSKI FILHO et al., 2006; FIRENZUOLI et al., 2007).

Segundo relatos, a primeira coleta deste basidiomiceto ocorreu no início de 1960 na Cidade de Tapiraí/SP, quando esta ainda era um distrito da cidade de Piedade/SP (MIZUNO et al., 1998). Um agrônomo chamado Takatoshi Furumoto, o qual também trabalhava, estudava e produzia cogumelos (*L. edodes* e *A. bisporus*) coletou um exemplar do mesmo perto de sua propriedade, na região serrana da Mata Atlântica do Estado de São Paulo, Brasil (URYU, 1999). Nesta circunstância, o Sr. Furumoto começou a fazer alguns ensaios de produção, o que resultou no início do cultivo em 1980 (ZIED et al., 2009a).

Ainda em meados de 1960 e 1970, algumas amostras foram enviadas para o Japão, a fim de se estudar suas propriedades medicinais, pois naquela época haviam sido observadas respostas positivas à saúde, com o uso do mesmo na forma de chá (EIRA, 2003). Estudos medicinais, taxonômicos, morfológicos e agronômicos começaram a ser realizados junto à comunidade científica mundial (KAWAGISHI et al., 1988; KAWAGISHI et al., 1989). Em 1985, o Sr. Furumoto faleceu e o cultivo de *A. subrufescens* no Brasil entrou em

anonimato. Porém, em meados da década de 90, matrizes melhoradas geneticamente (trabalho realizado pelo Iwade Mushroom Institute em Mie) foram encaminhadas de volta ao Brasil, devido às condições climáticas favoráveis à produção deste cogumelo (EIRA, 2003; MINHONI et al., 2005). A partir desta data o cultivo sistemático foi retomando e o Brasil começou a cultivar este cogumelo em escala comercial (URBEN, 2004).

Acredita-se que países asiáticos como China e Taiwan, e os EUA, também receberam algumas destas amostras para o cultivo, pois estes também produzem *A. subrufescens* atualmente, entretanto a produção é baixa, devido às condições climáticas desfavoráveis para o seu desenvolvimento reprodutivo.

Deste modo ressalta-se que o cultivo de *A. subrufescens* é recente, com baixa tecnologia de produção, em consequência do pouco conhecimento que se tem a respeito da sua condição ótima de cultivo sendo assim as tecnologias adotadas, ainda são em sua maioria as utilizadas para a produção de *Agaricus bisporus* (Champignon) (BRAGA et al., 1998).

4.3 Características morfológicas de *A. subrufescens*

Segundo Zied et al. (2009a) o basidioma de *A. subrufescens* possui em média o píleo com 5 a 11 cm de diâmetro, é semiglobuloso de cor marrom claro a creme, com pequenas escamas brancas na parte superior, que sobressaem o píleo (2-3mm). O estipe estreita-se na junção com o píleo (4-13 cm de comprimento por 1-3 cm de diâmetro), com espessura constante ou base bulbosa de coloração branca (Figura 1).

As lamelas dispõem-se muito próximas umas das outras, não conectadas ao estipe, com 0,8-1,0 cm de largura, esbranquiçadas a cinza-amarronzadas e marrom escuro na senescência. Os esporos são elípticos (4,9-6,4 por 4,0-4,7 μm) e de coloração marrom escuro; parede espessa, sem poros; basídios predominante tetrasporicos; cistídios claviformes ou em lanças (18-27 por 6-10 μm) ou catenulados com elementos globosos (5-7 μm de diâmetros), hialinos ou marrons (HEINEMANN, 1993; DIAS et al., 2008).

Com relação à nomenclatura, várias denominações já foram apresentadas para o *Agaricus subrufescens* (Murrill), tais como *Agaricus sylvaticus*, *Agaricus brasiliensis* e *Agaricus subrufescens* dentre outros (KERRIGAN, 2005; GONZÁLEZ

MATUTE et al., 2010). Por esse motivo, no início de 2008, um projeto dirigido pelo pesquisador francês Philippe Callac¹ e colaboradores objetivaram um estudo da biodiversidade desta espécie em busca de diversas linhagens existentes no mundo, para a verificação de suas características moleculares.

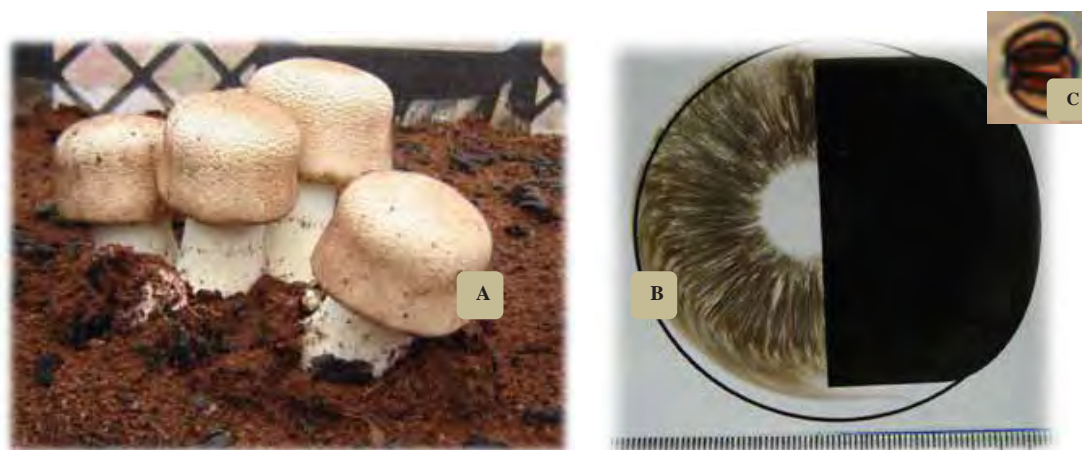


Figura 1. *Agaricus subrufescens*. A: Aspectos morfológicos do basidioma; B: Esporos do basidioma no estágio da senescência “spore print”; C: Esporos com forma elípticos (ZIED et al., 2009a).

4.4 Fases de Cultivo

Segundo Minhoni et al. (2005), as etapas de cultivo do *A. subrufescens* são as mesmas adotadas para o cultivo de *A. bisporus*, as quais servem de parâmetro para qualquer tipo de cultivo, tanto experimental quanto comercial. Estas etapas também vêm sendo utilizadas em outros países como: Estados Unidos, Taiwan e China (BRAGA et al., 1999; OEI, 2003). São elas: produção de micélio, compostagem (Fases I e II), inoculação do composto e corrida do micélio, camada de cobertura, indução de primórdios e produção.

¹Callac, P. INRA. Centre de Recherche Bordeaux-Aquitaine. MycSA. Bourdeaux, France (dados não publicados).

4.4.1 Produção de micélio

A produção de micélio de *A. subrufescens* é desenvolvida seguindo as etapas apresentadas por Zied e Minhoni (2009b), as quais consistem em produção de matriz primária, produção de matriz secundária, produção de matriz terciária e produção de micélio ou inóculo o qual é fornecido aos produtores para a inoculação do composto, em suas propriedades.

Para a produção da matriz primária e secundária utiliza-se meio de cultura à base de extrato de composto-agar (final da Fase II): 60 gramas de composto para a produção de 1 litro de meio de cultura. Com o meio de cultura pronto, transfere-se para as placas de Petri onde a matriz primária é inoculada utilizando um fragmento interno do cogumelo desejado (características físicas e agrônômicas). Após a inoculação das placas, estas são incubadas no escuro a 28°C por aproximadamente oito dias (MINHONI et al., 2005).

Com a matriz primária totalmente desenvolvida e com auxílio de um vazador esterilizado de cobre, retiram-se discos da matriz primária (na borda da colônia – região onde o micélio encontra-se em pleno crescimento vegetativo) e logo com uma alça em L transfere-se um disco da matriz primária para outras placas de Petri com meio de cultura e incuba-se a 28°C, também por aproximadamente oito dias (KOPYTOWSKI FILHO, 2006). Esta é a matriz secundária

A matriz terciária e o inóculo são desenvolvidos em grãos de cereais, podendo ser trigo, sorgo, aveia ou triticale. Para a produção deste substrato fervem-se os grãos por aproximadamente 40 minutos e adicionam-se 20 g kg⁻¹ de calcário calcítico e 160 g kg⁻¹ de gesso de construção (secagem lenta), em relação ao peso úmido dos grãos cozidos. Este substrato é transferido para frascos de vidro (“tipo azeitona”) e autoclavados por 2 ou 4 h dependendo do tamanho do volume do frasco a 121°C (EIRA, 2003).

Para a inoculação da matriz terciária em frascos, divide-se a matriz secundária em 8 fragmentos de tamanhos iguais, forma triangular (“tipo pizza”) e transfere-se um pedaço ao fundo do frasco vazio; em seguida, verte-se o substrato à base de grãos sobre o inóculo (fragmento da matriz secundária) e se incuba a 28°C por 12 dias. Finalmente, o substrato utilizado para a produção do inóculo é o mesmo utilizado para a produção da matriz

terciária; a única diferença é que os grãos (quantidade de ± 1 kg) são acomodados em sacos plásticos (PEAD ou PP). Deste modo se inoculam porções de matriz terciária (± 6 gramas) no substrato autoclavados (2 a 4 h por 121°C); em seguida os sacos plásticos são selados a quente e incubados por 18 dias a 28°C (EIRA, 2003; ZIED, 2008).

Atualmente não existe uma padronização das siglas ou nomes de linhagens utilizadas pelos laboratórios de semente. Assim cada laboratório isola os basidiomas desejados de seus respectivos fungicultores e adicionam uma referência a qual não segue nomenclatura obrigatória. No Brasil, ainda não se realizou nenhum melhoramento genético de linhagens, é realizado apenas um processo rústico de adaptação de linhagens, conforme as condições específicas de cultivo de cada região ou propriedade (ZIED et al., 2009a).

No Módulo de Cogumelos da FCA/UNESP, existe uma vasta coleção de linhagens onde já se desenvolveram algumas pesquisas sobre o comportamento “in vivo” (KOPYTOWSKI FILHO, 2006; ANDRADE et al., 2007; ZIED et al., 2009b; COLAUTO et al., 2010) e “in vitro” (ZIED et al., 2009a) destas.

Tabela 1. Crescimento micelial (mm) in vitro de cinco linhagens de *Agaricus subrufescens* em meio de cultura à base de extrato de composto, após 14 dias de desenvolvimento a 20 e 25°C .

Linhagens	Temperatura de incubação	
	20°C	25°C
ABL – 99/30	40,86 BC b	52,29 CD a
ABL – 03/44	58,29 A b	65,29 AB a
ABL – 04/49	54,29 A b	70,86 A a
ABL – 02/51	37,29 C b	47,14 D a
ABL – 05/53	45,29 B b	58,29 BC a
CV (%)	9,54	
DMS	5,39	

Letras maiúsculas comparam os resultados na mesma coluna e minúsculas na mesma linha ao teste Tukey ($P \leq 0,05$).

CV: coeficiente de variação.

DMS: diferença mínima significativa.

Na tabela 1 tem-se os resultados de crescimento miceliano “in vitro” de 5 linhagens de *A. subrufescens* submetidas a dois regimes de temperatura: 20 e 25°C, onde verificou-se que as linhagens ABL – 03/44 e 04/49 apresentaram maior crescimento em ambas as temperaturas e as linhagens ABL – 99/30 e 02/51 apresentaram menor crescimento também em ambas as temperaturas. Todas as linhagens apresentaram maior crescimento a 25°C.

4.4.2 Compostagem (Fases I e II)

A formulação do composto deve sempre atender os níveis de nutrientes (macro e micronutrientes) em quantidade e proporção equilibrada, necessária à fase de fermentação e produção de cogumelo. O composto é constituído, em geral, de materiais fibrosos à base de palhas; suplementos inorgânicos (que compõem a fração mineral do composto) e de dejetos animais (esterco de cavalo e de galinha) (URBEN, 2004).

A nomenclatura “composto clássico”, à base de esterco de cavalo e de galinha e “composto sem esterco”, cuja fonte de nitrogênio tem uma composição mais definida (STONE e LABORDE, 1991), também são utilizadas no cultivo de *A. subrufescens*. Segundo Zied et al. (2009a), atualmente cerca de 60% dos fungicultores brasileiros já substituíram o “composto clássico” pelo composto “sem esterco”, devido à escassez e os elevados valores deste produto, à variação na composição química e quantidade elevada de sujeiras que acompanham este material (saco plástico, papel, pedras, etc.).

Os materiais mais utilizados para a formulação de compostos no Brasil são bagaços de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*); gramíneas: *Brachiaria* sp, Tifton (*Cynodon dactylon* var. Tifton), Massai (*Panicum maximum* cv. Massai), Coast cross (*Cynodon dactylon*), Aruana (*Panicum maximum*), etc.; palhas de cereais: trigo, aveia e arroz; farelos: soja, trigo, milho, algodão, etc.; adubos sintéticos: uréia, sulfato de amônia e superfosfato simples e os corretores de acidez: carbonato de cálcio, calcário calcítico e gesso (KOPYTOWSKI FILHO et al., 2006).

Na Tabela 2, tem-se três exemplos de formulações de compostos utilizados na produção de *A. subrufescens*. Deve-se ressaltar que a relação C/N dos compostos, no início da Fase I, é de 37/1 (KOPYTOWSKI FILHO et al., 2006), justamente para que no momento da inoculação esta esteja entre 25 a 27/1. A relação nitrogênio inorgânico/orgânico

Tabela 2. Formulações de *A. subrufecens*, para a obtenção final de 15 toneladas de composto: 1º e 2º formulação “compostos sem esterco” e 3º formulação “composto clássico” (ZIED et al., 2009a).

1º Formulação	Umidade (%)	Massa úmida (kg)	Massa seca (kg)	Carbono (kg)	Nitrogênio (kg)
Bagaço de cana	35	7.000	4.550	2.376	19,11
<i>Brachiaria</i> sp.	9	2.000	1.820	910	9,10
Farelo de soja	8	550	506	227,7	35,4
Uréia	0	50	50	-	22,5
S. de amônia	0	50	50	-	11,5
Sup. Simples	0	100	100	-	-
Gesso	0	240	240	-	-
Cal. Calcítico	0	400	400	-	-
Massa total		10.390	7.716	3.513,7	97,61
		Relação C/N – 36/1	% N – 1,31	Relação N inor/org – 0,53	
2º Formulação	Umidade (%)	Massa úmida (kg)	Massa seca (kg)	Carbono (kg)	Nitrogênio (kg)
Bagaço de cana	35	7.000	4.550	2.247	18,20
Palha de aveia	11	2.500	2.225	938	21,14
Farelo de soja	8	400	368	165	25,76
Uréia	0	40	40	-	18,0
S. de amônia	0	45	45	-	10,3
Sup. Simples	0	100	100	-	-
Gesso	0	240	240	-	-
Cal. calcítico	0	400	400	-	-
Massa total		10.725	7.968	3.350,0	93,4
		Relação C/N – 36/1	% N – 1,21	Relação N inor/org – 0,43	
3º Formulação	Umidade (%)	Massa úmida (kg)	Massa seca (kg)	Carbono (kg)	Nitrogênio (kg)
Bagaço de cana	40	7.000	4.200	2.100	29,4
Palha de aveia	11	1.500	1.335	563	12,6
Capim Aruana	9	1.000	910	449	5,7
Est. de galinha	30	600	420	142	6,3
Farinha de soja	8	150	138	62	9,66
Uréia	0	40	40	-	18,0
S. de amônia	0	40	40	-	9,2
Sup. simples	0	100	100	-	-
Gesso	0	240	240	-	-
Cal calcítico	0	400	250	-	-
Massa total		11.220	7.973	3.316,0	90,86
		Relação C/N – 36,5/1	% N – 1,21	Relação N inor/org – 0,42	

inicial é de 0,4-0,6 e o teor de nitrogênio inicial pode variar de 1,15-1,45% (ZIED et al., 2009a).

A Fase I de compostagem é realizada em barracão, com laterais abertas, piso concretado (vazado ou não) e teto de plástico ou telha de amianto. O processo de produção do composto segue o método denominado “caixote” ou “tradicional”, no qual as medas de compostagem são montadas com 2 m de largura por 2 m de altura e o comprimento varia de acordo com a quantidade final desejada pelos fungicultores (MINHONI et al., 2005). Dentro do processo de compostagem (Fase I), realiza-se o pre-umidecimento das palhas e gramíneas juntamente com o bagaço de cana, em esquema de caixote.

A frequência de reviradas é realizada de acordo com os seguintes fatores: umidade do composto, matéria prima utilizada (granulometria e aeração), tipo de piso do pátio de compostagem (vazado ou não), entre outros (MILLER e DAHLBERG, 1991). Indicadores como temperatura e grau de degradação do composto, quantidade de actino-bactérias e outros microrganismos termófilos são parâmetros utilizados como indicadores do momento adequado de introdução do composto no túnel de compostagem (FERMOR e MACAULEY, 1991), uma vez que se trata de um substrato mais pobre que os utilizados na produção de Champignon, porém com a pasteurização gerada pela sua própria termogênese (EIRA, 2003).

Na Tabela 3 tem-se o esquema de compostagem utilizado junto a 1ª formulação descrita na Tabela 2, em um cultivo comercial, desde a montagem da meda até a inoculação do composto (ZIED, 2008).

Tabela 3. Procedimentos adotados durante a compostagem (1ª Formulação) (ZIED, 2008).

Dias	Procedimento
01	Umedecimento do capim e do bagaço de cana.
04	1ª Revirada do composto e adição de água.
07	2ª Revirada do composto e adição de farelo de soja e água.
10	3ª Revirada e adição de água e dos materiais concentrados*.
13	4ª Revirada e adição de água.
15	5ª Revirada e adição de água e gesso.
17	Última revirada e adição de água.
20	Transferência do composto para o túnel de pasteurização.
31	Final da Fase II de compostagem e inoculação

OBS: Adicionar água diariamente, para manter o composto com 70% de umidade.

* Uréia, Sulfato de amônia, Superfosfato simples e Calcário calcítico.

Este esquema não deve ser seguido obrigatoriamente, porém serve didaticamente para a demonstração do processo. A Fase II de compostagem refere-se à pasteurização por $58\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 10 a 24 horas e ventilação de $180\text{-}240\text{ m}^3\cdot\text{t h}^{-1}$ (porcentagem de ar novo reciclado de 10-40%) e condicionamento por $47\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 6 a 9 dias e ventilação de $140\text{-}200\text{ m}^3\cdot\text{t h}^{-1}$ (porcentagem de ar novo reciclado de 5-35%) (ZIED et al., 2009a). As instalações utilizadas nesta fase, ou seja, os túneis de pasteurização são os mesmos usados no cultivo de Champignon (LABORDE, 1991; VESTJENS, 1993).

A compostagem (Fase I e II) representa 50% do sucesso no cultivo de *A. subrufescens*. Outros fatores fundamentais são: inóculo ou “Spawn” de boa qualidade, instalações, camada de cobertura, indução de primórdios e controle de pragas e doenças (fator crítico neste cultivo, devido às elevadas temperaturas necessárias durante a produção) (GROENENBOOM, 1993; LEENDERSTE, 1993).

4.4.3 Inoculação do composto e corrida do micélio

A quantidade de micélio utilizada para inoculação pode variar de 0,8 a 1,5% em relação ao peso úmido do composto (ANDRADE et al., 2007; SILVA et al., 2007; COLAUTO et al., 2010). Na maioria das vezes, o cultivo de *A. subrufescens* é conduzido em sacos plástico com 10 a 12 kg de composto, porém, também há cultivo em caixas plásticas (KOPYTOWSKI FILHO et al., 2006; DIAS, 2010) e em camas (70-90 kg por m^2).

A temperatura ideal para a corrida do micélio é de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. O processo se completa em média em 12-15 dias. Na maioria dos cultivos brasileiros, a câmara utilizada na corrida do micélio é também utilizada para a produção (MINHONI et al., 2005). Devido à falta de informação e assistência técnica qualificada, poucos são os produtores de composto, os quais muitas vezes acabam comercializando o produto recém-inoculado para os demais produtores que não realizam o processo de compostagem em sua propriedade (ZIED et al., 2009a).

Após a fase de colonização do composto, o micélio do *A. subrufescens* torna-se bastante evidente, devido à sua forte coloração branca e densidade elevada, o qual é visivelmente superior ao micélio formado pelo *A. bisporus* (Figura 4) (ZIED et al., 2009a).

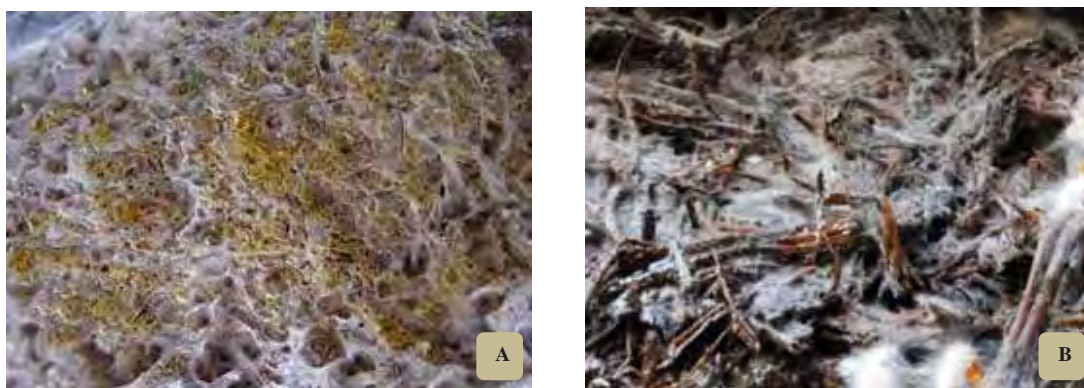


Figura 2. A: Composto colonizado por *A. subrufescens*; B: Composto colonizado por *A. bisporus* (ZIED et al., 2009a).

4.4.4 Camada de cobertura

A camada de cobertura é adicionada sobre o composto colonizado visando fornecer um suporte físico para a formação de primórdios e desenvolvimento de basidiomas, além de controlar a temperatura entre o substrato e o ambiente, contribuindo assim para a manutenção de um micro clima úmido favorável ao desenvolvimento do micélio, permitindo as trocas gasosas (O_2 e CO_2) e o crescimento de bactérias e de outros grupos de microrganismos benéficos ao cogumelo (NAIR e GOKULAPALAN, 1994; PARDO, 1999; GÜLSER e PEKSEN, 2003).

O material mais utilizado é o solo, tanto que durante o período de 2005-2006, foi realizado um levantamento para se verificar quais os materiais eram mais frequentemente utilizados como camada de cobertura, para o cultivo de *A. blazei* na região de Piedade/SP. Os materiais mais verificados foram: solo (50% dos produtores), solo + carvão (37,5%) e solo + carvão + vermiculita (12,5%). Com relação ao tipo de corretivo aplicado à camada de cobertura, 75% dos fungicultores utilizam carbonato de cálcio, 12,5% calcário calcítico e 12,5% calcário dolomítico, para a correção do pH entre 6,5-7,0 (ANDRADE et al., 2006).

Devido ao elevado uso de solo como camada de cobertura, Zied (2008) verificou as características físicas, químicas e microbiológicas de diferentes tipos de solos. O autor ressaltou que, para se obter elevada conversão na produtividade, o solo deve possuir 556 g kg⁻¹ de areia, 102 g kg⁻¹ de silte e 342 g kg⁻¹ de argila, densidade de 1-1,1 g cm⁻³, capacidade de retenção de água de 40 – 50%, teor de Al + H abaixo de 15 mmol_c dm⁻³ e teor de V% (saturação por bases) acima de 70%.

Este solo deve ser misturado com outros materiais (fibra de coco, turfas de diferentes origens, serragem, casca de *Pinus*, bagaço de cana, gel de acrilamida, composto de cogumelos exaurido, etc.), visando à redução da densidade e da compactação da camada de cobertura, causada pelas irrigações diárias; e aumentando a porosidade e a capacidade retenção de água (ZIED et al., 2011).

Os solos utilizados como camada de cobertura devem passar por um processo de correção do pH, visando elevá-lo a 6,0-9,0 (GANNEY e RICHARDSON, 1974; FLEGG e WOOD, 1985). Recomenda-se a utilização de fontes de cálcio com reduzido teor de magnésio, como carbonato de cálcio ou calcário calcítico (TRESCHOW, 1944; GANDY, 1953). A aplicação do corretivo pode ser realizada no momento da adição da camada de cobertura no composto ou 20 dias antes da sua utilização (CAMARGO et al., 2008).

Quando se utiliza apenas solo e resíduo de carvão vegetal como camada de cobertura, muitas vezes não é obrigatório o tratamento fitossanitário (a vapor, formol e outros fungicidas), principalmente quando o solo é retirado a 2,0 m de profundidade, longe do efeito rizosférico das plantas e de regiões onde existem cultivos comerciais em larga escala (ZIED, 2008). Por outro lado quando se adiciona materiais ricos em matéria orgânica e com grande quantidade de macro e micronutrientes prontamente disponíveis, é recomendado o tratamento fitossanitário da camada de cobertura (EIRA, 2003).

Este pode ser físico, com a utilização de vapor, sendo recomendado umedecer bem a cobertura antes de iniciar o processo (para melhorar a condução de calor) que deve permanecer por 60-65°C durante 5 a 7 horas. O tratamento químico pode ser com a utilização de formol, umedecendo o solo, amontoando-o com 25 cm de altura, com auxílio de um cabo de vassoura se abre alguns orifícios na camada de cobertura e nestes orifícios se adiciona uma solução à base de 10 l de água + 1 l de formol em aproximadamente 1m³ de material a ser desinfetado, cobrindo-o em seguida com um plástico negro por

aproximadamente 4-5 dias. Para ambos os tratamentos fitossanitários recomenda-se que após 2 ou 3 dias, estes materiais sejam utilizados (MINHONI et al., 2005).

No cultivo de *A. subrufescens* não se pratica a técnica do “ruffling” (técnica de rastelar a camada de cobertura), nem as aplicações convencionais de inseticida e fungicida após a adição da cobertura e ao longo do cultivo como os realizados no cultivo de *A. bisporus*, uma vez, que este cogumelo é utilizado para fins medicinais, terapêuticos e farmacológicos (ZIED et al., 2009a).

4.4.5 Indução de primórdios

A frutificação ocorre em média 23 dias após a adição da camada de cobertura, as variáveis ambientais necessárias durante o cultivo encontram-se na Tabela 4. Tendo em vista tais amplitudes ótimas, fica claro que em cultivos em estufa rústica e mesmo em barracões de alvenaria, os quais possuem apenas controle parcial das variáveis ambientais, os fluxos de produção e as induções de primórdios ficam dependentes às condições externas “ambientais” (ZIED e MINHONI, 2009).

Tabela 4. Condições de temperatura do composto e do ar, umidade relativa e teor de CO₂ favoráveis à produção de *A. subrefescens* (dados médios com diversas linhagens) (ZIED et al., 2009a).

Condições ambientais	Primeiros 12 dias	Indução de primórdios	Fluxos	Intervalo entre fluxos
Temperatura do composto, °C	27 ± 2	20±2	27±2	28±2
Temperatura do ar, °C	25 ± 2	18±2	26±2	27±2
Umidade relativa, %	90 ± 2	85±2	82±2	85±2
Teor de CO ₂ , ppm	≥1.800	±800	±600	± 600

Já nas câmaras de cultivo climatizadas isso não ocorre e, portanto, pode-se ter até 6 fluxos de colheita num ciclo de produção (120 dias) e até 3 ciclos de produção ao ano (360 dias). No cultivo em estufas rústicas e barracões de alvenaria também se consegue 3 ciclos de produções ao ano (com fluxos indefinidos), porém com 1 ciclo de cultivo inviável economicamente. Na Figura 3 tem-se o comportamento dos fluxos de cultivo (120 dias de

produção, sendo que o 1º dia refere-se à adição da camada de cobertura) em relação ao manejo das variáveis ambientais, em cultivo controlado e semi controlado (ZIED e MINHONI, 2009c).

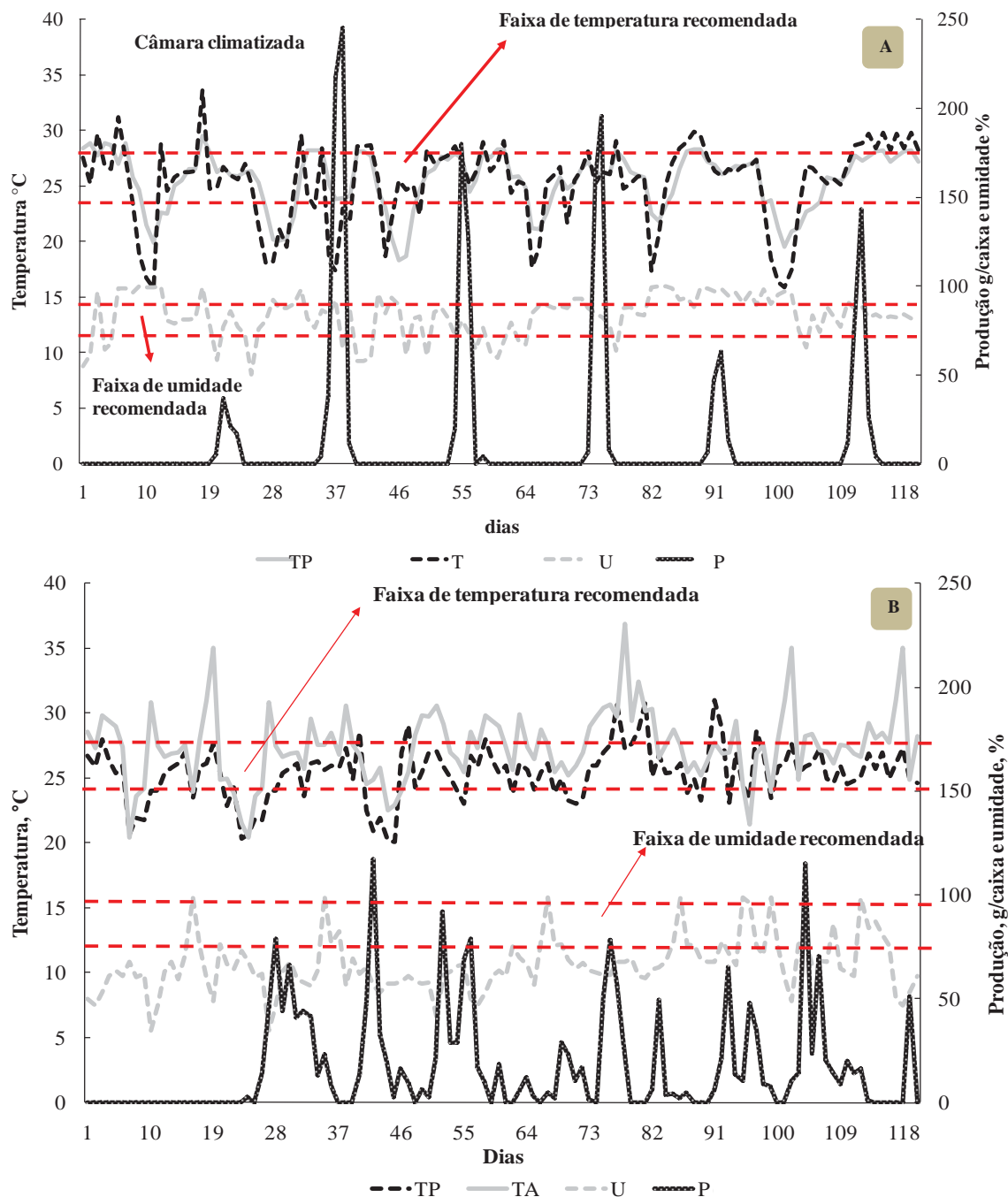


Figura 3. Dinâmica da produção de *A. subrufescens* em função da temperatura do composto e do ar (°C), umidade relativa (%) e ambiente de cultivo: A. Câmaras climatizadas e B. Estufas semi-controladas (ZIED, 2008).

Para o cultivo em condições controladas, a temperatura inicial do ar é mantida a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante, aproximadamente 12 dias. Depois, a ventilação é aumentada e reduz-se o teor de CO_2 e a temperatura do composto (2°C por dia); no 16-17^o a temperatura do composto alcançará os $\pm 20^{\circ}\text{C}$, onde deve permanecer por 48 horas.

Posteriormente, eleva-se a temperatura do composto 2°C por dia, até que este alcance os $\pm 27^{\circ}\text{C}$ (onde já se notará a presença de alguns primórdios). Depois da colheita, é recomendável que a temperatura do composto permaneça a 28°C durante 7 dias, para novamente começar a diminuí-la na ordem de 2°C por dia, para a indução de um novo fluxo de produção (Figura 3) (KOPYTOWSKI FILHO, 2006).

Em condições semi-controladas é difícil induzir um fluxo intencionalmente; estes são influenciados diretamente pelas condições ambientais externas. Na Figura 3, observa-se que sempre que a temperatura do composto é reduzida $\pm 5^{\circ}\text{C}$, ocorre um fluxo de colheita, como pode ser observado aos 23, 40, 54, 69, 95 e 102 dias após a adição da camada de cobertura. Neste tipo de ambiente de cultivo, é muito comum a colheita diária, devido à falta de definição dos fluxos; bem diferente do cultivo em condições controladas que proporciona 6 fluxos bem definidos, cada um com 5 dias de duração, o que totaliza 30 dias de colheita num total de 120 dias de produção (ZIED, 2008).

4.4.6 Produtividade

Apesar de tratar-se de um cultivo recente, produtividades satisfatórias em torno de 15% vêm sendo obtidas, como às observadas por Eira (2003), Colauto et al. (2010), González Matute et al. (2010) e Zied et al. (2010b). Eira em 2003, trabalhando com “turfa Santa Catarina” como camada de cobertura e a linhagem ABL 26, obteve produtividade de 20,5%. Já Colauto et al. (2010) utilizando à mesma linhagem ABL 26, com cobertura à base de xisto obtiveram eficiência biológica de 46,8%. Zied et al. (2010b) estudaram a influência da textura de diferentes solos e obtiveram produtividade de 17%, utilizando solo com 556 g kg^{-1} de teor de areia, 91 g kg^{-1} de silte e 353 g kg^{-1} de argila.

Se compararmos estas produtividades com as obtidas em cultivos de *A. bisporus*, concluiremos que as mesmas ainda são menores, tanto que Noble e Dobrovin-Pennington (2005) obtiveram produtividade de 31% utilizando turfa marrom da empresa

Inglesa, Scotts UK Professional. Zied et al. (2010c) estudaram o efeito da mistura de 600g de composto colonizado adicionados em 1m² de superfície de produção (CAC'ing) juntamente com camada de cobertura comercial Holandesa e alcançaram produtividade de 43%. Colak (2004) utilizou composto à base de palha de trigo, esterco de aves, nitrato de amônia, uréia, gesso e melão e cobertura de turfa de “Bolu” distrito de Yeniçağa + Perlita (70:30, v/v) e obteve produtividade de 48%.

4.5 Propriedades Medicinais

A origem da utilização de fungos como medicamento é muito antiga; a descoberta da chamada “droga maravilha - penicilina”, foi um grande marco na história (BALAKRISHNAN e NAIR, 1994). Desde então muitos fungos são conhecidos por suas propriedades antifúngicas, antibacterianas, antivirais, antitumorais e muitas outras propriedades com valores farmacológicos (DUTSCH e RAST, 1972). Atualmente, os cogumelos vêm sendo referenciados como “tipo especial de alimento” e as clássicas escrituras religiosas de “Vedas” já mencionavam estas importantes características dos cogumelos (SOHI, 1988). Os gregos faziam a referencia de que, “Os cogumelos ofereciam resistência aos soldados nas guerras” (ZUZUKI et al., 1974).

De maneira geral, os cogumelos são compostos por 90% de água, 2-40% de proteína, 2-8% de gordura, 1-55% de carboidratos e de 8-10% de cinzas (sendo esta última composta de sais, metais, minerais, etc.). Metabólicos ativos podem ser isolados dos cogumelos, de cultura pura do micélio e de filtrados da cultura. E hoje, muitas tentativas estão sendo feitas para se obter metabólitos ativos em cultivo submerso, a custos reduzidos (FIRENZUOLI et al., 2007).

Uma substância imunomoduladora, uma resposta biológica modificadora (BRM) ou uma bioterapia vem sendo uma forma importante de tratamento do câncer e de doenças infecciosas, que contam com a utilização de importantes polissacarídeos (β – glucana) que são encontrados de forma natural distribuídos na natureza (STONE ; CLARKE, 1992). Vários autores já isolaram β – glucana (com diferentes princípios ativos) de diversas fontes naturais, como Fujimoto et al. (1988) que isolou GRM de *Grifola frondosa*; Ohno et al. (1986) que isolou SSG e TSG de *Sclerotinia sclerotiorum*; Saito et al. (1992) que isolou OL-2 de

Omphalia lapidescens; Minura et al. (1985) que isolou PVS e PVG de *Peziza vesiculosa* e finalmente Ohno et al. (2000) que isolou SCG de *Sparassis crispa*.

Kawagishi et al. (1989) foram os primeiros pesquisadores a isolar uma substância anticancer purificada com extrato de hidróxido de sódio de cogumelos *Agaricus blazei*. Os autores verificaram a presença de polissacarídeos com aparente atividade anticancer, com fração principal sendo FIII-2-b, composta por um complexo de proteína de 43,4% e de carboidratos de 50,2%. A fração FIII-2-b consistia de cadeias simples de (1-6)- β -D-glucopyranosyl (FIRENZUOLI et al., 2007).

Uma importante contribuição da atividade anticancer de proteínas da fração FIII-2-b, foi verificada por sua completa perda de atividade após a formolysis (OHNO et al., 2001). Um pouco mais adiante, os pesquisadores italianos (FIRENZUOLI et al., 2007), chamavam a atenção sobre a quantidade de α -glucana e β -glucana em basidiomas com diferentes estágios de desenvolvimento, enfatizando que a produtividade e a diversidade estrutural da glucana aumentavam conforme aumentava o estágio de maturação do cogumelo. Portanto, a colheita e a conservação dos cogumelos são de extrema importância para se obter um extrato de qualidade, dados que quase sempre não são relatados em artigos científicos.

4.5.1 β -glucana

Glucanas são polissacarídeos com ramificações β (1-6) como encontrado por Ohno et al. (2001), que descreveu que a fração ativa das β -glucanas dos cogumelos tinham uma estrutura β (1-6) (ou centro funcional) com ramificações laterais β (1-3) na proporção de 1: 2; enquanto que linear β (1,6) glucana parece ser inativo (Figura 4).

A importância biológica das ramificações laterais de β (1-3) foi confirmada e demonstrada aumentando a atividade imunomoduladora dos polissacarídeos (DONG et al., 2002). Mizuno et al. (1990) relataram a importante atividade antitumoral relacionada com a “fração-solúvel” β (1-6)-(1-3) D-glucana. Entretanto, um aumento significativo de “fração-solúvel” com aparente atividade antitumoral, ocorre durante a maturação do cogumelo (MIZUNO et al., 1990), indicando que cogumelos com o píleo aberto deverão ser selecionados sobre os com o píleo fechado para a produção de nutracêuticos, pois estes possuirão uma quantidade maior de glucanas (CAMELINI et al., 2005).

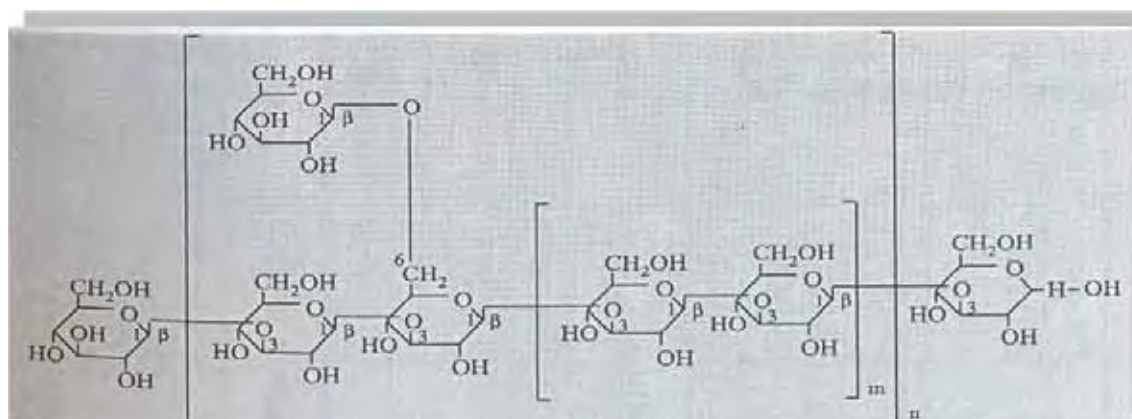


Figura 4. Estrutura β (1-6) (ou centro funcional) com ramificações laterais β (1-3) (EIRA, 2003).

Ainda complementando a discussão de cadeia e ramificações de glucanas, Mizuno et al. (1998) ressaltaram que o complexo glucana ∞ -1,6 e ∞ -1,4 e a glucomananos são as principais cadeias de β -1,2-ligado a resíduos de D-manonopipyransyl e têm estas sido isolados de cogumelos e detectados como inibidor de tumor.

Durante o período de 1999 a 2003, na FCA/UNESP foi desenvolvido um Projeto Temático financiado pela FAPESP, intitulado “Cogumelos comestíveis e medicinais: tecnologia de cultivo, caracterização bioquímica e efeitos protetores dos cogumelos *Agaricus blazei* MURRILL (Cogumelo-do-Sol) e *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake)”, Processo nº 98/07726/5, em que se realizaram algumas análises e estudos com relação à quantidade de polissacarídeos (β – glucana) em basidiomas de *A. blazei* (Tabela 5).

Tabela 5. Análises enzimáticas de β – glucana em amostras de *A. blazei* (ABL), em “teste cego” (amostras identificadas por código inacessível ao laboratório – triplicadas de 1 a 3).

Amostras	Linhagem	cor do pó	mg de β – glucana
1	ABL – 99/28	marrom-amarelado	22,37
2	ABL – 99/28	marrom-amarelado	44,74
3	ABL – 99/28	marrom-amarelado	52,96
Média			40,02
Desvio Padrão			15,83

Fonte: EIRA, 2003.

Nesta época, Eira contestava que a quantidade de β – glucana presente nos basidiomas poderiam variar em função das condições de cultivo, composição do substrato, tipo de linhagem, etc. (EIRA, 2003). Vários outros fatores também podem influenciar a concentração de β – glucana em basidiomas de *A. blazei*, tais como: o local do cultivo (campo ou estufa), a qualidade do composto, a frequência pluviométrica, a variação brusca da temperatura e a quantidade de pragas no cultivo. Estes mesmos fatores têm afetado o teor de β – glucana em cultivos de cereais (PARK et al., 2003).

A quantidade de luz no ambiente de cultivo (LUX), tipo de camada de cobertura, duração do ciclo de produção, número de cogumelos colhidos por massa de composto e tempo de armazenamento dos basidiomas desidratados pós-colheita, também podem ser possíveis fatores que influenciam a qualidade do produto final para utilização como fármaco.

CAPÍTULO I

Método de compostagem “Indoor” para o cultivo de *Agaricus subrufescens* e características químicas dos basidiomas.

Método de compostagem “Indoor” para o cultivo de *Agaricus subrufescens* e características químicas dos basidiomas.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do processo de compostagem “Indoor” no comportamento agrônômico do *A. subrufescens* e nas características químicas dos basidiomas, sendo analisados os cogumelos “in natura”, desidratados e liofilizados. Para isso, o experimento constou de 3 compostos (providos de diferentes centrais de compostagem “Indoor”, os quais foram produzidos através de métodos distintos), com 5 repetições cada tratamento. O fator composto afetou a produtividade e o número de basidioma, porém não afetou a massa de basidiomas, a precocidade e o tempo para o primeiro fluxo. O processo de compostagem para o cultivo de *A. subrufescens* não está totalmente conhecido, sendo necessárias maiores pesquisas com enfoque de manejo, métodos e formulações a serem utilizadas para a produção de composto. O método de desidratação de basidiomas para sua conservação se mostrou eficiente (pouca mudança nas características químicas dos cogumelos foram observadas) e não possui um custo elevado de processamento quando comparado com o método de liofilização.

Palavras-chave adicionais: *Agaricus subrufescens*, composto, caracterização química, basidiomas liofilizados.

Composting "Indoor" method for cultivation of *Agaricus subrufescens* and chemical characteristics of the basidiocarps.

ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the influence of the composting "Indoor" process in the agronomic performance (yield, number and weight of basidiocarps, precociousness and earliness) of *A. subrufescens* and their chemical characteristics, been analyzed the mushroom "in natura ", dehydrated and freeze-dried. The experiment followed a simple factorial with 3

composts (coming from different composting "Indoor" installations, which were produced through varied methods) with five replicates per treatment. The compost factor affected the yield and the number of basidiocarps, but not affected the weight of the basidiocarps, the precociousness and the earliness. The compost process for the cultivation of *A. subrufescens* is still unknown, requiring further research with management approaches, methods and formulations to be used for the production of the compost. The method of dehydration of the basidiocarps for its conservation is efficient (little change in the chemical characteristics of the mushrooms was checked) and does not have a high cost of production when compared to the free-dried.

Additional keywords: *Agaricus subrufescens*, compost, chemical characterization, free-dried mushroom.

INTRODUÇÃO

Desde os primeiros ensaios realizados em 1980 pelo engenheiro agrônomo Takatoshi Furumoto, a produção de *Agaricus subrufescens* Peck [*A. blazei* (Murrill) ss. Heinemann] era realizada em base as práticas de cultivos adotadas para a produção do *Agaricus bisporus*. Até os dias de hoje, pouco se conhece especificamente sobre técnicas de cultivo a serem adotadas e conduzidas para se obter produtividade elevada (15-25%), com precocidade reduzida (70% da produção total na primeira metade do cultivo), fluxos curtos (4 dias de colheita) e concentrados (intercalados por 4 ou 6 dias), menor ciclo de cultivo (60-70 dias), com custo de produção reduzido durante todas as épocas do ano.

No Brasil, o processo de compostagem tradicional vem sendo amplamente realizado pelos fungicultores, as quais incluem as etapas de pré-umedecimento (± 6 dias), "fermentação" (formação da meda com medidas de 2 m de largura x 2 m altura, com intervalos de reviradas a cada 2-3 dias), pasteurização ($58 \pm 2^\circ\text{C}$) e condicionamento físico, químico e biológico ($47 \pm 2^\circ\text{C}$) (EIRA, 2003). As matérias-primas mais utilizadas, como parte volumosa do composto são: bagaço de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), diversas gramíneas (*Brachiaria* sp, *Cynodon dactylon*, *Panicum maximum*, etc), palhas de cereais (*Triticum aestivum*, *Avena sativa*, *Oryza sativa*, etc.) e esterco. Já como materiais concentrados (fonte de nitrogênio ou

não), utilizam-se farelos de soja, trigo, milho, algodão, uréia, sulfato de amônio, superfosfato simples, carbonato de cálcio e gesso (ZIED et al., 2009a).

Em 1986 foi proposto o primeiro método de compostagem utilizando o sistema “Indoor” para a produção de Champignon (LABORDE et al., 1986), posteriormente chamado de “controlado ambientalmente” (MILLER et al., 1990) e “acelerado” (NAIR e PRICE, 1991), com o objetivo de adiantar o processo, reduzir as zonas de anaerobiose e o mau cheiro, diminuir a perda de material, reduzir o espaço físico das operações e o uso de máquinas (FERMOR, 1993) e principalmente, aumentar a eficiência do processo e a produtividade. Produtividade esta, uma consequência direta da qualidade operativa praticada durante o processo de compostagem, tanto com relação ao desenho teórico da formulação, quanto também da estrutura física existente e utilizada (RANDLE e HAYES, 1972).

Tão importante quanto à produtividade, à qualidade final dos cogumelos (aspectos físicos, químicos e biológicos dos basidiomas) também deve ser levada em consideração. Quanto ao aspecto físico, tem-se: tamanho, grau de maturação, ausência de pragas e doenças, etc.; aspecto químico: quantidade de β -glucana, ausência de metal pesado, presença elevada de proteínas e minerais, etc.; e aspecto biológico: ação bactericida, antitumoral, antioxidante, etc.

Em geral é difícil comparar os resultados químicos obtidos e citados na literatura por diversos autores que trabalham com a mesma espécie, uma vez que são muitas as variáveis que influenciam a composição nutricional dos basidiomas (HERNÁNDEZ, 2008), tais como: diferença entre linhagens, composição do substrato, tipo de camada de cobertura, condições ambientais e métodos de cultivos. Somam-se a estes, a inexatidão inerente aos métodos de análise utilizados e a precisão relativa do analista (PARDO et al., 2010).

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do processo de compostagem “Indoor” no comportamento agrônômico do *A. subrufescens* e nas características químicas dos basidiomas, sendo analisados os cogumelos “in natura”, desidratados e liofilizados.

MATERIAL E MÉTODOS

Inóculo

Foi utilizada a linhagem ABL 99/30 que está armazenada na Micoteca do Módulo de Cogumelo (FCA/UNESP). Esta foi isolada no ano de 1999, na cidade de Piedade do cultivo comercial do Grupo Atushi, no Estado de São Paulo (Brasil). Esta linhagem caracteriza-se por apresentar cogumelos de tamanho médio, textura forte, produtividade elevada (10-18%), temperatura de frutificação um pouco mais baixa ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e quantidade de β -glucana entre 4,89-5,23 g 100g^{-1} de basidioma desidratado.

O meio de cultura utilizado para produção da matriz primária e secundária foi preparado através de fervura de 60 g substrato adicionado a 900 ml de água destilada e 15 g de ágar; em seguida, autoclavou-se 2 vezes por 30 minutos a 121°C , obedecendo a um intervalo de 24 horas. Após o resfriamento, procedeu-se à inoculação de *A. subrufescens*.

O substrato utilizado para a produção do inóculo foi à base de grãos de triticales (*Triticum secale*), gesso e calcário. Os grãos foram previamente cozidos e, em seguida, adicionados de calcário calcítico (20g kg^{-1}) e de gesso (160g kg^{-1}). Após a homogeneização, autoclavou-se por 3 horas a 121°C ; em seguida procedeu-se à inoculação do *A. subrufescens*. A metodologia utilizada seguiu os procedimentos adotados por Minhoni et al. (2005).

Compostagem (Fase I e II)

Foram utilizados 3 compostos, provindos de diferentes centrais de compostagem “Indoor” da Zona produtora de Champignon de Albacete (Espanha), os quais foram produzidos através de diferentes métodos e possuem características químicas distintas (Tabela 1).

- No primeiro composto, a palha de trigo foi umedecida por 6 dias, sem sofrer nenhum processo de revolvimento, as quais os fardos ainda permaneciam inteiros. Em seguida a palha foi misturada e transferida para o 1° Bunker, juntamente com o esterco de galinha e os ingredientes concentrados onde permaneceram por 5 dias, o composto foi outra vez misturado e transferido para outro 2° Bunker, por onde permaneceu por mais 5 dias; logo depois, o composto foi novamente misturado e transferido para o 3° Bunker onde permaneceu por mais 2 dias. A Fase II de compostagem durou 7 dias, sendo que o composto ficou 8 horas a 60°C e 6 dias a 45°C - 50°C .

- No segundo composto, a palha de trigo e o esterco de galinha foram umedecidos por 8 dias, sendo realizado 3 reviradas. Em seguida o composto foi transferido para o 1° Bunker, juntamente com os ingredientes concentrados onde permaneceram por 2 dias, o composto foi outra vez misturado e transferido para outro 2° Bunker, por onde permaneceu por mais 2 dias; logo depois, o composto foi novamente misturado e transferido para o 3° Bunker onde permaneceu por mais 2 dias. A Fase II de compostagem durou 7 dias, sendo que o composto ficou 13 horas a 57°C e 6 dias a 45°C-50°C.

- O terceiro composto, a palha de trigo e o esterco de galinha foram umedecidos por 6 dias, sendo realizado 3 reviradas. Em seguida o composto foi transferido para o 1° Bunker, juntamente com os ingredientes concentrados onde permaneceram por 2 dias, o composto foi outra vez misturado e transferido para outro 2° Bunker, por onde permaneceu por mais 2 dias; logo depois, o composto foi novamente misturado e transferido para o 3° Bunker onde permaneceu por mais 2 dias, finalmente o composto é transferido para o 4° Bunker onde permaneceu por 2 dias. A Fase II de compostagem durou 8 dias, sendo que o composto ficou 8 horas a 58°C e 7 dias a 45°C-50°C.

Inserir tabela 1 da página 42

Inoculação do composto e corrida do micélio

O composto foi inoculado com 1% de micélio da ABL 99/30, em relação à massa úmida de composto. Desta forma, 6 kg de composto, misturado homogeneamente com 600g de inóculo foram adicionados em uma caixa plástica previamente revestida com um filme plástico. Os compostos foram incubados em câmara climatizada, com ausência de luz, temperatura do composto de 28±2°C, umidade relativa de 50±10% e ausência de ventilação, por 15 dias.

Camada de cobertura

A cobertura utilizada foi uma mistura de solo + turfa negra (4:1, v/v), a qual foi adicionada de carbonato de cálcio para a correção do pH, umedecida até aproximadamente

42% e adicionada de formol na quantidade de 50 ml por m³ de cobertura. A tabela 2 apresenta as características físicas, químicas e biológicas da camada de cobertura.

Inserir tabela 2 da página 43

Com o micélio totalmente desenvolvido, o composto foi prensado e nivelado para a adição da camada de cobertura, até que a mesma atingisse 3 cm de altura; para isso, foram adicionados 2,6 litros por caixa plástica contendo 6 kg de composto. As caixas foram levadas à uma câmara climatizada, onde permaneceram por 8 dias à uma temperatura do ar de 26±1°C, do composto de 27±1°C, umidade relativa de 90±5% e teor de CO₂ a 2100 ppm.

Indução de primórdios e colheita

As variáveis ambientais foram controladas de maneira a se obter 4 fluxos de produção ao longo do cultivo. Para isso, as variáveis ambientais como temperatura, umidade relativa e aeração foram conduzidas conforme metodologia apresentada por Zied (2008). Na Figura 1 tem-se o comportamento das variáveis ambientais e o reflexo destas nos fluxos de produção.

Inserir Figura 1 da página 47

O tempo total de produção foi de 70 dias, sendo que aos 17 dias já se observava a presença de alguns primórdios. A colheita foi realizada de maneira manual, seguida de uma pré-limpeza dos basidiomas através de raspagem da base do estipe, para se retirar resíduos de material da camada de cobertura. Em seguida, os cogumelos foram identificados para avaliação da produtividade, tempo para o primeiro fluxo, precocidade, massa e número de basidiomas.

Processamento dos basidiomas

Os basidiomas foram lavados, com auxílio de uma bomba hidráulica e bicos de microaspersão; em seguida foram separados em três lotes. No primeiro, os cogumelos foram mantidos na forma “in natura”. No segundo, os cogumelos desidratados em uma estufa a 45°C

com fluxo de ar, até que os cogumelos permanecessem com a massa uniforme. No terceiro, os cogumelos foram congelados (-19°C) e, após um dia, liofilizados a vácuo de $5,2 \cdot 10^{-2}$ mB e temperatura de $-53 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 5 dias, até a homogeneização de massa dos basidiomas.

Desenho experimental e análise dos dados

O experimento foi realizado utilizando apenas uma linhagem e 3 compostos diferentes, totalizando 3 tratamentos. Cada tratamento consistiu de 5 repetições, cada repetição referente a uma caixa de composto com 6 kg. O programa estatístico Sisvar 3.2 foi utilizado para separar as médias obtidas pelos tratamentos e compará-las através do teste Tukey ($\leq 0,05$).

Variáveis analisadas

Os dados de cultivo foram avaliados pela produtividade (massa fresca de basidiomas dividida pela massa fresca do composto multiplicada por 100, expresso em %), número de basidiomas (contagem dos basidiomas colhidos), massa de basidiomas (massa fresca de basidiomas dividido pelo número de basidiomas, expressa em gramas), precocidade (produtividade obtida durante o tempo total de colheita dividido pela produtividade obtida na primeira metade do tempo total de colheita, multiplicada por 100, expressa em %) e tempo para o primeiro fluxo (tempo demorado para o primeiro fluxo após a cobertura, expresso em dias).

Foram analisadas as seguintes características químicas nos basidiomas: umidade (Mapa, 1994), proteína, extrato etéreo e cinza (ANSORENA, 1994), fibra (ANKOM, 2008), gordura (ANKOM, 2009; GONZALEZ et al., 1987) e celulose, hemicelulose, lignina e fibra solúvel em detergente neutro (ANKOM, 2005; ANKOM, 2006a; ANKOM, 2006b).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados na tabela 3, o composto 2 apresentou maior produtividade, aproximadamente 74% superior ao composto 3, e o maior número de basidiomas, aproximadamente 72% superior ao composto 3. A massa de basidiomas, a

precocidade e o tempo para o primeiro fluxo não apresentaram diferenças estatísticas em função do composto utilizado.

Inserir tabela 3 da página 44

Estes resultados podem ter sido influenciados pela maior relação C/N que o composto 2 possuía (18,8) e também pelo elevado valor de umidade do composto (675 g kg^{-1}). Kopytowski-Filho (2002) enfatiza que compostos com relação C/N maior, em torno de 40-33/1 (início da Fase I de compostagem) tendem a apresentar maior produtividade que compostos com a relação C/N em torno de 28-24/1 (início da Fase I de compostagem). Compostos com relação C/N final (após o processo de pasteurização e condicionamento) entre 18-20/1, teor de matéria orgânica reduzida e quantidade de cinzas elevada, também tendem a resultar em produtividades elevadas (ZIED et al., 2009b).

Desta forma, conclui-se que o processo de compostagem para o cultivo de *A. subrufescens* não está totalmente conhecido, sendo necessárias maiores pesquisas com enfoque de manejo (realização de compostagem “tradicional”, compostagem em Bunkers e Fase II e III juntos, etc.), métodos (produção de substrato compostado, esterilizado “axênico”, etc.) e formulações (variação na relação C/N, teor de N, cinzas, etc.) a serem utilizadas para a produção de composto.

Cabe ressaltar que compostos com a relação C/N menor apresentaram um tempo menor para o primeiro fluxo (média de 31,6 dias) quando comparados com os valores obtidos no experimento 2 (média de 41,9 dias) e no experimento 3 (média de 36,5 dias) desta tese (capítulo II e III); porém os valores de precocidade tenderam a ser inferiores (32%), enquanto que no experimento 2 foi de 53,8% e no experimento 3 foi de 71,7%, o que significa uma colheita mais precoce porém com a maior porcentagem de basidiomas colhidos na segunda metade do ciclo de cultivo (nos últimos 26 dias) (Figura 1).

Siqueira et al. (2009) também observaram a influência do tipo de composto nos valores de produtividade e eficiência biológica. Os autores trabalharam com um composto à base de bagaço de cana de açúcar e palha de Coastcross e outro à base de bagaço de cana de açúcar e sabugo de milho, o que resultou num teor de N final de 1,1 e 0,9%, respectivamente. Os autores concluíram que o composto a base de bagaço de cana e palha de Coastcross apresentou

um ganho de 31,7% e 31,6% de produtividade e eficiência biológica respectivamente, sobre o composto à base de bagaço de cana e sabugo de milho (SIQUEIRA et al. 2009).

De acordo com as tabelas 1 e 4, o composto 3 apresentou a maior quantidade de proteína no composto, o que provavelmente refletiu na maior quantidade de proteína nos basidiomas, ao contrario dos valores de cinzas verificados no composto e nos basidiomas. Com relação à quantidade de fibras, deve-se ressaltar que o processo de liofilização reduz estes valores, o que ocorre devido ao congelamento dos basidiomas, os quais formam cristais de água entre os tecidos dos basidiomas que acabam destruindo-os ficando assim danificados, mesmo após a secagem a $-53\pm 1^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 5 dias.

Inserir tabela 4 da página 45

Os valores de gordura verificados nos basidiomas “in natura”, demonstram um aumento nos basidiomas liofilizados e isto se deve pela presença da água nos corpos de frutificação onde se tinha em média 85% de água nos basidiomas “in natura”, 7,9% de água nos basidiomas desidratado e 5,9% de água nos basidiomas liofilizados. Quanto às características químicas analisadas nos basidiomas, estas obedeceram à ordem hemicelulose > celulose > lignina. A tabela 5 apresenta os resultados de proteína, cinza, fibra e gordura do cogumelo *A. subrufescens* do presente trabalho comparados com os obtidos por Hernández (2008), Andrade et al. (2008) e Pardo et al. (2010) para os cogumelos Shiitake e Champignon, respectivamente.

Inserir tabela 5 da página 46

Cabe ressaltar que se não for necessário os aspectos visuais favoráveis que os basidiomas liofilizados apresentaram, os quais praticamente não se alteram em relação ao basidioma in natura, o processo de liofilização não apresentou vantagens em relação ao processo de secagem por desidratação, pois as características químicas dos basidiomas analisados pouco foram influenciadas de acordo com o método de processamento.

CONCLUSÕES

- O fator composto afetou a produtividade e o número de basidioma, porém não afetou a massa de basidiomas, a precocidade e o tempo para o primeiro fluxo.

- O processo de compostagem para o cultivo de *A. subrufescens* não está totalmente conhecido, sendo necessárias maiores pesquisas com enfoque de manejo, métodos e formulações a serem utilizadas para a produção de composto.

- O método de desidratação de basidiomas para sua conservação se mostrou eficiente (pouca mudança nas características químicas dos cogumelos foram observadas) e não possui um custo elevado de processamento quando comparado com o método de liofilização.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. C. N.; MINHONI, M. T. A.; ZIED, D. C. Caracterização bromatológica de oito linhagens de *Lentinula edodes* (Shiitake) cultivadas em toras de *Eucalyptus grandis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 793-797, 2008.

ANKOM. **Method for determining acid detergent lignin m beakers**. Macedon, 2005. Technology method AK 8/05.

ANKOM. **Neutral detergent fiber in feeds: filter bag technique**. Macedon, 2006a. Technology method 6.

ANKOM. **Acid detergent fiber in feeds: filter bag technique**. Macedon, 2006b. Technology method 5.

ANKOM. **Crude fiber analysis in feeds by filter bag technique**. Macedon, 2008. Technology method 7. AOCS approved procedure Ba 6a-05.

ANKOM. **Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction**. Macedon, 2009. Technology method 2, AOCS Official Procedure Am 5-04

ANSORENA, J. **Sustratos: propiedades y caracterización**. Madrid: Mundi-Prensa, 1994. 172 p.

EIRA, A. F. **Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann.** Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2003. 308 p.

FERMOR, T. R. Applied aspects of composting and bioconversion of lignocellulosic materials: a overview. **International Bioterrorism and Biodegradation**, Suitland, v. 31, p. 87-106, 1993.

GONZÁLEZ, J., ALVIRA, P.; GONZÁLEZ, G. La cascarilla de arroz en la alimentación animal II: composición química-bromatológica. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 27, p. 139-149, 1987.

HERNÁNDEZ, M. Propiedades nutritivas del champiñón. In: AVANCES EM LA TECNOLOGIA DE LA PRODUCCIÓN COMERCIAL DEL CHAMPIÑÓN Y OTROS HONGOS CULTIVADOS, 3., 2008, Quintanar del Rey. **Anais...** Quintanar del Rey: Deputación Provincial de Cuenca. 2008. p. 117-138.

KOPYTOWSKI FILHO, J. **Relação C/N e proporção das fontes nitrogenadas na produtividade de *Agaricus blazei* Murrill e poder calorífico do composto.** 2002. 101 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

LABORDE, J. et al. Indoor static compost for mushroom (*Agaricus bisporus*, Lange Sing) cultivation. In: DEVELOPMENTS IN CROP SCIENCE 10: CULTIVATING EDIBLE FUNGI, 1986, Amsterdam. **Proceedings...** Amsterdam: Elsevier. 1986. p. 91-100.

MAPA. **Métodos oficiales de análisis.** Madrid: Servicio de Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 1994. 662 p.

MILLER, F. C. et al. Composting based on moderately thermophilic and aerobic conditions for the production of commercial mushroom growing compost. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Queensland, v. 30, p. 287-296, 1990.

MINHONI, M. T. A.; KOPYTOWSKI FILHO, J.; ANDRADE, M. C. N. **Cultivo de *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann.** 3. ed. Botucatu: FEPAF, 2005. 141 p.

NAIR, N. G.; PRICE, G. A composting process to minimize odour pollution. **Mushroom Science**, Dublin, v. 13, n. 1, p. 205-206, 1991.

PARDO, G. A. et al. Modeling the effect of the physical and chemical characteristics of the materials used as casing layers on the production parameters of *Agaricus bisporus*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 1, p. 1-8, 2010.

RANDLE, P.E.; HAYES, W.A. Progress in experimentation on the efficiency of composting and compost. **Mushroom Science**, London, v. 7, p. 789-795, 1972.

SIQUEIRA, F.G. et al. Cultivation of *Agaricus blazei* ss. Heinemann using different soils as source of casing materials. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, p. 827-830, 2009.

ZIED, D. C. **Camadas de cobertura com diferentes combinações de solos e ambientes de cultivo na produção do cogumelo *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann**. 2008. 120 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

ZIED, D. C. et al. Características generales, producción y comercialización de *Agaricus blazei* (Murril) ss. Heinemann (*A. brasiliensis*): una nueva alternativa de cultivo de hongo en España. In: JORNADAS TECNICAS DEL CHAMPIÑON Y OTROS HONGO CULTIVADOS EN CASTILLA-LA MANCHA, 5., 2009, Cuenca. **Actas...** Cuenca. 2009a. p. 1-19.

ZIED, D. C. et al. Produção de *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) em função de diferentes camadas de cobertura e substratos de cultivo. **Interciencia**, Caracas, v. 34, p. 437-442, 2009b.

Tabela 1. Características físico-químicas dos três compostos utilizados no presente experimento (final da Fase II de compostagem).

Variáveis analisadas	Composto 1		Composto 2		Composto 3	
pH, 1:5, v/v	7,35		7,24		7,51	
Umidade, g kg ⁻¹	678		675		668	
Nitrogênio, g kg ⁻¹	23,8		21,7		24,7	
Proteína, g kg ⁻¹	104,24		95,04		108,18	
Cinzas, g kg ⁻¹	245,5		294,5		297,1	
Matéria orgânica, g kg ⁻¹	754,5		704,5		702,9	
C/N	18,4		18,8		16,5	
Manejo realizado	Composto 1		Composto 2		Composto 3	
Fase I	Período	Revirada(s)	Período	Revirada(s)	Período	Revirada(s)
Pre-unedecimento	6 dias	0	8 dias	3	6 dias	3
Bunker 1	5 dias	1	2 dias	1	2 dias	1
Bunker 2	5 dias	1	2 dias	1	2 dias	1
Bunker 3	2 dias	1	2 dias	1	2 dias	1
Bunker 4	-	-	-	-	2 dias	1
Fase II	Período	Temperatura	Período	Temperatura	Período	Temperatura
Pasteurização	8 horas	60°C	13 horas	57°C	8 horas	58°C
Condicionamento	6 dias	45-50°C	6 dias	45-50°C	7 dias	45-50°C
Tempo total do processo	25 dias		21 dias		22 dias	

Tabela 2. Características físico-químicas da camada de cobertura utilizada.

Variáveis analisadas	Valores
Umidade, g kg ⁻¹	163
pH, 1:5, v/v	8,26
Condutividade elétrica, $\mu\text{s cm}^{-1}$	902
Densidade aparente “úmido”, g cm ⁻³	1,04
Densidade aparente “seco”, g cm ⁻³	0,87
Densidade real, g cm ⁻³	2,53
Porosidade total, ml l ⁻¹	850
Capacidade de retenção de água, kg kg ⁻¹	3,21
Nitrogênio total, g kg ⁻¹	11,6
Cinzas, g kg ⁻¹	561,1
Matéria orgânica, g kg ⁻¹	438,9
C/N	21,9
Cinza ativa, g kg ⁻¹	213
Carbonatos totais, g kg ⁻¹	482
Ácaros	Ausência
Nematoides	Ausência
Fungos competidores	Ausência

Tabela 3. Comportamento agronômico de *Agaricus subrufescens* (ABL 99/30) nos 3 compostos diferentes (média de 8 repetições).

Variáveis Analisadas	Composto		
	1	2	3
Produtividade, %	3,28 ab	4,7 a	1,22 b
CV, %		24,37	
DMS		2,69	
Média, %		3,06	
Número de basidioma, u	13,8 ab	21 a	5,8 b
CV, %		31,30	
DMS		14,58	
Média, u		13,5	
Massa de basidioma, g	27,24 a	19,41 a	10,92 a
CV, %		63,67	
DMS		17,23	
Média, g		19,19	
Precocidade, %	37,85 a	30,55 a	27,71 a
CV, %		57,82	
DMS		35,04	
Média, %		32	
Tempo para o primeiro fluxo, dias	26,8 a	28,7 a	38,0 a
CV, %		36,83	
DMS		17,69	
Média, dias		31,16	

Letras minúsculas comparam resultados em cada linha, ao teste Tukey $\leq 0,05$.

CV: coeficiente de variação.

DMS: diferença mínima significativa.

Tabela 4. Características físico-química de basidiomas “in natura”, desidratados e liofilizados.

Composto	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Basidioma	“in natura”			Desidratado			Liofilizado		
Umidade, %	85,4	85,3	84,1	8,51	7,92	7,95	7,99	5,85	4
Proteína, %	32,8	30,3	33,3	33,1	33,9	35,3	33,6	30,0	32,0
Cinza, %	7,06	5,87	6,13	6,71	6,93	6,23	6,49	8,64	6,41
Fibra, %	6,84	6,81	5,63	8,79	8,31	10,1	6,09	4,74	5,41
Gordura, %	0,86	0,97	1,13	1,98	2,21	2,26	2,92	2,23	2,01
Extrato etéreo, %	52,3	56,0	53,7	49,4	48,5	45,6	50,8	54,2	51
Celulose, %	6,84	6,60	6,91	8,58	7,71	6,86	7,44	8,91	7,01
Hemicelulose, %	19,6	19,1	17,5	15,3	17,7	21,9	18,8	22,8	21,0
Lignina, %	3,26	1,54	3,38	4,51	0,57	4,62	1,29	2,8	2,01
FSDN*, %	66,8	63,2	66,1	64,8	67,1	60,3	65,9	56,7	60,1

* Fibra solúvel em detergente neutro.

Tabela 5. Análise comparativa de nutrientes de *A. subrufescens* e outros cogumelos.

Nome do Cogumelo	Proteína, %	Cinza, %	Fibra, %	Gordura, %
<i>A. Subrufescens</i>	32,17	6,35	6,4	0,98
<i>L. edodes</i>	20,33	3,10	8,04	2,00
<i>A. bisporus</i>	23,22	12,62	20,41	5,2%

Fonte: Hernández (2008), Andrade et al. (2008) e Pardo et al. (2010).

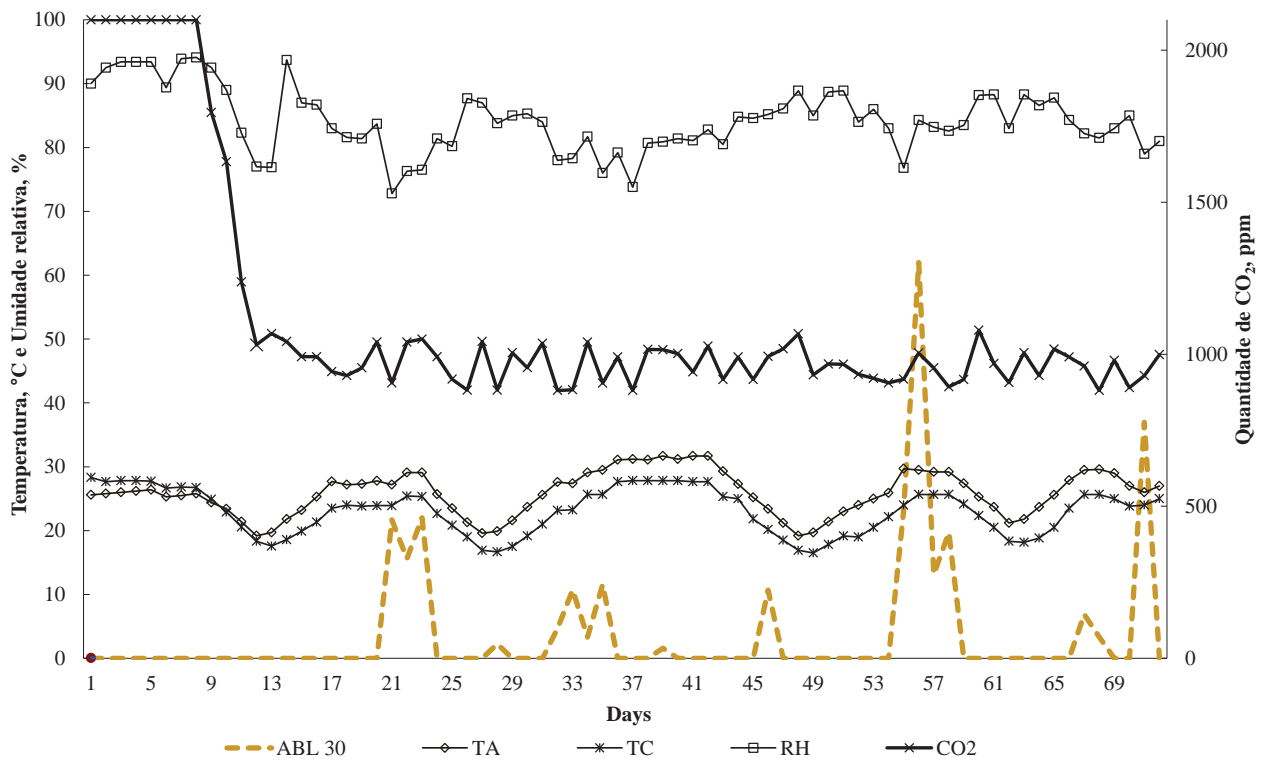


Figura 1. Variáveis ambientais e fluxos de produção durante 70 dias de cultivo, onde: ABL 99/30 indica a produção (gramas) colhida durante o período de cultivo; TA, significa temperatura do ambiente; TC, temperatura do composto; RH, umidade relativa e CO₂ quantidade de CO₂ do ambiente.

CAPÍTULO II

Estudo do comportamento agronômico de *Agaricus subrufescens*, em função da linhagem e do composto utilizado

Estudo do comportamento agrônômico de *Agaricus subrufescens*, em função da linhagem e do composto utilizado.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo comparar o comportamento agrônômico (produtividade, número e massa de basidioma, precocidade e tempo para a primeira colheita) e o potencial medicinal (β -glucana) de 5 linhagens de *A. subrufescens* cultivados em 3 compostos distintos. Para isso, o experimento constou de um fatorial duplo, com 5 linhagens diferentes (ABL 99/28, ABL 99/30, ABL 03/44, ABL 04/49 e ABL 06/59) e 3 compostos diferentes (à base de palha de Massai e bagaço de cana, palha de aveia e bagaço de cana e finalmente palha de Aruana e bagaço de cana), com 8 repetições por tratamento. Os fatores linhagem e composto afetaram todas as variáveis analisadas (produtividade, número de basidioma, precocidade, tempo para o primeiro fluxo e quantidade de β -glucana), exceto a massa média de basidiomas. As linhagens ABL – 99/30, 03/44 e 04/49 merecem extrema atenção e podem ser recomendadas para o cultivo de *A. subrufescens* devido ao comportamento agrônômico satisfatório e presença de β -glucana dentro dos valores médios obtidos pelos tratamentos. O composto pode ser preparado utilizando uma formulação adequada para se obter boa produtividade (sendo que um composto balanceado quimicamente correto apresenta pouca variação na produtividade e na quantidade de β -glucana).

Palavras-chave adicionais: potencial medicinal, linhagens, composto, produtividade, β -glucana.

Study of agronomic performance of *Agaricus subrufescens* according to the strain and the compost used.

ABSTRACT

The aim of the present work was to analyze the agronomic performance (yield, number and weight of basidiocarps, precociousness and earliness) and the medicinal potential (β -glucan) of 5 strains of *A. subrufescens* cultivated in 3 different composts. The experiment followed a

double factorial design with 5 different strains (ABL 99/28, ABL 99/30, ABL 03/44, ABL 04/49 and ABL 06/59) and 3 composts (based on Massai straw and sugar cane bagasse, oat straw and sugar cane bagasse and finally Aruana straw and sugar cane bagasse), with 8 replicates per treatment. The factors strains and composts affecting all variables analyzed (yield, number of basidiocarps, precociousness, earliness and amount of β -glucan), except the weight of basidiocarps harvested. The strains ABL - 99/30, 03/44 and 04/49 deserve serious consideration and may be recommended for the cultivation of *A. subrufescens* because of its good agronomic performance and presence of β -glucan within the average values obtained by the treatments. The compost may be prepared using a suitable formulation to obtain good yield (a compost chemically balanced shows little variation in yield and the amount of β -glucan).

Additional keywords: medicinal potential, strains, compost, yield, β -glucan.

INTRODUÇÃO

Muitos cogumelos comestíveis vêm ganhando importância na medicina moderna devido ao seu potencial medicinal. *Agaricus campestris*, *Flammulina melleae* e *Flammulina odilpis* são conhecidos por possuírem ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Escherichia coli* (BOSE, 1953). Uma grande variedade de atividades antifúngicas foi encontrada no *L. edodes*, *Cortinellus shiitake* e *Coprinus comatus* (BOHUS et al., 1961; HERMAN, 1962). Já no cogumelo gigante puffball (*Calvatia gigantea*), também foi encontrada uma substância antitumor, denominada “Calvacin” (BENEKE, 1963).

Agaricus subrufescens é sinônimo de *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) um fungo basidiomiceto chamado de “Cogumelo Medicinal”. Trata-se de uma espécie com propriedades medicinais, devido à presença de β -glucana que possui atividade inibitória tumoral (ZIED et al, 2011). Este cogumelo é comercializado em muitos países como produto nutracêutico, encaixando-se numa nova classe de suplementos dietéticos, que inclui extrato parcialmente refinado e biomassa desidratada do cogumelo em cápsulas ou comprimidos (CHANG e BUSWELL, 1996).

Na literatura consultada, existe muita controvérsia em relação às substâncias medicinais encontradas no *A. subrufescens*. Camelini et al. (2005) ressaltaram que a qualidade nutricional

de extratos depende da composição química dos cogumelos, particularmente em relação ao conteúdo de β -glucanas. Kawagishi et al. (1989) caracterizaram β -glucanas com propriedades antitumorais de *A. blazei* e detectou um alcalóide solúvel β (1 \rightarrow 6) D-glucan, sem relações β (1 \rightarrow 3). Já Mizuno et al. (1990), utilizaram o método de extração aquoso e identificaram β (1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3) D-glucanas na mesma espécie de *A. blazei*. Outros componentes químicos, incluindo esteróides (OSAKI et al., 1994; TAKATU et al., 2001), lectina (KAWAGISHI et al., 1988) e uma série de polissacarídeos (OHNO et al., 2001), vêm sendo amplamente estudadas.

Desta forma, verifica-se grande preocupação da comunidade científica sobre quais são as substâncias realmente ativas nos cogumelos com propriedades medicinais, deixando-se de lado características agrônômicas e fisiológicas importantes envolvidas no processo de produção e que poderiam estar influenciando as características químicas dos cogumelos. Eira (2003) ressalta a importância da utilização de amostras de origem controlada em experimentos. Segundo o autor, quando se utilizam amostras genéricas (origem não controlada) a interpretação dos resultados obtidos não pode ser definitiva, pois as condições de cultivo, composição do substrato, etc., são possíveis fatores interferentes e que deveriam ser controlados num experimento que vise comparar as propriedades nutritivas e funcionais das linhagens ou o ponto de colheita do cogumelo (EIRA, 2003).

Com base nas características fisiológicas de *A. blazei*, Camelini (2005) caracterizou o rendimento de glucanas solúveis em água e a quantidade de proteína em diferentes estágios de desenvolvimento de cogumelos desidratados (peso seco). O autor encontrou variações em teores de β -glucana = 42 mg g⁻¹ (cogumelos imaturo), 43 mg g⁻¹ (cogumelos e esporos imaturos) e 40 mg g⁻¹ (cogumelos e esporos maduros). A quantidade de proteína aumentou com o grau de maturação dos cogumelos analisados (CAMELINI et al., 2005).

Park et al. (2003), visando comparar a quantidade de β -glucana em basidiomas cultivados no Brasil e no Japão, utilizaram em seus estudos, cogumelos produzidos no Brasil em estufas e a campo, e cogumelos produzidos no Japão em estufas. Concluíram que o *A. blazei* cultivado em estufa apresentam menor quantidade de β -glucana (7,6 \pm 2,8g 100g⁻¹ de cogumelo produzido no Japão e 8,4 \pm 0,9g 100g⁻¹ de cogumelo produzido no Brasil) que os cultivados a campo (10,1 \pm 2,1g 100g⁻¹ de cogumelo). Os autores não descreveram se todos os basidiomas analisados eram da mesma linhagem. Firenzuoli et al. (2007) ressaltaram a ausência de trabalhos científicos que abordem dados concretos sobre as características dos

cultivos, bem como o comportamento agrônômico e fisiológico das linhagens de *A. blazei* utilizadas em pesquisas farmacológicas, bioquímicas e medicinais.

Entretanto, o cultivo de *A. subrufescens* no Brasil é basicamente conduzido entre adaptações das práticas adotadas na produção de *A. bisporus* e adoção de manejos e técnicas de resultados de pesquisas publicados recentemente (KOPYTOWSKI e MINHONI, 2004; ZIED e MINHONI, 2009; ZIED et al., 2010; COLAUTO et al., 2010). No Brasil, ainda não existe nenhum protocolo de cultivo ou guia com esclarecimentos sobre as práticas de cultivo que influenciam a presença de substâncias ativas nos cogumelos colhidos, sempre tendo em vista também o comportamento agrônômico do *A. subrufescens*, visando a viabilidade do cultivo e à sustentabilidade da atividade.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo comparar o comportamento agrônômico (produtividade, número e massa de basidioma, precocidade e tempo para a primeira colheita) e o potencial medicinal (β -glucana) de 5 linhagens de *A. subrufescens* cultivados em 3 compostos distintos.

MATERIAL E MÉTODOS

Inóculo

Foram utilizadas 5 linhagens comerciais de *A. subrufescens*, conservadas na Micoteca do Módulo de Cogumelos (FCA/UNESP). As principais características destas são descritas na Tabela 1. Todos os processos de produção de inóculo seguiram os passos adotados no Capítulo I desta Tese; metodologia apresentadas por Andrade et al. (2007) e Zied et al. (2010).

Inserir tabela 1 da página 62

Compostagem (Fase I e II)

O método utilizado para a produção do composto foi o “tradicional” com duração de 26 dias de Fase I, sendo realizado um processo de pré-umedecimento de 7 dias e um processo de

fermentação de 19 dias, com 6 reviradas. A Fase II de compostagem durou 9 dias (8 h a $59\pm 1^{\circ}\text{C}$, pasteurização, e 8 dias a $47\pm 2^{\circ}\text{C}$, condicionamento). Os três compostos foram preparados ao mesmo tempo e obedeceram estes padrões para sua produção. Na Tabela 2 tem-se os materiais utilizados em cada composto e suas respectivas características químicas após o final da Fase II de compostagem. A relação C/N inicial do composto, no momento da montagem da leira, foi previamente calculada para 33-37/1.

Inserir tabela 2 da página 63

Inoculação do composto e corrida do micélio

Após o processo de pasteurização e condicionamento, o composto foi misturado com o inóculo e disposto em caixas plásticas contendo 12 kg de composto e 120 g de inóculo. Em seguida, incubaram-se os três tipos de compostos inoculados com as 5 linhagens de *A. subrufescens*, em câmara climatizada, na ausência de luz, temperatura do composto de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $50\pm 10\%$ e ausência de ventilação, por 21 dias. Durante este período, visitas periódicas foram realizadas para se verificar o crescimento miceliano das linhagens e também, eventuais contaminações dos compostos oriundas por pragas e microrganismos.

Camada de cobertura

A cobertura utilizada foi uma mistura de solo + carvão vegetal (4:1, v/v), a qual foi adicionada de calcário calcítico para a correção do pH, umedecida até aproximadamente 35% e pasteurizada com calor úmido por 12 horas a 58°C . O solo utilizado neste trabalho seguiu os parâmetros de qualidade apresentados por Zied (2008), como: teor de areia de 427 g kg^{-1} , de silte de 395 g kg^{-1} , de argila de 178 g kg^{-1} , de Al + H de $9,6\text{ mmol}_c\text{ dm}^{-3}$, de V% de 92% e de Mg^{+2} de $3\text{ mmol}_c\text{ dm}^{-3}$.

Com o micélio totalmente desenvolvido, o composto foi prensado e nivelado para a adição da camada de cobertura, até que a mesma atingisse 5 cm de altura. Para isso foram adicionados 12,5 litros por caixa plástica contendo 12 kg de composto. As caixas foram levadas a uma estufa com filme plástico leitoso, com controle parcial da temperatura, da

umidade relativa e da aeração. Durante o cultivo, a temperatura do ar variou de 10-40°C, a do composto de 18-32°C e a umidade relativa de 35-100%.

Indução de primórdios e colheita

A indução de primórdios ocorreu de maneira natural, de acordo com as condições climáticas do dia ou da semana. O tempo total de produção foi de 120 dias, sendo que aos 21 dias já se observava a presença de alguns primórdios. De acordo com a linhagem e o composto utilizados, os fluxos de colheita variaram de 2 (linhagem ABL 99/30 inoculado no composto 1) a 7 (linhagem ABL 03/44 inoculado no composto 3), durante o cultivo.

A colheita foi realizada de maneira manual, seguida de uma pré-limpeza dos basidiomas através de raspagem da base do estípite, para se retirar resíduos de material da camada de cobertura. Em seguida, os cogumelos eram identificados para avaliação da produtividade, tempo para o primeiro fluxo, precocidade, massa e número de basidiomas.

Desenho experimental e análise dos dados

O experimento foi realizado em esquema fatorial duplo, com 5 linhagens de *A. subrufescens* (ABL 99/28, 99/30, 03/44, 04/49 e 06/59) e 3 compostos (Massai e bagaço de cana de açúcar, Aveia e bagaço de cana de açúcar e Aruana e bagaço de cana de açúcar) em um delineamento inteiramente casualizado com 8 repetições por tratamento, cada repetição consistia em uma caixa com 12 kg de composto. O programa estatístico Sisvar 3.2 foi utilizado para separar as médias obtidas e compará-las através do teste Tukey ($\leq 0,05$). Finalmente, correlações lineares entre os valores de produtividade, número e massa de basidiomas, precocidade, tempo para o primeiro fluxo e quantidade de β -glucana nos basidiomas, foram realizadas com o programa estatístico Sigma Stat 3.5.

Variáveis analisadas

Os dados de cultivo foram avaliados pela produtividade (massa fresca de basidiomas dividida pela massa fresca do composto multiplicada por 100, expresso em %), número de

basidiomas (contagem dos basidiomas colhidos), massa de basidiomas (massa fresca de basidiomas dividido pelo número de basidiomas, expressa em gramas), precocidade (produtividade obtida durante o tempo total de colheita dividido pela produtividade obtida na primeira metade do tempo total de colheita, multiplicada por 100, expressa em %) e tempo para o primeiro fluxo (tempo demorado para o primeiro fluxo após a cobertura, expresso em dias).

A metodologia utilizada para análise de β -glucana nos basidiomas, seguiu as etapas propostas por Prosky et al. (1988) e modificados pela “Foundation of Japanese Food Analysis Center” (1980), posteriormente descritos por Park et al. (2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, verificou-se que a linhagem ABL 99/30 apresentou a maior produtividade e o maior número de cogumelos. Já a linhagem ABL 06/59 apresentaram a menor produtividade e o menor número de cogumelos, porém estes com massa elevada (apesar de não diferenciar estatisticamente).

Estes resultados podem ser explicados pela correlação apresentada na Tabela 4, onde a produtividade apresentou correlação positiva ($r = 0,993$) com o número de basidiomas e negativa ($r = -0,742$) com a massa unitária dos basidioma. O tipo de composto não influenciou a produtividade e número de cogumelos, quando analisados isoladamente.

Resultados diferentes foram obtidos por González Matute et al. (2010), que verificaram diferença na produtividade em função da formulação do substrato. Os autores trabalharam com: casca de semente de girassol, composto exaurido, composto de vermiculita, turfa de musgo e resíduos de cervejaria e relação C/N variando de 40 a 71/1.

Inserir tabela 3 da página 64

Apesar da correlação encontrada na Tabela 4 entre produtividade, número e massa de basidioma, os valores de massa de basidioma não diferiram significativamente entre as linhagens e os compostos; isto se deve aos elevados coeficiente de variação obtido para os valores de produtividade (64%), número de basidiomas (80,47%) e massa de basidiomas (37,65%).

Inserir tabela 4 da página 66

As linhagens ABL 99/30, ABL 03/44 e 04/49 apresentaram produtividade média e número médio de basidiomas acima da média dos tratamentos (9,81% e 73,35 u). Por outro lado, as linhagens ABL 99/29 e 06/59 apresentaram massa média de basidioma acima da média obtida pelos tratamentos (18,07 g).

Kopytowski Filho (2006), pesquisou 3 compostos diferentes e 2 linhagens, e não verificou diferença significativa na interação no que diz respeito à produtividade; porém quando analisou os fatores (composto vs linhagem) isoladamente, a linhagem ABL 99/30 apresentou maior produtividade que a ABL 04/49 e o composto orgânico também apresentou maior produtividade que o composto sintético e semi-sintético.

Com relação a precocidade, as linhagens ABL 06/59 e 99/30 apresentaram os maiores valores destacando-se quando comparados a média dos tratamentos (53,85%), sendo que a maior parte da produtividade concentrou-se nos primeiros 47 dias de colheita após a formação dos primórdios. Cabe ressaltar que os valores de precocidade apresentaram correlação positiva (0,835) com a massa de basidioma, o que significa que a produção que ocorre na primeira metade do ciclo de cultivo apresenta cogumelos com massa elevada, nas condições experimentadas.

Zied et al. (2009), estudaram 2 compostos diferentes (à base de Tifton “T” e aveia “A”) e 3 camadas de coberturas (gel de acrilamida “gel”, solo + carvão “c” e suplementado com farelo de soja “f”) obtiveram os seguintes valores de precocidade: Tgel (75%) > Ac (61%) > Agel (58%) > Af (57%) > Tf (53%) > Tc (51%).

A linhagem utilizada pelos autores (ZIED et al., 2010) foi a ABL 04/49, o que resultou numa maior precocidade quando comparada com a observada no presente experimento, que também utilizou-se a linhagem ABL 04/49, o composto à base de aveia e a cobertura controle “solo + carvão”, porém os valores aqui obtidos foram menores (precocidade = 37,95%), os quais podem ter sido influenciados pelas condições ambientais da semana ou do mês.

Com relação ao tempo para o primeiro fluxo, as linhagens ABL 99/30, 03/44 e 06/59 destacaram-se, sendo que apenas a linhagem ABL 03/44 apresentou maior tempo para o primeiro fluxo quando cultivada no composto à base de palha de Massai e bagaço de cana. O

fator composto também influenciou esta variável analisada, como pode ser observado o caso do composto à base de palha de Aruana e bagaço de cana, o qual apresentou pouca adaptação com a linhagem ABL 99/28, resultando num tempo para o primeiro fluxo elevado e precocidade e produtividade baixas.

A quantidade de β -glucana presente nos basidiomas não foi influenciada pela produtividade, número e massa de basidiomas, precocidade e tempo para a primeira colheita (Tabela 4). Porém, a linhagem utilizada e o tipo de composto influenciaram esta variável, sendo que as linhagens ABL 99/30, 03/44 e 04/49 cultivadas no composto à base de palha de Aruana e bagaço de cana de açúcar, apresentaram diferenças significativas.

Desta forma, podemos adotar os valores médios obtidos pelos tratamentos (5,19 g 100g^{-1} de cogumelo) para propor um nível aceitável de β -glucana presente nos basidioma a serem exportados. De maneira que, se isolarmos o fator linhagem, teríamos uma variabilidade de 35,8% e se separarmos o fator composto, teríamos uma variabilidade de 9,9% nos valores de β -glucana. Sendo assim, é de fundamental importância a escolha da linhagem a ser utilizada de acordo com o tipo de matéria prima a ser selecionada para a produção do composto.

Wang et al. (2010) testaram 6 diferentes formulações de substratos na produção de *A. blazei*, variando o teor de N final do composto entre 1,2 – 1,55% e não encontraram diferença significativa no valor final dos polissacarídeos nos basidiomas. Os mesmos autores utilizaram como matéria prima para a produção dos compostos: palha de aspargos, casca de algodão, esterco, torta de soja e gesso (WANG et al., 2010).

CONCLUSÕES

- Os fatores linhagem e composto afetaram todas as variáveis analisadas (produtividade, número de basidioma, precocidade, tempo para o primeiro fluxo e quantidade de β -glucana), exceto a massa média de basidiomas.

- As linhagens ABL – 99/30, 03/44 e 04/49 merecem extrema atenção e podem ser recomendadas para o cultivo de *A. subrufescens* devido ao comportamento agrônomico satisfatório e presença de β -glucana dentro dos valores médios obtidos pelos tratamentos.

- O composto pode ser preparado utilizando uma formulação adequada para se obter boa produtividade (sendo que um composto balanceado quimicamente correto apresenta pouca variação na produtividade e na quantidade de β -glucana).

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. C. N. et al. Productivity, biological efficiency, and number of *Agaricus blazei* mushrooms grown in compost in the presence of *Trichoderma* sp. and *Chaetomium alivacearum* contaminants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 243-247, 2007.

BENEKE, E. A. Clavatia, clavacin and cancel. **Mycologia**, Corvallis, v. 55, p. 227-270, 1963.

BOHUS, G.; GALZ, C.; SEHELBER, E. The antibiotic action of higher fungi on resistant bacteria and fungi. **Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, Budapest, v. 12, p. 1-12, 1961.

BOSE, S. R. Antibacterial substances from some higher fungi in India. **Indian Journal of Pharmacy**, Maharashtra, v. 15, 179-291, 1953.

CAMELINI, C. M. et al. Structural characterization of β -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. **Biotechnology Letters**, Loughborough, v. 27, p. 1295-1299, 2005.

CHANG, S. T.; BUSWELL I, A. Mushroom nutraceuticals. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 12, p. 473- 476, 1996.

COLAUTO, N. B. et al. Alternative to peat for *Agaricus brasiliensis* yield. **Bioresource Technology**, Trivandrum, v. 101, p. 712-716, 2010.

EIRA, A. F. **Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2003. 308 p.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Kansas, v. 5, n. 1, p. 3-15, 2007.

FOUNDATION OF JAPANESE FOOD ANALYSIS CENTER. No 398040072-001 52-1. Yoyogi-Machi, Shibuyo-Ku, Tohyo, Japan, 1980.

GONZÁLEZ MATUTE, R.; FIGLAS, D.; CURVETTO, N. *Agaricus blazei* production on non-composted substrate based on sunflower seed hulls and spent oyster mushroom substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 27, n. 6, p. 1331-1339, 2011.

HERMAN, H. Cortinellin, Aine antibiotisch wirksam substanz aus *Cortinellus* Shiitake. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 49, p. 542, 1962.

KAWAGISHI, H. et al. Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. **Carbohydrate Research**, Knoxville, v. 183, p. 150-154, 1988.

KAWAGISHI, H. et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, Knoxville, v. 86, p. 267-273, 1989.

KOPYTOWSKI FILHO, J. **Produtividade e eficiência biológica de *Agaricus blazei* (Murrill) Heinemann, em diferentes condições de cultivo**. 2006. 134 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

KOPYTOWSKI FILHO, J.; MINHONI, M. T. A. C/N ratio on yield of *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann. **Mushroom Science**, Pennsylvania, v. 16, p. 213-220, 2004.

MIZUNO, T. et al. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 54, p. 2889-2896, 1990.

OHNO, N. et al. Antitumor β -glucan from the cultured fruit body of *A. blazei*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Gifu, v. 24, p. 820-828, 2001.

OSAKI, Y. et al. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a basidiomycete *Agaricus blazei*, Jun-17. **Yakugaku Zasshi**, Shibuya, v. 114, n. 5, p. 342-345, 1994.

PARK, Y. K. et al. Determinação da concentração de β -glucana em cogumelos *Agaricus blazei* Murril por método enzimático. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 312-316, 2003.

PROSKY, L. et al. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food-products interlaboratory study. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, New York, v. 71, p. 1017-1023, 1988.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murril and its mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, p. 1409-1413, 2001.

ZIED, D. C. **Camadas de cobertura com diferentes combinações de solos e ambientes de cultivo na produção do cogumelo *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann**. 2008. 120 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

ZIED, D. C.; MINHONI, M. T. A. Influência do ambiente de cultivo na produção do cogumelo *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*). **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 24, p. 17-36, 2009.

ZIED, D. C. et al. Produção de *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) em função de diferentes camadas de cobertura e substratos de cultivo. **Interciencia**, Caracas, v. 34, p. 437-442, 2009.

ZIED, D. C. et al. Production of *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) on different casing layers and environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 10, p. 1857-1863, 2010.

ZIED, D. C. et al. Medicinal mushroom growth as affected by non-axenic casing soil. **Pedosphere**, Jiangu, v. 21, n. 2, p. 146-153, 2011.

WANG, Q. et al. Yield, dry matter and polysaccharides content of the mushroom *Agaricus blazei* produced on asparagus straw substrate. **Scientia Horticulturae**, Pietermaritzburg, v. 125, p. 16-18, 2010.

Tabela 1. Codificação das linhagens, ano de coleta, Cidade, Estado, País e principais características específicas.

Codificação	Ano de coleta	Cidade de coleta	Estado	País	Características gerais
ABL 99/28	1999	Botucatu	São Paulo	Brasil	Linhagem mantida na micoteca do Módulo de Cogumelos, característico por apresentar tamanho médio, textura forte e produtividade regular a baixa.
ABL 99/30	1999	Piedade	São Paulo	Brasil	Cogumelo isolado de cultivo comercial do grupo Atushi, característico por apresentar tamanho médio a pequeno, textura forte, produtividade e precocidade elevada, tempo para o primeiro fluxo reduzido (± 38 dias), temperatura de frutificação um pouco mais baixa ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).
ABL 03/44	2003	Lençóis Paulista	São Paulo	Brasil	Cogumelo isolado de cultivo comercial da Fazenda Santa Fé, característico por apresentar tamanho médio, textura forte, tempo para o primeiro fluxo reduzido (± 40 dias), produtividade regular a elevada.
ABL 04/49	2004	São José do Rio Preto	São Paulo	Brasil	Cogumelo isolado de cultivo comercial do produtor Goto, característico por apresentar cogumelos de tamanho médio a grande, textura forte, produtividade regular a elevada, temperatura mais alta de produção ($\pm 28^{\circ}\text{C}$).
ABL 06/59	2006	Brasília	DF	Brasil	Cogumelo isolado de cultivo comercial enviado pela empresa Brasmicel, característico por apresentar cogumelos de tamanho grande, textura moderada, produtividade baixa, precocidade elevada e tempo para o primeiro fluxo reduzido (± 39 dias). Apresenta susceptibilidade elevada ao ataque de <i>Verticillium fungicola</i> e <i>Micogone perniciosa</i> .

Tabela 2. Materiais utilizados na formulação dos compostos (1, 2 e 3) e suas respectivas características químicas, ao final da Fase II de compostagem.

Composto	Peso seco dos materiais (kg)										Características químicas														
	Bagaço de cana	Aveia	Massai	Aruana	Farelo de soja	Uréia	Sulfato Amônia	Super Simples	Gesso	Calcário Calcítico	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	S	MO	C	Na	Cu	Fe	Mn	Zn	C/N	pH
											mg kg ⁻¹ matéria seca														
1	141	0	130	0	9,2	2	1,5	4	15	25	1,81	1	1,09	5,15	0,48	1,36	64	35,6	440	0	500	260	20	20/1	6,25
2	141	130	0	0	9,2	2,5	2,4	4	15	25	1,76	0,66	1,04	5,44	0,48	1,26	68	37,8	440	0	400	160	18	21/1	7,04
3	141	0	0	131	9,2	1	1	4	15	25	1,6	0,64	1,31	5,20	1,68	1,40	65	36,2	1160	172	400	306	212	23/1	6,94

Compostos: 1. Substrato preparado com bagaço de cana (*Saccharum officinarum*) e palha de Massai (*Panicum maximum* cv. Massai); 2. Substrato preparado com bagaço de cana (*Saccharum officinarum*) e palha de aveia (*Avena sativa*); 3. Substrato preparado com bagaço de cana (*Saccharum officinarum*) e palha de Aruana (*Panicum maximum* cv. Aruana).

Tabela 3. Comportamento agrônômico de *A. subrufescens*, e quantidade de β -glucana obtida nos basidiomas, em função do tipo de composto e da linhagem utilizada (média de 8 repetições).

Compostos ⁽¹⁾	Linhagem				
	ABL 99/28	ABL 99/30	ABL 03/44	ABL 04/49	ABL06/59
	Produtividade, %				
1	10,76 a AB	15,34 a A	12,89 a A	11,59 a AB	2,9 a B
2	7,97 a B	20,37 a A	9,83 a B	10,09 a B	3,66 a B
3	5,45 a B	16,13 a A	9,01 a AB	10,18 a AB	1,9 a B
CV, %	64				
DMS	7,46 [‡]		8,71 [†]		
Media, %	9,81				
	Número de cogumelos, u				
1	74,62 a AB	119,07 a A	99,08 a AB	85,53 a AB	18,51 a B
2	61,01 a B	154,92 a A	74,67 a AB	77,50 a AB	15,75 a B
3	47,87 a AB	128,71 a A	73,66 a AB	67,37 a AB	8,87 a B
CV, %	80,47				
DMS	70,13 [‡]		81,86 [†]		
Media, u	73,35				
	Massa de basidiomas, g				
1	17,72 a A	18,48 a A	14,95 a A	17,62 a A	19,55 a A
2	18,02 a A	16,78 a A	19,48 a A	16,60 a A	22,25 a A
3	19,54 a A	13,91 a A	14,84 a A	18,63 a A	22,55 a A
CV, %	37,65				
DMS	8,08 [‡]		9,43 [†]		
Media, g	18,07				
	Precocidade, %				
1	33,32 a B	57,71 a AB	33,06 a B	46,94 a B	100 a A
2	29,69 a B	63,68 a AB	40,11 a B	37,95 a B	100 a A

3	28,89 a B	59,86 a AB	24,65 a B	57,86 a AB	98,52 a A
CV, %			56,84		
DMS		36,37 [‡]		42,46 [†]	
Media, %			53,85		
Tempo para o primeiro fluxo, dias					
1	42,19 a A	39,60 a A	46,18 b A	47,15 a A	39,16 a A
2	40,80 a AB	36,92 a A	34,67 a A	45,26 a B	39,15 a AB
3	55,60 b B	39,54 a A	39,22 a A	44,29 a A	38,85 a A
CV, %			10,9		
DMS		6,94 [‡]		8,12 [†]	
Media, dias			41,91		
β -glucana, g 100 ⁻¹ de cogumelo desidratado					
1	4,73 a A	4,63 a A	4,01 b A	5,95 a A	7,79 a A
2	3,45 a A	5,10 a A	4,86 b A	3,62 a A	6,81 a A
3	3,04 a B	5,46 a AB	9,67 a A	4,83 a AB	3,90 a B
CV, %			44,37		
DMS		4,64 [‡]		5,45 [†]	
Media, g 100 ⁻¹			5,19		

⁽¹⁾ Compostos: 1. Substrato preparado com bagaço de cana (*Saccharum officinarum*) e palha de Massai (*Panicum maximum* cv. Massai); 2. Substrato preparado com bagaço de cana (*Saccharum officinarum*) e palha de aveia (*Avena sativa*); 3. Substrato preparado com bagaço de cana (*Saccharum officinarum*) e palha de Aruana (*Panicum maximum* cv. Aruana).

* Letras minúsculas comparam os resultados na mesma coluna e maiúscula na mesma linha ao teste Tukey (P ≤ 0,05).

[‡] Diferença mínima significativa para os valores na mesma coluna (comparação entre compostos).

[†] Diferença mínima significativa para os valores na mesma linha (comparação entre linhagens).

CV: coeficiente de variação.

DMS: diferença mínima significativa.

Tabela 4. Correlação entre as variáveis analisadas, valores em negrito apresentam um $r \geq 0,6$ e um $P \leq 0,05$.

Correlação	Produtividade	Número de basidiomas	Massa de basidiomas	Precocidade	Tempo para o 1º fluxo	β -Glucana
Produtividade	-	0,993 ⁽¹⁾ 0,0001 ⁽²⁾	-0,742 0,0350	-0,453 0,260	-0,0941 0,825	0,234 0,576
Número de basidioma	-	-	-0,756 0,030	-0,427 0,292	-0,109 0,797	0,171 0,685
Massa de basidioma	-	-	-	0,835 0,009	-0,420 0,300	0,0216 0,960
Precocidade	-	-	-	-	-0,523 0,183	-0,107 0,800
Tempo para o 1º fluxo	-	-	-	-	-	0,223 0,595

⁽¹⁾ Valor da correlação (r).⁽²⁾ Valor da probabilidade (P).

CAPÍTULO III

Estudo do comportamento agronômico de *Agaricus subrufescens*, em função da camada de cobertura e do ambiente de cultivo utilizado

Estudo do comportamento agronômico de *Agaricus subrufescens*, em função da camada de cobertura e do ambiente de cultivo utilizado.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência da camada de cobertura e do ambiente de cultivo no comportamento agronômico (produtividade, número e massa de basidioma, precocidade e tempo para o primeiro fluxo) e no potencial medicinal (β -glucan) do cogumelo *A. subrufescens*. Para isso, o experimento constou de um fatorial duplo com 4 camadas de cobertura diferentes (à base de solo misturado com carvão, fibra de coco, casca de *Pinus* compostada e turfa de musgo) e 4 ambientes de cultivo (câmara climatizada, com ausência de luz solar e 3 estufas com diferentes filmes plásticos), com 7 repetições cada tratamento. O fator cobertura e ambiente de cultivo afetaram a produtividade, número e a massa de basidioma, e o tempo para o primeiro fluxo; porém, não afetaram a precocidade e a quantidade de β -glucana nos basidioma. Apesar de não influenciar estatisticamente a cobertura é um fator que apresenta grande influência sobre os valores de β -glucana nos basidiomas e também no sucesso do comportamento agronômico dos cultivos, sendo uma boa sugestão a utilização de carvão vegetal e casca de *Pinus* adicionado ao solo (1:4, v/v). O ambiente de cultivo é um fator determinante junto aos valores de produtividade e uma das maiores fonte de desistência dos produtores em um cultivo comercial, sendo uma possibilidade a condução de cultivos em câmaras climatizadas, por não influenciar os valores de β -glucana nos basidiomas.

Palavras-chave adicionais: potencial medicinal, camada de cobertura, ambiente de cultivo, produtividade, β -glucana.

Study of agronomic performance of *Agaricus subrufescens* according to the casing layer and the environment of growing used

ABSTRACT

The aim of the present work was to analyse the influence of the casing layer and the environment of growing on agronomic performance (yield, number and weight of basidiocarps, precociousness and earliness) and the medicinal potential (β -glucan) from the *A. subrufescens* mushroom. The experiment followed a double factorial design with 4 different casing layer (4 soil-based casing layers mixed with charcoal, coconut fiber, composted pine bark and peat moss) and 4 environment of growing (a climatized chamber with no sunlight and 3 greenhouses with different plastic films), with 7 replicates for each treatment. The casing factor and the environment of growing affected the yield, number and weight of the basidiocarps and earliness, but did not affected the precociousness and the amount of β -glucan present in the mushrooms. Although not statistically influence the casing layer is a factor that had great influence on the values of β -glucan in the mushroom and also in the success of the agronomic performance of the crops, but a good suggestion is the use of charcoal and pine bark added to soil (4:1, v/v). The environment of growing is a factor determinant with the yield values and a major source of withdrawal of one cash crop growers, which can be conducted in controlled conditions because it does not influence the values of β -glucan in the mushroom.

Additional keywords: medicinal potential, casing layer, environment of growing, yield, β -glucana.

INTRODUÇÃO

A incidência do câncer está aumentando gradativamente e a diversidade de doenças causadas nos diversos órgãos humanos vem mudando a cada ano (OHNO et al., 2001). Além do combate ao câncer com cirurgias, irradiações e quimioterapia tradicionais, acredita-se que a imunoterapia possa ser uma importante ferramenta para o tratamento do câncer (SONE, 1999). Imunoterapia e bioterapia incluem várias abordagens, como resposta biológica modificadora, citosinas, transplante de linfócitos, terapia genética, uso de plantas medicinais e outros medicamentos alternativos, como os cogumelos (SUZUKI et al., 1998).

Ensaio clínicos sobre estas terapias estão sendo amplamente realizados e as evidências têm demonstrando sua eficácia, embora os mecanismos precisos de atuação ainda sejam difíceis de entender (RIOS-HERNANDEZ et al., 1994; MOHAGHEGHPUR et al., 1995; DI

LUIZO, 1999; OHNO et al., 2001). Como parte desses ensaios, alguns trabalhos no mundo abordam o *Agaricus blazei* como um potencial agente, que possui substâncias medicinais e farmacológicas para o tratamento de doenças como, o câncer, AIDS, diabetes, hipotensão arterial e hepatite (MIZUNO, 2002).

Porém, deve-se ressaltar que algumas destas informações, embora de grande valor, as vezes são indevidamente utilizadas em propagandas enganosas por parte da mídia, as quais ainda carecem de base científica e acabam manipulando dados obtidos para as substâncias purificadas, extraídas dos cogumelos que, mais puras e concentradas, são conceitualmente denominados de fármacos, isto é, distanciam-se do uso nutracêutico dos cogumelos quando consumidos em seu todo na alimentação humana (EIRA, 2003).

Algumas controversias e discussões vêm sendo geradas em torno da utilização de cogumelos junto à imunoterapia ou bioterapia. A primeira hipótese levantada, mas adiante experimentalmente testada foi sobre a influência do estágio de crescimento e maturação dos cogumelos de *A. blazei*, sobre a qualidade do extrato a ser utilizadas no que diz respeito a presença e estrutura dos compostos bioquímicos (MOL e WESSELS, 1990; CAMELINI et al., 2005).

Nesta linha de estudos, alguns autores concluíram que a biodiversidade da estrutura de glucana aumenta conforme o desenvolvimento do estágio de maturação dos cogumelos (MIZUNO et al., 1990; FIRENZUOLI et al., 2007). Porém, Camelini et al. (2005), ressaltaram que os maiores rendimentos de glucanas em extrato aquoso, depois de purificadas, foram encontrados em basidiomas maduros com esporos imaturos (43 mg g^{-1}), seguidos de basidiomas imaturos (42 mg g^{-1}) e finalmente basidiomas maduros com esporos maduros (40 mg g^{-1}). Este último é exigido aqui no Brasil, para a exportação de basidiomas desidratados.

Park et al. (2003) ressaltaram que outro importante fator a ser levado em consideração, por influenciar a concentração de β -glucanas em basidiomas de *A. blazei*, diz respeito às alterações que ocorrem nas condições ambientais dentro da estufa ou no campo, como chuvas e variações bruscas de temperatura.

Em estudos realizados previamente (Capítulo II, desta tese), foram verificados que a linhagem genética, os materiais utilizados no composto e a formulação deste também influenciam a quantidade de β -glucanas nos basidiomas, sendo que a linhagem ABL 04/49 apresentou quantidade elevada de β -glucanas, em torno de $5,95 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, enquanto a linhagem

ABL 99/30 apresentou menor quantidade deste componente ativo ($4,01 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$). Ambas as linhagens foram cultivadas no composto à base de bagaço de cana de açúcar e palha de Massai (*Panicum maximum* CV. MASSAI).

Assim, estudos agronômicos ainda devem ser realizados, buscando definir quais práticas de cultivo potencializam a presença de β -glucanas nos basidiomas de *A. subrufescens*, a fim de se estabelecer um protocolo de cultivo, visando à obtenção de um produto de qualidade, com concentrações mínimas de β -glucanas a ser atendida como requisito mínimo. Outros requisitos também devem ser abordados para a criação deste protocolo, como por exemplo, as etapas e práticas de cultivo que influenciam a quantidade de metais pesados nos basidiomas.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo verificar a influência da camada de cobertura e do ambiente de cultivo no comportamento agronômico (produtividade, número e massa de basidioma, precocidade e tempo para o primeiro fluxo) e no potencial medicinal (β -glucan) do cogumelo *A. subrufescens*.

MATERIAL E MÉTODOS

Após as experimentações descritas nos capítulos I e II, utilizando-se diferentes linhagens de *A. subrufescens* e compostos de cultivo, selecionaram-se a linhagem ABL 99/30 e o composto à base de bagaço de cana de açúcar e palha de aveia, para o desenvolvimento do presente experimento. Este conjunto apresentou um comportamento agronômico mais favorável e uma quantidade intermediária de β -glucana (capítulo II).

Inóculo

A linhagem ABL 99/30, está armazenada na Micoteca do Módulo de Cogumelo (FCA/UNESP), foi isolada no ano de 1999, na cidade de Piedade, de cultivo comercial do Grupo Atushi, no Estado de São Paulo (Brasil), e apresenta as seguintes características: tamanho médio, textura forte, produtividade elevada (10-18%), temperatura de frutificação um pouco mais baixa ($\pm 25^\circ\text{C}$), quantidade de β -glucana entre $4,89\text{-}5,23 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de cogumelo, de proteína entre 30,35-33,33%, de cinzas entre 5,87-7,06%, de fibra de 5,63-6,84% e finalmente

de gordura de 0,86-1,13%. Todos os processos de produção de inóculo seguiram os passos adotados no Capítulo I desta Tese, metodologia apresentada por Andrade et al. (2007) e Zied et al. (2010).

Compostagem (Fase I e II)

O composto utilizado consistiu numa mistura de bagaço de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), palha de aveia (*Avena sativa*), farelo de soja, uréia, sulfato de amônia, superfosfato simples, calcário calcítico e gesso, como o apresentado no Capítulo II desta Tese, os quais obedeceram também os mesmos métodos e processos utilizados na Fase I e II, durante o processo da produção do substrato. Ao final da Fase II de compostagem, o composto apresentava as seguintes características químicas: teor de N de 1,66%; P₂O₅ de 0,45%; K₂O de 0,26%; Ca de 5,53%; Mg de 0,23%; S de 0,98%; MO de 65%; C de 36,2%; Na de 300 mg kg⁻¹; Cu de 10 mg kg⁻¹; Fe de 3300 mg kg⁻¹; Mn de 128 mg kg⁻¹; Zn de 28 mg kg⁻¹; C/N de 22/1 e finalmente, pH de 6,83.

Inoculação do composto e corrida do micélio

O composto foi inoculado com 1% de micélio da ABL 99/30, em relação à sua massa úmida. Desta forma, 12 kg de composto misturados homogeneamente com 120g de inóculo foram dispostos em caixa plásticos previamente revestidos com um filme plástico. Os compostos foram incubados em câmara climatizada, com ausência de luz, temperatura do composto de 28±2°C, umidade relativa de 50±10% e ausência de ventilação, por 16 dias.

Camada de cobertura

Foram preparadas 4 camadas de cobertura, sendo estas solo + carvão vegetal (4:1, v/v), solo + fibra de coco (4:1, v/v), solo + casca de *Pinus* compostada (4:1, v/v) e finalmente, solo + turfa de musgo "*Sphagnum*", utilizando-se o mesmo solo usado no Capítulo II desta tese. Primeiramente, o solo foi adicionado de calcário calcítico para se elevar o pH para valores entre 7-7,5; em seguida, o mesmo foi umedecido e misturado com os materiais orgânicos. Na

tabela 1 têm-se as principais características físico-químicas das coberturas utilizadas no experimento.

Inserir tabela 1 na página 81

Após, a homogeneização as coberturas foram pasteurizados por 8 horas a 58°C e, ao diminuir a temperatura a 24°C, foram sobrepostas no composto colonizado, 5 cm de altura; para isso, foram adicionados 12,5 litros de cobertura por caixa plástica contendo 12 kg de composto. As caixas foram levadas a 4 diferentes ambientes de cultivo, sendo estes: câmara climatizada (12 x 2,3 x 2,3 m: comprimento, largura e altura), estufa experimental com filme plástico duplalon (8 x 4 x 2,5 m: comprimento, largura e altura), estufa experimental com filme plástico leitoso (8 x 4 x 2,5 m: comprimento, largura e altura) e finalmente, estufa experimental com filme plástico transparente (8 x 4 x 2,5 m: comprimento, largura e altura).

Indução de primórdios e colheita

Em cada ambiente de cultivo, ocorreram flutuações nas variáveis ambientais (temperatura do composto e do ambiente, umidade relativa e quantidade de luz). Na tabela 2 tem-se o comportamento das variáveis ambientais, de acordo com o ambiente de cultivo durante a produção.

Inserir tabela 2 da página 82

Sendo assim a indução de primórdios ocorreu de maneira natural, de acordo com as condições climáticas do dia ou da semana, para os cultivos conduzidos na estufa com filme plástico duplalon, leitoso e transparente. Já no cultivo realizado na câmara climática, os fluxos foram controlados e induzidos de maneira a se obter 5 fluxos de produção longo do cultivo; para isso, as variáveis ambientais como temperatura e umidade relativa e aeração foram conduzidas conforme metodologia apresentada por Zied (2008).

O tempo total de produção foi de 120 dias, sendo que aos 21 dias já se observava à presença de alguns primórdios na câmara climatizada, na estufa com filme duplalon e na estufa

com filme leitoso. De acordo com a camada de cobertura e o ambiente de cultivo utilizado os fluxos de colheita variaram de 2 (cobertura com carvão vegetal cultivado na estufa com filme duplalon) a 5 (carvão vegetal cultivado na câmara climatizada), durante o cultivo.

A colheita foi realizada manualmente, seguida de uma pré-limpeza dos basidiomas através de raspagem da base do estípite, para se retirar resíduos de material da camada de cobertura. Em seguida, os cogumelos foram identificados para avaliação da produtividade, tempo para o primeiro fluxo, precocidade, massa e número de basidiomas.

Desenho experimental e análise dos dados

O experimento foi realizado em esquema fatorial duplo, com 4 camadas de cobertura (solo + carvão, solo + fibra de coco, solo + casca de *Pinus* compostada e solo + turfa de musgo) e 4 ambientes de cultivo (câmara climatizada, estufa com filme plástico duplalon, estufa com filme plástico leitoso e estufa com filme plástico transparente) com um delineamento inteiramente casualizado com 7 repetições por tratamento; cada repetição foi referente à uma caixa com 12 kg de composto. O programa estatístico Sisvar 3.2 foi utilizado para separar as médias obtidas nos tratamentos e compará-las através do teste Tukey ($\leq 0,05$). Finalmente, a correlação linear entre os valores de produtividade, número e massa de basidiomas, precocidade, tempo para o primeiro fluxo e quantidade de β -glucana nos basidiomas foram realizadas com o programa estatístico Sigma Stat 3.5.

Variáveis analisadas

Os dados de cultivo foram avaliados pela produtividade (massa fresca de basidiomas dividida pela massa fresca do composto multiplicada por 100, expresso em %), número de basidiomas (contagem dos basidiomas colhidos), massa de basidiomas (média da massa fresca de basidiomas dividido pelo número de basidiomas, expressa em gramas), precocidade (produtividade obtida durante o tempo total de colheita dividido pela produtividade obtida na primeira metade do tempo total de colheita, multiplicada por 100, expressa em %) e tempo para o primeiro fluxo (tempo demorado para o primeiro fluxo após a cobertura, expresso em dias).

A metodologia utilizada para análise de β -glucana nos basidiomas, seguiu as etapas propostas por Prosky et al. (1988) e modificados pela “Foundation of Japanese Food Analysis Center” (1980), posteriormente descritos por Park et al. (2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, os maiores valores de produtividade foram obtidos no cultivo realizado na câmara climatizada, sendo que a camada de cobertura não influenciou estes resultados (Tukey $\leq 0,05$). Porém, quando os cultivos foram conduzidos em estufas semi-controladas (independente do filme plástico utilizado), o fator camada de cobertura influenciou significativamente os resultados de produtividade; sendo que as coberturas mais abertas (Tabela 2), resultaram em maior produtividade (solo + carvão vegetal e solo + casca de *Pinus* compostada).

Inserir tabela 3 da página 83

Quando se analisam diferentes materiais de coberturas e ambientes de cultivo também se observa correlação positiva entre produtividade e número de basidiomas ($r = 0,81$) e correlação negativa entre número de basidioma colhidos e suas respectivas massas unitárias ($r = -0,695$). Não foram observadas nenhuma correlação com relação aos valores de precocidade, tempo para o primeiro fluxo e teores de β -glucana (Tabela 4).

Resultados semelhantes foram obtidos por Zied et al. (2011), os quais observaram correlação negativa entre a capacidade de retenção de água e o número de basidiomas colhidos, e uma correlação positiva entre a densidade total e a porosidade com o número de basidiomas colhidos. Pardo et al. (2003) verificaram no cultivo de *A. bisporus*, que uma camada de cobertura porosa apresenta um menor tempo para a primeira colheita, com elevado número de cogumelos, porém com massa reduzida.

Inserir tabela 4 da página 86

Desta forma, os tratamentos que apresentaram maior produtividade, conseqüentemente resultaram em elevado número de basidioma colhidos, com massa reduzida. Esta tendência apenas não foi verificada no ambiente climatizado, sendo que a camada de cobertura a base de solo + casca de *Pinus* compostada resultou em massa elevada, significativamente diferente ao teste Tukey a 5% de probabilidade. Portanto, quando se tem um ambiente controlado fatores como a porosidade torna-se menos significativo para a escolha do material a ser utilizado como cobertura.

As variáveis ambientais (Tabela 2) influenciaram diretamente para a obtenção de uma baixa produtividade nas estufas com filmes plásticos; Zied e Minhoni (2009) recomendam níveis ideais de temperatura do composto de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, do ambiente de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e da umidade relativa de $90 \pm 2\%$ para os primeiros 12 dias após a adição da camada de cobertura e durante os intervalos entre os fluxos; para a indução de primórdios, a temperatura do composto deve diminuir até $20 \pm 2^\circ\text{C}$, a do ambiente até $18 \pm 2^\circ\text{C}$ e a umidade relativa até $85 \pm 2\%$.

Os valores de precocidade não apresentaram diferenças significativas de acordo com os tratamentos analisados, porém se mostraram superiores ao observado no Capítulo II desta tese. De acordo com a Tabela 3, aproximadamente 93% dos valores de precocidade apresentaram resultados maiores que 50% na primeira metade do período de colheita, o que significa um cultivo mais concentrado nos primeiros dias, o que conseqüentemente pode possibilitar um ciclo de cultivo mais curto, principalmente para as combinações solo + carvão/câmara climatizada; solo + carvão/estufa com filme duplalon; solo + casca de *Pinus* compostada/estufa com filme duplalon e finalmente solo + casca de *Pinus* compostada/estufa com filme leitoso.

Deve-se ressaltar que as coberturas com maior porosidade e menor capacidade de retenção de água (solo + carvão e solo + casca de *Pinus*) demonstraram tendência de precocidade elevada. Colauto et al. (2010) verificaram que coberturas com porosidade elevada (xisto calcítico e turfa Santa Catarina) apresentaram em eficiência biológica elevada, quando comparadas com cobertura menos porosas (solo + carvão e turfa de São Paulo).

Com relação ao tempo para o primeiro fluxo, observou-se que a camada de cobertura à base de solo + casca de *Pinus* em câmara climatizada resultou em menor tempo para a 1ª colheita. O mesmo foi observado na estufa com filme leitoso, porém com a camada de cobertura à base de solo + carvão vegetal. A única camada de cobertura que influenciou significativamente o tempo para o primeiro fluxo, de acordo com o ambiente de cultivo, foi a

mistura solo + casca de *Pinus*, sendo que as estufas proporcionaram um primeiro fluxo mais tardio, o que não se observou nas outras coberturas.

A quantidade de β -glucana não apresentou diferença significativa em função das camadas de cobertura e dos ambientes de cultivo utilizados, discordando dos resultados obtidos por Park et al. (2003), que compararam a quantidade de β -glucana em basidiomas cultivados no Brasil e no Japão. Estes autores utilizaram cogumelos produzidos no Brasil em estufas e a campo e cogumelos produzidos no Japão em estufas. Concluíram que o *A. blazei* cultivado em estufa apresentaram menor quantidade de β -glucana ($7,6 \pm 2,8 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de cogumelo produzido no Japão e $8,4 \pm 0,9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de cogumelo produzido no Brasil) que os cultivados a campo ($10,1 \pm 2,1 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ cogumelo). Deve-se ressaltar que o fator composto e linhagem utilizada pelos autores podem ter influenciado os teores de β -glucana presentes nos basidiomas.

Desta forma, também podemos adotar os valores médios obtidos pelos tratamentos ($4,99 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ cogumelo) para propor um nível aceitável de β -glucana presente nos basidioma. De maneira que, se isolarmos o fator camada de cobertura, teríamos uma variabilidade de 34,5% e se separarmos o fator ambiente de cultivo, teríamos uma variabilidade de 15,7% nos valores de β -glucana. Sendo assim, é de fundamental importância a escolha de uma cobertura de acordo com as características físicas desejadas nos basidiomas a serem produzidos.

CONCLUSÕES

- O fator cobertura e ambiente de cultivo afetaram a produtividade, número e a massa de basidioma, e o tempo para o primeiro fluxo; porém, não afetaram a precocidade e a quantidade de β -glucana nos basidioma.

- Apesar de não influenciar estatisticamente a cobertura é um fator que apresenta grande influencia sobre os valores de β -glucana nos basidiomas e também no sucesso do comportamento agrônômico dos cultivos, sendo uma boa sugestão à utilização de carvão vegetal e casca de *Pinus* adicionado ao solo (1:4, v/v).

- O ambiente de cultivo é um fator determinante junto aos valores de produtividade e uma das maiores fonte de desistência dos produtores em um cultivo comercial, sendo uma possibilidade a condução de cultivos em câmaras climatizadas, por não influenciar os valores de β -glucana nos basidiomas.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. C. N. et al. Productivity, biological efficiency, and number of *Agaricus blazei* mushrooms grown in compost in the presence of *Trichoderma* sp. and *Chaetomium olivacearum* contaminants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 243-247, 2007.

COLAUTO, N. B. et al. Alternative to peat for *Agaricus brasiliensis* yield. **Bioresource Technology**, Trivandrum, v. 101, p. 712-716, 2010.

DI LUZIO, N. R. Update on the immunomodulating activities of glucans. **Springer Seminar Immunopathology**, Geneva, v. 8, p. 387-400, 1999.

EIRA, A. F. **Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2003. 308 p.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Kansas, v. 5, n. 1, p. 3-15, 2007.

FOUNDATION OF JAPANESE FOOD ANALYSIS CENTER. No 398040072-001 52-1. Yoyogi-Machi, Shibuya-Ku, Tohyo, Japan, 1980.

MIZUNO, T. Medicinal properties and clinical effects of culinary-medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill (Agaricomycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Haifa, v. 4, p. 299-312, 2002.

MIZUNO, T. et al. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 54, p. 2889-2896, 1990.

MOHAGHEGHPOUR, N. et al. Glucans as immunological adjuvants. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, California, v. 383, p. 13-22, 1995.

MOL, P. C.; WESSELS, J. G. R. Differences in wall structure between substrate hyphae and hyphae of fruit-body stipes in *Agaricus bisporus*. **Mycological Research**, Manchester, v. 94, p. 472-479, 1990.

OHNO, N. et al. Antitumor β -glucan from the cultured fruit body of *A. blazei*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Gifu, v. 24, p. 820-828, 2001.

PARDO, A.; de JUAN, J. A.; PARDO, J. E. Performance of composted vine shoots as a peat alternative in casing materials for mushroom cultivation. **Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 1, n. 2, p. 209-214, 2003.

PARK, Y. K. et al. Determinação da concentração de β -glucana em cogumelos *Agaricus blazei* Murril por método enzimático. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 312-316, 2003.

PROSKY, L. et al. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food-products interlaboratory study. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, New York, v. 71, p. 1017-1023, 1988.

RIOS-HERNANDEZ, M. et al. Immunopharmacological studies of β -1,3-glucan. **Archives of Medical Research**, Mexico, v. 25, p. 179-180, 1994.

SONE, S. Clinical oncology. **Annals of Oncology**, Dordrecht, v. 5, p. 475-493, 1999.

SUZUKI, T. Soluble mannan and beta-glucan inhibit the uptake of *Malassezia furfur* by human monocytic cell line, THP-1. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Baltimore, v. 21, p. 223-230, 1998.

ZIED, D. C. **Camadas de cobertura com diferentes combinações de solos e ambientes de cultivo na produção do cogumelo *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann**. 2008. 120 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

ZIED, D. C.; MINHONI, M. T. A. Influência do ambiente de cultivo na produção do Cogumelo *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*). **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 24, p. 17-36, 2009.

ZIED, D. C. et al. Production of *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) on different casing layers and environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 10, p. 1857-1863, 2010.

ZIED, D. C. et al. Medicinal mushroom growth as affected by non-axenic casing soil. **Pedosphere**, Jiangsu, v. 21, n. 2, p. 146-153, 2011.

Tabela 1. Características físico-químicas das camadas de coberturas utilizadas.

Camadas de cobertura	pH	Elementos químicos					Elementos químicos					De g cm ⁻³	CRA			
		M.O.	P	H + Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V	Fe		Mn	CE	Saturado	0,006 MPa
		%					mg kg ⁻¹ matéria seca					μs/cm				
S + CV	6,8	9	4	10	1,1	64	3	68	78	88	5	0,6	190,7	1,12	0,48	0,20
S + FC	6,7	52	19	11	1,7	135	17	154	164	94	13	2,5	492,0	0,86	0,58	0,22
S + CP	7,1	31	6	9	2,1	163	8	173	182	95	5	0,6	104,5	0,84	0,62	0,25
S + TM	7,3	45	22	10	3,2	183	10	196	206	96	10	0,8	367,8	0,81	0,72	0,26

S: solo; CV: carvão vegetal; FC: fibra de coco; TM: turfa de musgo e CP: casca de *Pinus*.

M.O.: matéria orgânica; SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca catiônica; CE: Condutividade elétrica; De: densidade total; CRA: capacidade de retenção de água.

Tabela 2. Comportamento das variáveis ambientais de acordo com o ambiente de cultivo.

Ambientes de cultivo	Temperatura ambiente, °C			Temperatura do composto, °C			Umidade relativa, %			Luminosidade, 20.000 lux		
	Max	Min	Media	Max	Min	Media	Max	Min	Media	Max	Min	Media
CC	30,1	16,3	25,9	29,0	17,5	25,0	100	90	97	35	35	35
EFD	41,2	16,7	24,2	30,5	17,7	21,0	100	35	60,8	23	0	11,5
EFL	46,9	17,2	27,6	33,4	18,2	24,3	100	37	54,3	1390	0	695
EFT	55,3	17,0	30,6	38,3	17,9	29,6	100	32	48,7	2990	0	1495
Media	43,3	16,8	27,0	32,8	17,8	24,9	100	48,5	65,2	1110	0	560

CC = câmara climatizada; EFD = estufa com filme Duplalon[®]; EFL = estufa com filme leitoso; EFT = estufa com filme transparente.

Tabela 3. Comportamento agrônômico de *A. subrufescens*, e quantidade de β -glucana obtida nos basidiomas, em função da camada de cobertura e do ambiente de cultivo utilizado (média de 7 repetições).

Camada de cobertura (4:1, v/v)	Câmara climatizada	Ambiente de cultivo		
		Estufa com filme duplalon	Estufa com filme leitoso	Estufa com filme transparente
Produtividade, %				
Solo + carvão vegetal	14,72 A a	3,63 A b	6,10 A b	5,03 A b
Solo + fibra de coco	12,71 A a	0,35 B b	0,87 C b	1,45 B b
Solo + casca de <i>Pinus</i>	15,37 A a	3,94 A b	4,32 BA b	5,53 A b
Solo + turfa de musgo	13,60 A a	2,00 AB b	2,11 CB b	1,04 B b
CV, %			73	
DMS		3,25 [‡]		3,1 [†]
Media, %			5,7	
Número de basidiomas, u				
Solo + carvão vegetal	137,28 AB a	34,14 A b	68,57 A b	43,66 AB b
Solo + fibra de coco	174,54 A a	1,75 A b	35,85 AB b	52,14 A b
Solo + casca de <i>Pinus</i>	97,85 B a	37,85 A b	4,15 B b	8,65 B b
Solo + turfa de musgo	120,14 B a	21,14 A b	13,85 B b	9,20 B b
CV, %			91,3	
DMS		43,37 [‡]		58,23 [†]
Media, u			53,19	
Massa de basidiomas, g				
Solo + carvão vegetal	13,71 A a	13,62 B a	11,61 B a	15,70 A a
Solo + fibra de coco	11,77 A b	27,85 A a	16,02 B a	15,23 A ab
Solo + casca de <i>Pinus</i>	15,96 A b	13,33 B b	33,52 A a	24,25 A ab
Solo + turfa de musgo	14,11 A a	17,38 AB a	19,91 B a	21,74 A a
CV, %			64,21	
DMS		13,31 [‡]		12,72 [†]

Media, g	17,85			
	Precocidade, %			
Solo + carvão vegetal	72,30 a A	84,29 a A	67,87 a A	65,58 a A
Solo + fibra de coco	42,71 a A	71,00 a A	63,61 a A	64,36 a A
Solo + casca de <i>Pinus</i>	61,75 a A	93,00 a A	75,03 a A	69,73 a A
Solo + turfa de musgo	56,94 a A	68,78 a A	67,75 a A	66,21 a A
CV, %	36,07			
DMS	36,98 [¥]			34,18 [†]
Media, %	71,74			
	Tempo para o primeiro fluxo, dias			
Solo + carvão vegetal	37,1 B a	34,7 A a	30,2 A a	33,5 A a
Solo + fibra de coco	38,49 B a	40,84 A a	38,36 AB a	41,34 A a
Solo + casca de <i>Pinus</i>	23,4 A a	36,4 A b	42,9 B b	38,7 A b
Solo + turfa de musgo	37,6 B a	34,7 A a	34,7 AB a	41,2 A a
CV, %	17,34			
DMS	10,54 [¥]			10,51 [†]
Media, dias	36,53			
	β -glucana (g 100 ⁻¹ g de cogumelo desidratado)			
Solo + carvão vegetal	5,17 A a	3,97 A a	3,75 A a	6,62 A a
Solo + fibra de coco	2,51 A a	6,01 A a	6,65 A a	2,03 A a
Solo + casca de <i>Pinus</i>	4,86 A a	4,20 A a	3,68 A a	4,71 A a
Solo + turfa de musgo	9,07 A a	7,01 A a	5,37 A a	4,38 A a
CV (%)	71,28			
DMS	7,3 [¥]			5,2 [†]
Media, g 100g ⁻¹	4,99			

* Letras maiúsculas comparam os resultados na mesma coluna e minúsculas na mesma linha ao teste Tukey ($P \leq 0,05$).

[¥] Diferença mínima significativa para os valores na mesma coluna (comparação entre coberturas).

[†] Diferença mínima significativa para os valores na mesma linha (comparação entre ambientes).

CV: coeficiente de variação.

DMS: diferença mínima significativa.

Tabela 4. Correlação entre as variáveis analisadas, valores em negrito apresentam um $r \geq 0,6$ e um $P \leq 0,05$

Correlação	Produtividade	Número de basidiomas	Massa de basidiomas	Precocidade	Tempo para o 1° fluxo	β -Glucana
Produtividade	-	0,810⁽¹⁾	-0,299	-0,308	-0,642	-0,330
		0,0148⁽²⁾	0,471	0,458	0,0859	0,424
Número de basidiomas	-	-	-0,695	-0,521	-0,319	-0,614
			0,0559	0,185	0,441	0,105
Massa de basidioma	-	-	-	0,493	0,042	0,395
				0,215	0,921	0,333
Precocidade	-	-	-	-	-0,366	-0,134
					0,373	0,751
Tempo para o 1° fluxo	-	-	-	-	-	0,267
						0,522

⁽¹⁾ Valor da correlação (r).⁽²⁾ Valor da probabilidade (P).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na Figura 3 tem-se a taxa de variabilidade espacial nos valores de β -glucana e na produtividade obtida de acordo com as variáveis analisadas (linhagem, composto, camada de cobertura e ambiente de cultivo).

As maiores variações, dentro de cada fator isolado foram: linhagem (35,8%), seguida de camada de cobertura (34,5%), ambiente de cultivo (15,7%) e composto (9,9%) para os valores referente à quantidade de β -glucana e para os valores referente a produtividade foram: ambiente de cultivo (82,1%), seguida da linhagem (81,3%), camada de cobertura (49,1%) e composto (15,2%).

Sendo assim, podemos adotar após as experimentações realizadas valores padrões de: quantidade de β -glucana de 5 g 100g⁻¹ de cogumelo desidratado; e produtividade de 10%. Assim algumas práticas de cultivo são sugeridas:

- A utilização das variedades ABL 99/30, ABL 03/44 and ABL 04/49 por apresentarem bom comportamento agrônômico e presença razoável de β -glucana;
- O composto pode ser preparado utilizando como material prima base bagaço de cana de açúcar e palha de Massai ou trigo. Torna-se de suma importância a formulação adequada do substrato para obter-se boa produtividade (sendo que um composto balanceado apresenta pouca variação na produtividade e na quantidade de β -glucana);
- A cobertura é um fator determinante na presença de β -glucana nos basidiomas e o sucesso de uma boa produtividade, apresentando grande variação de acordo com os tratamentos experimentados. Esta pode ser escolhida de acordo com as características físicas

finalis desejada dos basidiomas colhidos, porém uma boa sugestão é a utilização de casca de *Pinus* e carvão vegetal adicionado de solo (1:4, v/v).

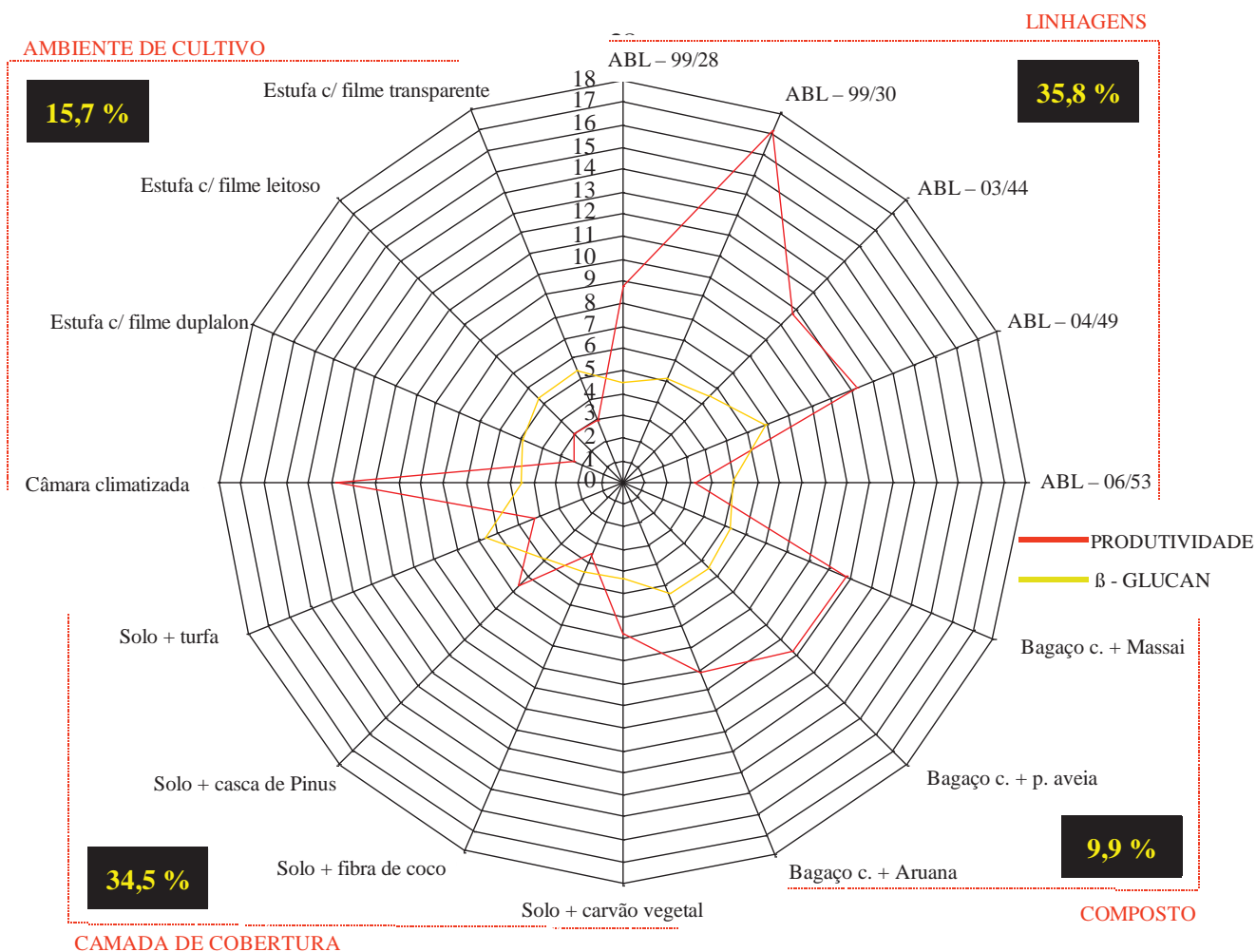


Figura 5. Resultados de produtividade (%) e quantidade de β -glucana (g 100g⁻¹ de cogumelo desidratado) obtidos em função de 5 linhagens, 3 compostos, 4 camadas de cobertura e 4 ambientes de cultivo experimentados.

- O ambiente de cultivo é um fator determinante junto aos valores de produtividade e uma das maiores fonte de desistência dos produtores em cultivos comerciais, devido à grande variação de produtividade durante os ciclos de cultivo no ano. Assim recomenda-se o cultivo em câmaras climatizadas por não sofrer variação das variáveis ambientais externa e não influenciar diretamente os valores de β -glucana nos basidiomas colhidos.

6 CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho:

1) O processo de compostagem “Indoor” pode deve ser uma alternativa para a produção de *A. subrufescens*, uma vez que muitas propriedades também se produz *A. bisporus*, sendo este processo de compostagem utilizado para estas espécies de cogumelos. O método de desidratação de basidiomas para sua conservação se mostrou eficiente e relativamente barato.

2) A produtividade, o número e massa dos basidiomas, a precocidade e o tempo para o primeiro fluxo variaram de acordo com as praticas de cultivos (linhagem, composto, camada de cobertura, ambiente de cultivo).

3) A quantidade de β -glucana foi influenciada pela linhagem e o tipo de composto utilizados. A camada de cobertura e o ambiente de cultivo não influenciaram a presença de β -glucana nos basidiomas.

4) O cultivo de *A. blazei* deve fazer parte da agricultura familiar, tornando um ponto de referência internacional em termos de qualidade, sempre com acompanhamento técnico e científico, para que os basidiomas produzidos se diferenciem dos

produzidos em outro país para sua exportação (elevado teor de β -glucana e bom rendimento agronômico para o fungicultor).

7 REFERÊNCIAS GERAIS

ANDRADE, M. C. N. et al. Camadas de cobertura mais utilizadas na região de Piedade/ SP para o cultivo de *Agaricus blazei*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL, 3., 2006, São Paulo. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2006. p. 147.

ANDRADE M. C. N. et al. Productivity, biological efficiency, and number of *Agaricus blazei* mushrooms grown in compost in the presence of *Trichoderma* sp. and *Chaetomium alivacearum* contaminants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 243-247, 2007.

BALAKRISHNAN, B.; NAIR, M. C. Medicinal mushrooms. In: NAIR, M. C. et al. *Advances in mushroom biotechnology*. Jodhpur: Indian College of Agriculture , 1994. p. 27-39.

BRAGA, G. C. et al. **Manual do cultivo de *Agaricus blazei* Murr. "Cogumelo-do-Sol"**. Botucatu: FEPAF, 1999. 44 p.

CAMARGO, R. B. P.; ZIED, D. C.; MINHONI, M. T. A. Período de correção do pH da camada de cobertura e sua influência na produtividade de *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Henemann. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MUSHROOMS IN BRAZIL, 4., 2008, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul: Embrapa. 2008. p. 161-161.

CAMELINI, C. M. et al. Structural characterization of β -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. **Biotechnology Letters**, Loughborough, v. 27, p. 1295-1299, 2005.

COLAK, M. Temperature profiles of *Agaricus bisporus* in composting stages and effects of different compost formulas and casing materials on yield. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 3, n. 9, p. 456-462, 2004.

COLAUTO, N. B. et al. Alternative to peat for *Agaricus brasiliensis* yield. **Bioresource Technology**, Trivandrum, v. 101, p. 712-716, 2010.

COURVOISIER, M. Les champignons comestibles dans le monde. **Le Bulletin de la Fédération Nationale des Syndicats Agricoles de Cultivateurs de Champignons**, Bordeaux, v. 82, p. 829-835, 1999.

DIAS, E. S. Cytological studies of *Agaricus brasiliensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 24, p. 2473-2479, 2008.

DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-70542010000400001&script=sci_arttext>. Acesso em: 24 ago. 2010.

DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X. Structural characterization of watersoluble of b-D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. **Carbohydrate Research**, Knoxville, v. 337, p. 1417-1421, 2002.

DUTSCH, G. A.; RAST, D. Biochemische beziehung zwischen mannitbildung and hexose monophosphatzyklus in *Agaricus bisporus*. **Phytochemistry**, Egham, v. 11, p. 2677-2681, 1972.

EIRA, A. F. **Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2003. 308 p.

FERMOR, T. R.; MACAULEY, B. J. Microbiological factors contributing to selectivity and nutritional quality of mushroom compost. In: INTERNATIONAL WORKSHOP – SEMINAR ON *AGARICUS* COMPOST, 1., 1991, Sydney. **Proceedings...** Sydney: AMGA/ISMS, 1991. p. 48-67.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Kansas, v. 5, n. 1, p. 3-15, 2007.

FLEGG, P. B.; WOOD, D. A. Growth and fruiting. In: FLEGG, P. B. et al. (Eds.). **The biology and technology of cultivated mushroom**. Chichester: John Wiley, 1985. p. 141-177.

FUJIMOTO, S. et al. Schizophyllan. **Biotherapy**, Dordrecht, v. 2, p. 500-508, 1988.

GANDY, D. G. **Report of the mushroom research station**. Peterborough: Microbiology Department, 1953. p. 38-46.

GANNEY, G. W.; RICHARDSON, S. Chemical and physical analyses of twelve commercial mushroom casing mixtures. In: HAYES, W. A. (Ed.). **The casing layer**. Leeds: Mushroom Growers' Association, 1974. p. 20-26.

GONZÁLEZ MATUTE, R.; FIGLAS, D.; CURVETTO, N. *Agaricus blazei* production on non-composted substrate based on sunflower seed hulls and spent oyster mushroom substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 27, p. 1331-1339, 2011.

GROENENBOOM, G. Commercial compost system. In: INTERNATIONAL WORKSHOP SEMINAR ON AGARICUS COMPOST, 2., 1993, Sydney. **Proceedings...** Sydney: AMGA/ISMS, 1993. p. 95-98.

GÜLSER, C.; PEKSEN A. Using tea waste as a new casing material in mushroom (*Agaricus bisporus* (L.) Sing.) cultivation. **Bioresource Technology**, Trivandrum, v. 88, p. 153-156, 2003.

HEINEMANN, P. *Agarici austroamericani*. Viii. Agariceae des regions intertropicales d'amérique du sud. **Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique**, Boechout, v. 62, p. 355-384, 1993.

KAWAGISHI, H. et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, Knoxville, v. 73, p. 186-267, 1989.

KAWAGISHI, H. et al. Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 183, n. 1, p. 150-154, 1988.

KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**, Corvallis, v. 97, p. 12-24, 2005.

KOPYTOWSKI FILHO, J. **Produtividade e eficiência biológica de *Agaricus blazei* (Murrill) Heinemann, em diferentes condições de cultivo**. 2006. 134 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

KOPYTOWSKI FILHO, J.; MINHONI, M. T. A.; RODRIGUEZ ESTRADA, A. *Agaricus blazei* 'The Almond Portobello': cultivation and commercialization. **American Mushroom Institute News**, Pennsylvania, v. 54, p. 22-28, 2006.

LABORDE, J. Moving towards a fully controlled mushroom substrate preparation – Why a controlled preparation process? In: INTERNATIONAL WORKSHOP SEMINAR ON AGARICUS COMPOST, 1., 1991, Sydney. **Proceedings...** Sydney: AMGA/ISMS, 1991. p. 26-47.

LEENDERSTE, K. Commercial compost system. In: INTERNATIONAL WORKSHOP SEMINAR ON AGARICUS COMPOST, 2., 1993, Sydney. **Proceedings...** Sydney: AMGA/ISMS, 1993. p. 99-108.

MILLER, F. C.; DAHLBERG, K. R. Physical factors determinants of composting activity and final compost quality. In: INTERNATIONAL WORKSHOP SEMINAR ON AGARICUS COMPOST, 1., 1991, Sydney. **Proceedings...** Sydney: AMGA/ISMS, 1991, p. 4-25.

MILES, P. G.; CHANG, S. T. General principles of production of mushrooms and mushroom products. Introduction to principles of production. In: MILES, P. G.; CHANG, S. **Mushroom biology: concise basics and current developments**. Singapore: World Scientific, 1997. p. 86-96.

MINHONI, M. T. A.; KOPYTOWSKI FILHO, J.; ANDRADE, M. C. N. **Cultivo de *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann**. 3. ed. Botucatu: FEPAF, 2005. 141 p.

MIZUNO, T. et al. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, v. 54, p. 2889-2896, 1990.

MIZUNO, M. et al. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 62, p. 434-437, 1998.

NAIR, M. C.; GOKULAPALAN, C. D. L. **Mushroom biotechnology**. Jodhpur: Scientific, 1994. 193 p.

NAVARRO LOZANO, M. J.; GEA ALEGRÍA, F. J; FERRAGUT PÉREZ, F. J. **Biología y control del ácaro miceliófago *Brennandania lambi* (Krczal) en los cultivos de champiñón de Castilla-La Mancha**. Castilla: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2003. 203 p.

NOBLE, R.; DOBROVIN-PENNINGTON, A. Partial substitution of peat in mushroom casing with fine particle coal tailings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 104, p. 351-367, 2005.

OEI, P. **Mushroom cultivation**. 3rd ed. Leiden: Backhuys, 2003. 429 p.

OHNO, N.; SUZUKI, I.; YADOMAE, T. Structure and antitumor activity of a 3 -1,3-glucan, isolated from the culture filtrate of *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 34, p. 1362-1365, 1986.

OHNO N. et al. Antitumor 1,3-beta-glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Gifu, v. 23, p. 866-872, 2000.

OHNO, N. et al. Antitumor β -glucan from the cultured fruit body of *A. blazei*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Gifu, v. 24, p. 820-828, 2001.

PARDO, A. **Respuestas agronómicas de diferentes materiales de cobertura para el cultivo del champiñón, *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach**. 1999. 173 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, 1999.

PARK, Y. K. et al. Determinação da concentração de β -glucana em cogumelos *Agaricus blazei* Murrill por método enzimático. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 312-316, 2003.

SAITO, K. Activation of complement and limulus coagulation systems by an alkali-soluble glucan isolated from *Omphalia lapidescens* and its less branched derivatives **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 40, p. 1227-1230, 1992.

SILVA, A. S. Isolamento e identificação de bactérias presentes nos solos de cobertura utilizados no cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, p. 1364-1373, 2007.

SOSHI, H. S. Mushroom culture in India: recent research finding. **Indian Phytopathology**, Gurgaon, v. 41, p. 313-326, 1988.

STONE, B.; LABORDE, J. Mushroom nutrition and chemical aspects of compost. In: INTERNATIONAL WORKSHOP SEMINAR ON AGARICUS COMPOST. 1., 1991, Sydney. **Proceedings...** Sydney: AMGA/ISMS, 1991. p. 26-47.

STONE B. B.; CLARKE A. E. **Chemistry and biology of (1 \rightarrow 3)-b-Glucans**. Victoria: Trobe University Press, 1992. 803 p

TRESCROW, C. Nutrition of the cultivated mushroom. **Dansk Botanisk Arkiv**, Kobenhavn, v. 11, n. 6, p. 1-180, 1944.

URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília, DF: Embrapa, 2004. 187 p.

URYU, E. N. **Cogumelo medicinal *Agaricus blazei***. São Paulo: CATI, 1999. 28 p.

VESTJENS, T. Tunnel composting technology. In: INTERNATIONAL WORKSHOP SEMINAR ON AGARICUS COMPOST. 2., 1993, Sydney. **Proceedings...** Sydney: AMGA/ISMS, 1993. p. 45-57.

ZIED, D. C. **Camadas de cobertura com diferentes combinações de solos e ambientes de cultivo na produção do cogumelo *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann**. 2008. 120 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

ZIED, D. C.; MINHONI, M. T. A. Influência do ambiente de cultivo na produção do Cogumelo *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*). **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 24, p. 17-36. 2009.

ZIED, D. C. et al. Características generales, producción y comercialización de *Agaricus blazei* (Murril) ss. Heinemann (*A. brasiliensis*): una nueva alternativa de cultivo de hongo en España. In: JORNADAS TECNICAS DEL CHAMPIÑÓN Y OTROS HONGO CULTIVADOS EN CASTILLA-LA MANCHA, 5., 2009, Cuenca. **Actas...** Cuenca: CIESC, 2009a. p. 1-19.

ZIED, D. C. et al. Produção de *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) em função de diferentes camadas de cobertura e substratos de cultivo. **Interciencia**, Caracas, v. 34, p. 437-442, 2009b.

ZIED, D. C.; MINHONI, M. T. A.; PARDO GIMENEZ, A. Control de calidad en setas cultivadas. In: PARDO GONZALES, J. E. **Control de calidad en productos agrarios de interés en Castilla-La Mancha**. Albacete: Servicio de reprografia del campus de Albacete de la Universidad de Castilla-La Mancha. 2010a. p. 89-102.

ZIED, D. C. et al. Production of *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) on different casing layers and environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 10, p. 1857-1863, 2010b.

ZIED, D. C. et al. A study of compost added to casing technique in *Agaricus bisporus* cultivation from Phase III bulk compost. **HortScience**, Pleasanton, v. 45, p. 1649-1653, 2010c.

ZIED, D. C. et al. Medicinal mushroom growth as affected by non-axenic casing soil. **Pedosphere**, Jiangsu, v. 21, n. 2, p. 146-153, 2011.

ZUZUKI, F. et al. Mushroom extract as an interferon biological and physiochemical properties of spore extracts of *L. edodes*. **Mushroom Science**, Tokyo, v. 9, p. 509-520, 1974.

WANG, Q. et al. Yield, dry matter and polysaccharides content of the mushroom *Agaricus blazei* produced on asparagus straw substrate. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 125, p. 16-18, 2010.