

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIA
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PATOGENICIDADE DE *Lecanicillium fungicola* EM
*Agaricus bisporus***

Cinthia Elen Cardoso Caitano

Engenheira agrônoma

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIA
CAMPUS JABOTICABAL**

**PATOGENICIDADE DE *Lecanicillium fungicola* EM
*Agaricus bisporus***

Discente: Cinthia Elen Cardoso Caitano

Orientador: Dr. Diego Cunha Zied

**Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal,
como parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Agropecuária**

2020

C137p

Caitano, Cinthia Elen Cardoso

Patogenicidade de *Lecanicillium fungicola* em *Agaricus*

bisporus / Cinthia Elen Cardoso Caitano. -- Jaboticabal, 2020

57 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal

Orientador: Diego Cunha Zied

1. Cogumelos Comestíveis. 2. Micologia. 3. Fungos. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: *PATOGENICIDADE DE Lecanicillium fungicola EM Agaricus bisporus*

AUTORA: CINTHIA ELEN CARDOSO CAITANO

ORIENTADOR: DIEGO CUNHA ZIED

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DIEGO CUNHA ZIED
FCAT-UNESP / Dracena/SP

Prof. Dr. EVANDRO PEREIRA PRADO
FCAT - UNESP / Dracena/SP

Prof. Dr. EUSTÁQUIO SOUZA DIAS
Departamento de Biologia-UFLA / Lavras/MG
(VIDEOCONFERÊNCIA)

Jaboticabal, 27 de março de 2020

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Cinthia Elen Cardoso Caitano, nascida em Junqueirópolis no dia 03 de junho de 1996. Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Unesp Campus de Dracena em 2018. Bolsista Fapesp na graduação no ano de 2016 e bolsista Pibic – Ações Afirmativas em 2017/2018. Possui um artigo publicado intitulado “Using of Appropriated Strains in the Practice of Compost Supplementation for *Agaricus subrufescens* Production” no periódico Frontiers in Sustainable Food Systems em 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, nunca me abandonar e me dar forças nos momentos mais difíceis. À Nossa Senhora Aparecida, que me cobre com seu manto me acalmando e protegendo.

Às minhas tias Marinalda e Marta, que não mediram esforços para que essa pós-graduação fosse possível, além de todo suporte em minha vida pessoal, muitas vezes sendo minhas “mães”.

Ao meu pai Adão e meu irmão César, que sempre me apoiaram e incentivaram a estudar e batalhar.

Ao meu orientador, professor Diego Cunha Zied, pelos ensinamentos, conselhos e confiança nesses anos todos, que me fizeram evoluir de maneira inexplicável.

Ao grupo de estudos CECOG, pessoas que se tornaram irmãos e irmãs e que lembrarei sempre com imenso carinho e levarei em meu coração. Especialmente ao Matheus, Lucas Alves, Isabela e Wagner, que, mesmo em dificuldades, estavam dispostos a colaborar com este experimento ou em qualquer trabalho do grupo.

Às moradoras da Republica 4x4 de Jaboticabal que, em pouco tempo de convivência, se tornaram amigas e companheiras inesquecíveis.

A todos os docentes e técnicos administrativo do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agropecuária, que acompanham a trajetória dos alunos com todo respeito.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta pesquisa se tornasse realidade.

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	2
2.1. <i>Agaricus bisporus</i>	2
2.2. <i>Lecanicillium fungicola</i>	4
2.3. Controle e monitoramento do patógeno	5
3. Referências bibliográficas	6
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ESTRUTURAS VEGETATIVAS E REPRODUTIVAS DOS FUNGOS <i>Agaricus bisporus</i> E <i>Lecanicillium fungicola</i>	10
1. Introdução	12
2. Material e Métodos	13
2.1. Isolados de <i>Lecanicillium fungicola</i>	13
2.2. Linhagens de <i>Agaricus bisporus</i>	14
2.3. Caracterização <i>in vitro</i> de estruturas morfológicas de <i>Agaricus bisporus</i> e <i>Lecanicillium fungicola</i>	14
2.4. Caracterização da infecção patógeno hospedeiro <i>in vivo</i>	15
2.5. Avaliação do desenvolvimento morfológico dos cogumelos	17
3. Resultados e Discussão	19
3.1. Caracterização <i>in vitro</i> de estruturas morfológicas de <i>Agaricus bisporus</i> e <i>Lecanicillium fungicola</i>	19
3.2. Caracterização da infecção patógeno hospedeiro <i>in vivo</i>	20
3.3. Avaliação do desenvolvimento morfológico dos cogumelos	23
4. Conclusão	25
5. Referências Bibliográficas	26
CAPÍTULO 3 – TOLERÂNCIA DE LINHAGENS DE <i>Agaricus bisporus</i> COLORAÇÃO BRANCA E CREME A ISOLADOS DE <i>Lecanicillium fungicola</i>	28
1. Introdução	30

2	Material e Métodos	31
2.1.	Isolados de <i>Lecanicillium fungicola</i>	31
2.2.	Linhagens de <i>Agaricus bisporus</i>	31
2.3.	Produção do composto	32
2.4.	Cultivo	32
2.5.	Variáveis analisadas	34
2.6.	Análises estatísticas	36
3.	Resultados e Discussão	36
4.	Conclusão	45
5.	Referências bibliográficas	45

PATOGENICIDADE DE *Lecanicillium fungicola* EM *Agaricus bisporus*

RESUMO – O fungo *Lecanicillium fungicola* é um importante patógeno no cultivo de *Agaricus bisporus*, apresentando diversos sintomas e perdas de produção. O objetivo do trabalho foi avaliar interações *in vivo* e *in vitro* dos fungos *Lecanicillium fungicola* e *Agaricus bisporus*. Os experimentos *in vitro* foram feitos utilizando discos de micélio do patógeno e composto colonizado pelo *A. bisporus*. O composto colonizado também foi utilizado para a frutificação de cogumelos tanto em tamanho menor em placas de petri como em maior quantidade. Foram aplicados quatro suspensões de esporos *L. fungicola* nos cogumelos em placas de petri, de acordo com o seu tratamento. Não ocorreu a paralisação do crescimento micelial *in vitro* no momento em que o patógeno e o hospedeiro se encontram. Após 36 horas a inoculação do patógeno foi possível a visualização de manchas no píleo e após 60 horas a visualização de hifas e esporos. A linhagem coloração creme apresentou maior massa e diâmetro do píleo e menor porcentagem de rompimento do véu. A linhagem de *A. bisporus* de coloração branca obteve maior produtividade do que a linhagem de coloração creme. O isolado LF 19/03 apresentou maior agressividade em ambas as linhagens de *A. bisporus*. Os diversos sintomas encontrados no decorrer da pesquisa possibilitaram a confecção de uma escala diagramática para auxiliar o produtor na comercialização dos cogumelos doentes.

Palavras-chave: cogumelos comestíveis, fungos, micologia

PATHOGENICITY OF *Lecanicillium fungicola* IN *Agaricus bisporus*

ABSTRACT – The fungus *Lecanicillium fungicola* is an important pathogen in the cultivation of *Agaricus bisporus*, presenting several symptoms and production losses. The objective of the work was to evaluate interactions *in vivo* and *in vitro* of the fungi *Lecanicillium fungicola* and *Agaricus bisporus*. The *in vitro* experiments were done using mycelium discs of the pathogen and compound colonized by *A. bisporus*. The colonized compost was also used for the fruiting of mushrooms both in smaller size in petri dishes and in greater quantity. Four suspensions of *L. fungicola* spores were applied to the boxes according to their treatment. Mycelial growth did not stop *in vitro* at the time the pathogen and host meet. After 36 hours the inoculation of the pathogen made it possible to see spots on the cap and after 60 hours, to view hyphae and spores. The cream-colored lineage showed greater mass and diameter of the cap and lesser percentage of rupture of the veil. The white colored *A. bisporus* strain obtained higher productivity than the cream colored strain. The isolate LF 19/03 showed greater aggressiveness in both strains of *A. bisporus*. The various symptoms found in the course of the research enabled the production of a diagrammatic scale to assist the producer in the sale of sick mushrooms.

Keywords: edible mushrooms,, fungus, mycology

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

O *Agaricus bisporus* é um cogumelo comestível conhecido no Brasil como Champignon ou Cogumelo Paris. Por sua característica lignolítico e saprófita o cultivo é realizado em compostos formulados pasteurizados (Bonnen et al. 1994). O *A. bisporus* foi, segundo registros bibliográficos, descoberto na Europa e introduzido no Brasil em 1953, caracterizando-o como um cultivo recente.

Para a produção de *A. bisporus* é necessário um recobrimento do composto, etapa esta denominada de adição da camada de cobertura, geralmente uma camada de turfa de musgo com a finalidade de dar suporte físico aos futuros cogumelos. Esse material também é responsável por manter a umidade do composto e fornecer água aos basidiomas, facilitando o transporte de nutrientes (Pardo-Gimenez et al. 2017). Apesar de todos os benefícios, a camada de cobertura pode ser associada a contaminação por *Lecanicillium fungicola*, causador da doença bolha seca (Stanojević et al. 2019).

A doença bolha seca mostra-se como uma dificuldade persistente para os produtores de cogumelos em todos os países produtores (Gea Alegría et al. 2014), constituindo-se como a doença mais comum e grave dos cultivos de champignon que se não controlada, pode destruir completamente uma produção em duas ou três semanas (Fletcher et al. 1986).

O controle da bolha seca é feito mediante medidas de sanitização, envolvendo higiene e limpeza do local e dos arredores. A aplicação de fungicidas também pode ser uma ferramenta de controle, porém no Brasil, essa prática em produções de cogumelos não é autorizada, sendo necessário a prática como a pasteurização do lote de composto exaurido após o cultivo para evitar a permanência e a multiplicação deste patógeno na propriedade (Zied et al. 2015).

Neste sentido a busca por alternativas para conviver com este patógeno nos cultivos brasileiros é intensa, sabendo que não é possível erradicá-lo e tendo ainda como ponto crítico o clima tropical do Brasil favorável para o desenvolvimento do patógeno, todas as alternativas de controle são medidas que reduzirão a ação do

patógeno nos cultivos comerciais. Assim estratégias que caracterizem a ecologia da interação patógeno-hospedeiro e seu monitoramento são fundamentais.

Com isso o objetivo deste trabalho foi i) caracterizar a interação patógeno hospedeiro *in vitro* e *in vivo*; ii) avaliar o comportamento agrônomo de duas linhagens de *A. bisporus*, coloração branca e creme expostas a quatro isolados de *Lecanicillium fungicola*, quando submetidas ou não ao ataque do patógeno; iii) identificar isolados do patógeno mais agressivos a uma determinada linhagem; e iv) confeccionar uma escala diagramática com sintomas de manchas nos cogumelos atacados.

2. Revisão de Literatura

2.1. *Agaricus bisporus*

O gênero *Agaricus*, abrange importantes espécies de cogumelos comestíveis de impacto econômico no setor da fungicultura, como: *A. bisporus* (Champignon), *A. bitorquis* ("Bitorquis") e *A. bisporus* (Porto Belo) variedade creme. Como registro bibliográfico, grande parte destas espécies foram descobertas na Europa, como é o caso do Champignon. Um produtor francês em 1650, encontrou pela primeira vez de forma casual basidiomas formando junto à mistura de capins e esterco utilizados como cama para o cultivo de melões (Bels-Koning & Bels, 1958). Porém a produção comercial somente foi descrita detalhadamente no ano de 1707, pelo Botânico francês Tournefort (van Griensven, 1988).

Em 1731 o método de cultivo francês foi introduzido na Inglaterra pelo pesquisador Miller, através da publicação "Gardener's Dictionary" (Lachaume, 1882). Somente em 1769 esta publicação chegou à Alemanha, onde se iniciou um cultivo de Champignon em pequena escala (van Griensven, 1988). Neste entretempo em 1754, Lundberg na Suécia descreveu como deveria ser uma câmara de produção para cultivar *A. bisporus* durante todas as épocas do ano (Vedder, 1996). Em 1800, o Champignon se consolida o primeiro cogumelo comestível mais cultivado no mundo (Moraga, 1997).

Somente em 1865 o cultivo foi introduzido na América (Vedder, 1996) e no Brasil se deu início apenas em 1953, quando imigrantes chineses e italianos se fixaram em Mogi-das-Cruzes e Atibaia, no Estado de São Paulo. De maneira

extremamente artesanal, com linhagens trazidas pelos próprios imigrantes, as quais foram submetidas ao processo de cultivo, em condições completamente diferentes ao que se realizavam no exterior “denominado de cultivo tradicional” (Bononi et al., 1999), os imigrantes chineses e italianos se deparam com dificuldades e problemas gerados decorrente de um cultivo empírico, onde nova adaptação de tecnologia de cultivo se fazia necessário para conseguir uma viabilidade econômica sustentável.

Na década de 80 o surgimento da técnica conhecida como Juncao (Jun – cogumelo, Cao – gramíneas) na China, popularizou, ainda mais, o cultivo de cogumelos no país, unindo vantagens econômicas e sociais (Urban, 2017). Na mesma época, o aumento da demanda dos consumidores junto aos supermercados, a criação de núcleos de estudos e extensão aos fungicultores, o surgimento de laboratórios de inóculo e o intercâmbio de informações e materiais com empresas qualificadas no exterior (tanto a nível de assistência técnica quanto à importação de linhagens) tornou o começou a tornar o cultivo de cogumelos economicamente viável..

Atualmente, como maior dificuldade junto ao setor produtivo se tem i) a elevada diversidade de linhagens utilizadas, onde não se sabe a origem do laboratório que se adquiriu estas linhagens, suas características genéticas (híbrido ou não), e ii) o grave problema da presença de contaminantes e doenças nos cultivos, onde se tem condições precárias nas câmaras de produção (prateleiras de bambu e ausência de piso concreto “chão batido”), ciclos de cultivo durante todo o ano, ausência de material genético com resistência e principalmente pouca tecnologia para desinfestação de ambiente (ex. utilização de vapor para tratamento do composto exaurido, antes de sair da câmara de produção), o que resulta em grandes perdas econômicas devido a contaminações acumulada causada por *Lecanicillium* sp, a principal doença encontra junto a fungicultura nacional e internacional.

O *Agaricus bisporus* é o quarto cogumelo mais cultivado no mundo, com 15% da produção de cogumelos comestíveis, perdendo posição para o shiitake (*Lentinula edodes*), shimeji (*Pleurotus spp*) e orelha de judas (*Auricularia spp*) esse último pouco conhecido no Brasil. A China é responsável por 54% da produção mundial dessa espécie (Royse et al., 2017).

Os cogumelos, de modo geral, apresentam baixo teor de gordura e elevado teor de umidade, não sendo diferente para o *A. bisporus*, apresentando 0,19 g de

gordura para cada 100g de cogumelos e 91,27% de umidade. Outros valores nutricionais dessa espécie são de proteínas e energia, 1,23 g 100⁻¹ g e 30,86 kcal 100⁻¹ g de cogumelos, respectivamente (REIS et al., 2012). Lakhanpal e Rana (2005) encontraram, para os mesmos parâmetros, resultados semelhantes, em torno de 90,1% de umidade, 2,9 g 100⁻¹ g de proteínas e 0,3 g 100⁻¹ g de gordura. Ainda segundo os autores, o *A. bisporus* auxilia no aumento da secreção de insulina e tem ação anti-envelhecimento devido a presença da molécula bioativa lectina.

Existem diversas linhagens de *A. bisporus* disponíveis aos produtores para a produção, consequentemente apresentam diferenças em produtividade e manejo de cultivo. Zied et al. (2015), estudaram a produtividade e número de cogumelos de quinze linhagens obtidas de diversas localidades do mundo e obtiveram produtividades variando de 8,08% até 21%, e número de cogumelos de 23,33 cogumelos e 95,5 unidades. Dessa mesma forma, Muhammad et al. (2019), identificou rendimentos diferentes para outras linhagens, com valores entre 5,35 kg de cogumelo m⁻² e 8,92 kg de cogumelo m⁻².

2.2. *Lecanicillium fungicola*

Lecanicillium fungicola (syn. *Verticillium fungicola*) é o agente causal da doença conhecida como bolha seca ou bob. Duas variedades são reconhecidamente responsáveis pela doença, a var. *alelophilum* e a var. *fungicola* (Largeteau et al. 2006). Em meio ágar-malte, este patógeno forma colônias arredondadas com borda regular e radiante. Sua aparência é pulverulenta e cotonosa, com uma cor branca a pálida, destacando claramente as massas de conídios. Os conidióforos são eretos, com os conídios no formato elipsoide a cilíndrico, com ápice obtuso, hialinos, unicelulares, com tamanho médio de 7,5 x 2,5 µm (Gea, 1993).

A temperatura ideal de crescimento desse fungo é de 20 °C (Gea e Navarro, 2017), condições semelhantes ao crescimento do hospedeiro *A. bisporus*. Além do *A. bisporus* outros cogumelos são hospedeiros do patógeno, porém os sintomas são menos evidentes, tornando o *A. bisporus* o hospedeiro mais comum e mais suscetível (Berendsen et al. 2010).

Os sintomas de bolha seca variam de acordo com a etapa de cultivo em que ocorre o contato patógeno-hospedeiro. O mais comum ocorre nos basidiomas já desenvolvidos, em estágio de colheita, com o aparecimento de manchas de coloração canela com contorno irregular na superfície do píleo. Outro tipo de sintoma ocorre quando o patógeno invade os tecidos do estipe, deixando-o com aspecto quebradiço (fendilhamento e até rachaduras) denominado craqueamento. O último tipo de sintoma é indicativo de uma infecção mais severa e precoce na camada de cobertura, neste caso, os primórdios recém-formados são infectados prematuramente, adquirindo uma forma globosa, malformada e desuniforme (Largeteau e Savoie 2010).

A doença é comumente associada a camada de cobertura do cultivo de *A. bisporus*, pois, o composto é submetido ao processo de pasteurização e condicionamento, atingindo temperatura superior a 40°C o que inviabiliza a sobrevivência dos esporos deste patógeno (Berendsen et al. 2010).

O *L. fungicola* possui massas esféricas com dezenas de conídios, envolvidos por uma mucilagem, o que explica, em parte, a facilidade de disseminação que este patógeno possui (Ware, 1933). Esta mucilagem que os rodeiam facilita a aderência em qualquer superfície que entre em contato e, quando em condições adversas, os mantém viáveis por certo período.

2.3. Controle e monitoramento do patógeno

No exterior, onde o cultivo de cogumelo representa uma das principais fontes de alimentação proteica, a medida de controle mais adotada é a aplicação de fungicidas seletivos (Wuest et al., 1974; Fletcher e Yarham, 1976; Gea et al., 2003). No Brasil esta prática não pode ser realizada, devido não existir nenhum fungicida registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que permita a aplicação no cultivo de cogumelos.

No entanto, a liberação de produtos fitossanitários em outros países, vem provocando uma certa pressão de seleção dos indivíduos, sendo possível observar a resistência de isolados de *L. fungicola* a fungicidas como benomil, carbendazim, carbendazin+iprodiona (Mehrparvar et al., 2013).

No Brasil, nos últimos anos óleos essenciais extraídos de *Melissa officinalis* (erva-cidreira), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Origanum vulgare* (orégano), *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Cinnamomum zeylanicum* (canela) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-Índia) foram utilizados como uma alternativa de controle de *L. fungicola*. Segundo os autores a aplicação dos extratos após a infecção do patógeno foi mais eficiente que a aplicação antes da infecção do patógeno, para o controle da doença (Santos et al., 2017).

Assim, uma das medidas mais eficientes adotadas tem sido a prevenção da entrada e o monitoramento do patógeno nos ambientes de cultivo, práticas difíceis de serem controladas nos grandes produtores de champignon, devido ao grande número de funcionários envolvidos e a intensidade de ações adotadas diariamente para a produção de cogumelos.

Como não é permitido a aplicação de fungicidas no cultivo de cogumelos (Nunes et al. 2017), o monitoramento nas câmaras de produção se faz necessário para orientar o fungicultor o momento adequado de descartar a produção, ou pelo menos parte da produção, mesmo que, ainda não tenha completado o ciclo total da produção de cogumelos, com a obtenção de todos os fluxos de colheita. Esta medida prevenirá o acúmulo e/ou contaminação desnecessária do patógeno nas câmaras de cultivo e até nas propriedades rurais dos fungicultores.

Atualmente não existe uma escala diagramática para avaliar o nível de infestação de *L. fungicola* em linhagens comerciais de *A. bisporus* no Brasil e no exterior, assim o desenvolvimento de uma escala diagramática orientaria a tomada de decisão do fungicultor, com o intuito de prever a redução da produtividade do cogumelo durante as estações climáticas ao longo do ano, além de evitar a disseminação do patógeno vindo a causar maiores danos futuramente.

3. Referências bibliográficas

Bels-Koning HC, Bels PJ (1958) Handleiding voor de Champignoncultuur. **Horst**, 295.

Berendsen RL, Baars JJ, Kalkhove SI, Lugones LG, Wösten HA, Bakker PA (2010) *Lecanicillium fungicola*: causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. *Molecular plant pathology* 11:585-595.

Bononi VL, Capelari M, Maziero R, Trufem SFB (1999) **Cultivo de cogumelos comestíveis**. 2° ed, p. 206.

Fletcher JT, Yarham DJ (1976) The incidence of benomyl tolerance in *Verticillium fungicola*, *Mycogone perniciosus*, and *Hypomyces rosellus* in mushroom crops. *Applied Biology*, 84:343-353.

Gea FJA (1993) Observaciones sobre la enfermedad de la “Mole Seca”, causada por *Verticillium fungicola*, em los cultivos de Champiñón de Castilla-La Mancha. In: **I Jornada Técnicas del Champiñón y otros hongos comestibles em Castilla-La Mancha**, p. 71-84.

Gea FJ., Navarro, MJ (2017) Mushrooms diseases and control. In Zied. DC, Pardo-Gimenez A (Eds) **Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications**. West Sessex: John Wiley & Sons Wiley Blackwell, p. 239 – 259.

Lachaume J (1882) Le champignon de couche, culture bourgeoise et commerciale, récolte et conservation. Librairie agricole de la maison rustique, Paris.

Lakhanpal TN, Rana M (2005) Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. **Plant Genetic Resources** 3:288-303.

Largeveau ML, Baars JP, Regnault-Roger C, Savoie JM (2006). Molecular and physiological diversity among *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. **Mycological Research** 110:431-440.

Mehrparvar M, Mohammadi GE, Safai, N (2013) Resistance of Iranian *Lecanicillium fungicola* to benzimidazole and ergosterol demethylation inhibiting fungicides. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 15:389-395.

Moraga JA (1997) Estadísticas sobre el comercio internacional del Champiñón y estudio sobre el consumo de Champiñón en España. In: **Avances en la tecnología de la producción comercial del Champiñón y otros hongos cultivados**. Casasimaro, Cuenca, Spain, p. 303-323.

Muhammad I, Sossah FL, Yang Y, Li D, Li S, Fu Y, Li Y (2019). Identification of resistance to cobweb disease caused by *Cladobotryum mycophilum* in wild and cultivated strains of *Agaricus bisporus* and screening for bioactive botanicals. **The Royal Society of Chemistry** 9:14758-14765.

Nunes JS, de Brito MR, Zied DC, Leite EAG, Dias ES, Alves E (2017). Evaluation of the infection process by *Lecanicillium fungicola* in *Agaricus bisporus* by scanning electron microscopy. **Revista Iberoamericana De Micologia**, 34:36-42.

Reis FS, Barros L, Martins A, Ferreira IC (2012) Composição química e valor nutricional dos cogumelos cultivados mais apreciados: um estudo comparativo entre espécies. **Food and Chemical Toxicology** 50:191-197.

Royse DJ, Baars J, Tan QI (2017) Current Overview of mushroom production in the world. In Zied. DC, Pardo-Gimenez A (Eds). **Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications**. West Sussex: John Wiley & Sons Wiley Blackwell, p. 05 – 13.

Santos TLD, Belan, LL, Zied DC, Dias ES, Alves E (2017) Essential oils in the control of dry bubble disease in white button mushroom. **Ciência Rural**, 47:1-7.

Urban AF, Uriarte AH (2017) Princípios do cultivo de cogumelos pela técnica JunCao. In.: Urban AF (ed.) **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada: Biotecnologia e aplicação na agricultura e na saúde**. Brasília: EMBRAPA, p. 66.

van Griensven LJLD (1988) The cultivation of mushrooms. East Grinstead, Sussex, p. 515.

Vedder PJC (1996) Cultivo moderno del Champiñon. Ediciones Mundi-Prensa, p. 369.

Wuest PJ, Cole H, Sanders PL (1974) Tolerance of *Verticillium malthousei* to benomyl. **Phytopathology**, 64:331-334.

Zare R, Gams W (2008). A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. **Mycological Research** 112:811-824.

Zied DC, Nunes JS, Nicolini VF, Gimenez AP, Rinker DL, Dias ES (2015). Tolerance to *Lecanicillium fungicola* and yield of *Agaricus bisporus* strains used in Brazil. **Scientia Horticulturae** 190:117-122.

CAPITULO 2 – Caracterização Morfológica De Estruturas Vegetativas E Reprodutivas Dos Fungos *Agaricus bisporus* E *Lecanicillium fungicola*

RESUMO – O objetivo do trabalho foi avaliar interações *in vitro* dos fungos *Lecanicillium fungicola* e *Agaricus bisporus*. Os experimentos *in vitro* foram feitos utilizando discos de micélio do patógeno e composto colonizado pelo *A. bisporus*. O composto colonizado também foi utilizado para a frutificação de cogumelos tanto em tamanho menor em placas de petri como em maior quantidade. A suspensão de esporos foi adicionada ao píleo do cogumelo em desenvolvimento. Não ocorreu a paralisação do crescimento micelial *in vitro* no momento em que o patógeno e o hospedeiro se encontram. Após 36 horas a inoculação do patógeno foi possível a visualização de manchas no píleo e após 60 horas a visualização de hifas e esporos. A linhagem coloração creme apresentou maior massa e diâmetro do píleo e menor porcentagem de rompimento do véu.

Palavras-chave: Bolha seca, cogumelos, crescimento micelial

CAPITULO 2 – Morphological characterization of vegetative and reproductive structures of the fungi *Agaricus bisporus* and *Lecanicillium fungicola*

ABSTRACT – The objective of the work was to evaluate *in vitro* interactions of the fungi *Lecanicillium fungicola* and *Agaricus bisporus*. The *in vitro* experiments were done using mycelium discs of the pathogen and compound colonized by *A. bisporus*. The colonized compost was also used for the fruiting of mushrooms both in smaller size in petri dishes and in greater quantity. The spore suspension was added to the cap of the developing mushroom. Mycelial growth did not stop *in vitro* at the time the pathogen and host meet. After 36 hours the inoculation of the pathogen made it possible to see spots on the cap and after 60 hours, to view hyphae and spores. The cream-colored lineage showed greater mass and diameter of the cap and lesser percentage of rupture of the veil.

Palavras-chave: Dry bubble, mushrooms, mycelial growth

1. Introdução

O gênero *Agaricus* sp., abrange importantes espécies de cogumelos comestíveis de impacto econômico no setor da fungicultura, como: *A. bisporus* (champignon), *A. bitorquis* (“Bitorquis”) e *A. bisporus* (Porto Belo) variedade creme. A espécie mais cultivada em todos os países é o *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach var. *bisporus*.

As linhagens de champignon são características por apresentarem apenas dois esporos sexuados sobre cada basídio. O píleo possui 5 a 6 cm de diâmetro, podendo alguns chegar a 10 cm quando maduro (mais desenvolvido). O estipe é curto, cilíndrico, branco-creme, fistuloso e ligeiramente bulboso. Anel médio-superior, ascendente, não muito amplo e membranoso (Heinemann, 1977). O *A. bisporus* possui micélio septado com número variado de núcleos (podendo variar entre 5 e 20) (Vedder, 1996).

Já o Porto Belo (coloração creme), vem sendo recentemente cultivado no Brasil, tratando-se de um cogumelo robusto, com o estipe curto e largo, ligeiramente engrossado até a base. O píleo é inicialmente globoso, mas rapidamente se torna convexo, e quando maduro chega a ser plano, o mesmo possui entre 8-10cm de diâmetro, podendo alguns chegar a 12 cm quando maduro. Os cogumelos são lisos, que ao se desenvolver formam escamas (agrupamento de pequenas fibras) que escurecem formando uma coloração amarronzada característica da linhagem. As lamelas são finas, inicialmente rosa-claro e se escurecem devido à maturação dos esporos (Dhar, 2017).

Essas linhagens de *A. bisporus* (coloração branca e creme) representam uma grande fatia do mercado nacional de cogumelos. Dentre as espécies mais consumidas no Brasil, o champignon em conserva atinge o primeiro lugar em popularidade. No entanto estas linhagens sofrem o ataque de um patógeno (*Lecanicillium fungicola*) que dependendo da severidade, pode deixar o cogumelo completamente deformado, com o aspecto de uma massa globosa, malformada e desuniforme (Largeteau e Savoie, 2010).

Um estágio anterior de infecção e mais comum nos cogumelos cultivados no Brasil refere-se ao aparecimento de manchas de coloração marrom e contorno

irregular na superfície do píleo (Regnier e Combrinck 2010). A sintomatologia dos cogumelos atacados varia de acordo com a etapa de cultivo em que ocorreu o contato patógeno-hospedeiro.

Quanto ao aspecto microscópico, o que caracteriza o *L. fungicola* são os conidióforos verticiliados, produzindo uma quantidade enorme de esporos hialinos e unicelulares. O micélio possui coloração branca-acinzentada o qual pode ser facilmente confundido com o micélio de *Agaricus sp*, o que dificulta sua visualização nos cultivos comerciais (Tanović et al., 2009). Outra importante característica refere-se a sua elevada velocidade de reprodução, onde autores reportaram que em apenas 19 horas os conídios já começam a germinar (Santos et al., 2017) e as 50 horas o ciclo de vida do patógeno já está completo, com a formação de novos conídios (Zied et al., 2015).

Assim o objetivo do trabalho foi i) avaliar as características morfológicas do crescimento de *L. fungicola* e *A. bisporus in vitro* e sua possível interação, ii) acompanhar a formação de manchas e o aparecimento de hifas e esporos na superfície do píleo do hospedeiro, e iii) caracterizar morfológicamente os basidiomas das linhagens coloração creme e branca.

2. Material e Métodos

2.1. Isolados de *L. fungicola*

O isolado de *L. fungicola* foi obtido na região de Pinhalzinho (LF 19/04), no Estado de São Paulo. A coleta para o isolamento aconteceu em produções com histórico da doença através de cogumelos que apresentaram sintomas de lesões necróticas marrons na superfície do píleo ou o craqueamento do estipe. Os cogumelos foram acondicionados em sacos de papel para transporte e, em laboratório, foram desinfestados superficialmente com álcool 70% e um pequeno tecido com sintoma foi transferido para placa de petri com meio BDA (batata, dextrose e ágar - Difco®), a qual foi mantida em BOD a 25°C (Gea Alegría 1996). Posteriormente o patógeno foi identificado visualmente pela morfologia do crescimento da colônia em placa, apresentando-se com micélios brancos densos e alta concentração de esporos e por

visualizações das hifas e esporos em microscópio com lente de aumento de 40 vezes (Zare e Gams 2008).

2.2. Linhagens de *A. bisporus*

As linhagens de *A. bisporus* utilizadas foram de coloração branca - ABI 19/01 (popularmente conhecida como champignon) e de coloração creme - PB 19/01 (popularmente conhecida como Porto Belo), as quais estão mantidas na micoteca do Centro de Estudos em Cogumelos, o CECOG, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Câmpus de Dracena. A replicação foi feita em placa de petri com meio BDA seguindo as etapas de produção da matriz primaria, secundaria, terciaria e “Spawn” (Zied et al. 2010).

2.3. Caracterização *in vitro* de estruturas morfológicas de *Agaricus bisporus* e *Lecanicillium fungicola*

Para a caracterização de estruturas vegetativas do *A. bisporus* (coloração branca) e *L. fungicola*, um disco de micélio de *L. fungicola* (1 cm de diâmetro) foi depositado com a parte micelial voltada para baixo, em uma placa de petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar - Difco®). Logo 3 g de composto colonizado pelo *A. bisporus* foi adicionado paralelamente e em lado oposto na placa de petri de vidro (80mmx15mm) com a distância de aproximadamente 2,5 cm (Figura 1). O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar, obedecendo os padrões de assepsia. Após a inoculação das placas, as mesmas foram acondicionadas a 25°C em câmara BOD.



Figura 1: (a) Disposição dos fungos *Lecanicillium fungicola* e (b) *Agaricus bisporus* na placa de petri com meio de cultura BDA.

Após o início do crescimento do micélio as placas foram observadas ao estereomicroscópio Zeiss V-20 (Discovery) e fotografadas diariamente através do programa Zen. Com as imagens e o mesmo programa informático, foram feitas as medições de diâmetro de hifas. As medições foram realizadas tanto para verificação da interação entre os dois fungos, como para caracterização morfológica das hifas de ambos. Foram analisadas 5 placas de petri montadas conforme descrito previamente e nas fotos retiradas foram plotados 10 pontos de medição das hifas. A diferença entre os resultados obtidos foi comparada através do desvio padrão.

2.4. Caracterização da infecção patógeno hospedeiro *in vivo*

Para a verificação da interação patógeno hospedeiro nos cogumelos, 50 g do composto já colonizado foram adicionados em placas de petri de vidro (150x20mm). A camada de cobertura, à base de turfa foi adicionada com 1 cm de altura sobre o composto colonizado (Figura 2). As placas foram mantidas em câmara de cultivo a 25 °C por 8 dias para a corrida de micélio e a 19 °C para a frutificação.



Figura 2: (a) Preparo da placa de petri com composto colonizado por *Agaricus bisporus* e (b) corpo de frutificação após adição da camada de cobertura e estresse térmico.

Com a frutificação dos cogumelos, quatro gotas de 5 μ l de suspensão de conídios de *L. fungicola*, na concentração de 10^4 conídios por m^2 , foram adicionadas ao píleo do cogumelo em quatro locais diferentes (Figura 3). Os cogumelos não foram colhidos para manter sua plena atividade metabólica. Em seguida as placas novamente foram mantidas na câmara de cultivo de cogumelos.



Figura 3: Disposição das gotas de suspensão de esporos do fungo *Lecanicillium fungicola* no píleo do cogumelo *Agaricus bisporus*.

As avaliações para verificar a evolução do nível dos sintomas foram feitas a cada 12 horas utilizando o estereomicroscópio Zeiss V-20 (Discovery) e o programa informático Zen. Foram analisados a média de crescimento dos cogumelos (utilizando os valores da segunda análise menos os valores da primeira análise, dividido pelo valor inicial e multiplicado por 100), a evolução do nível do sintoma (tamanho da mancha) (calculado através do diâmetro, uma medição na horizontal e outra na vertical), aparecimento de sintomas e de sinais (esporos) e tamanho dos esporos a cada avaliação. Foram avaliados dois cogumelos infectados. A presença de coloração mais escura indicando o surgimento dos sintomas da doença e o aparecimento dos esporos também foi considerado para orientação dos sintomas e sinais. Apenas a linhagem creme foi analisada.

2.5. Avaliação do desenvolvimento morfológico dos cogumelos

Para essa avaliação a produção de cogumelos foi realizada em um volume maior, semelhante a uma produção comercial, assim utilizou-se caixas plásticas medindo 30x40 cm onde foram acondicionados 3,5 kg de composto e inoculado com 1% de

inóculo do *A. bisporus*. As linhagens ABI 19/01 e PB 19/01 foram avaliadas nesta etapa, cada uma com 20 caixas.

As caixas foram mantidas em câmara de cultivo por 15 dias a 25 °C para a colonização do composto. Após a colonização da camada de cobertura à base de trufa de musgo foi adicionada sobre o composto com 4 cm de altura. Logo as caixas foram mantidas em câmara de cultivo a 25 °C por 8 dias para a corrida de micélio na camada de cobertura e a 19 °C por 15 dias para a frutificação.

Após os cogumelos crescerem e saírem do estado de “botão”, foram feitas medições do diâmetro do píleo (Figura 4) de maneira escalonada, ou seja, mesmo que os cogumelos atingissem o ponto de colheita (estado fenológico 3, 4, 5 e 6) (Hammond e Nichols ,1976), os mesmos seriam mantidos no composto para continuar sua plena atividade metabólica. Ademais foi realizado 6 colheitas espaçadas por 6 horas, e em cada momento de colheita três cogumelos de cada linhagem foram avaliados. Foi feita a medição do diâmetro do píleo e a pesagem dos cogumelos. A diferença entre os resultados obtidos dos 3 cogumelos avaliados foram comparados através do desvio padrão.

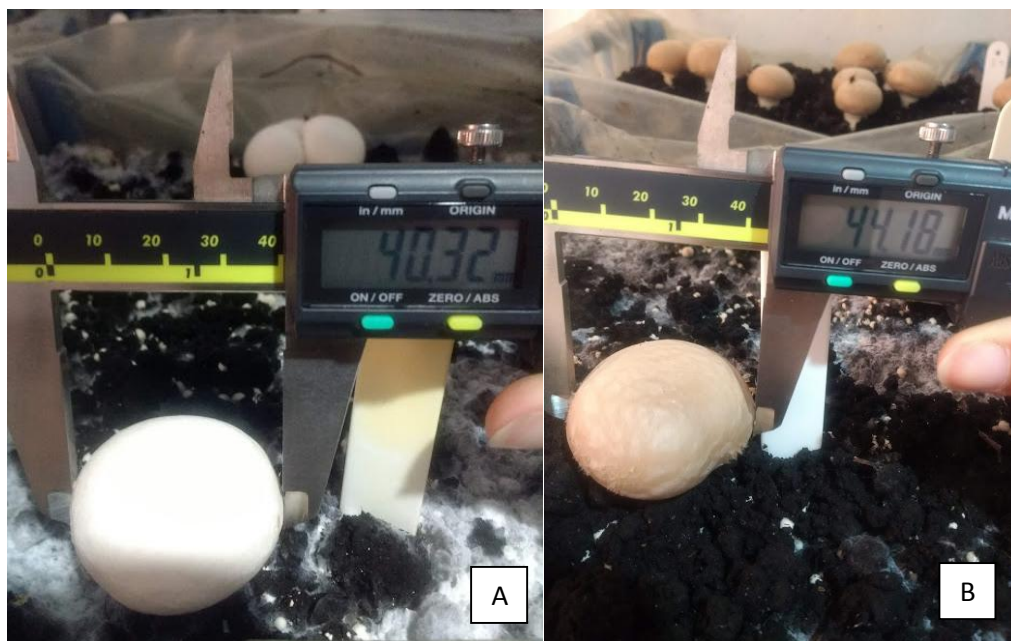


Figura 4: (a) Medição dos cogumelos *Agaricus bisporus* linhagens ABI 19/01 e (b) PB 19/01 antes da primeira colheita.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização *in vitro* de estruturas morfológicas de *A. bisporus* e *L. fungicola*

As hifas do *A. bisporus* apresentaram maior diâmetro comparado as hifas do patógeno *L. fungicola* (Figura 5), sendo observado hifas com 21,58 μm de diâmetro para o fungo *A. bisporus* e 5,54 μm de diâmetro para o fungo *L. fungicola*.

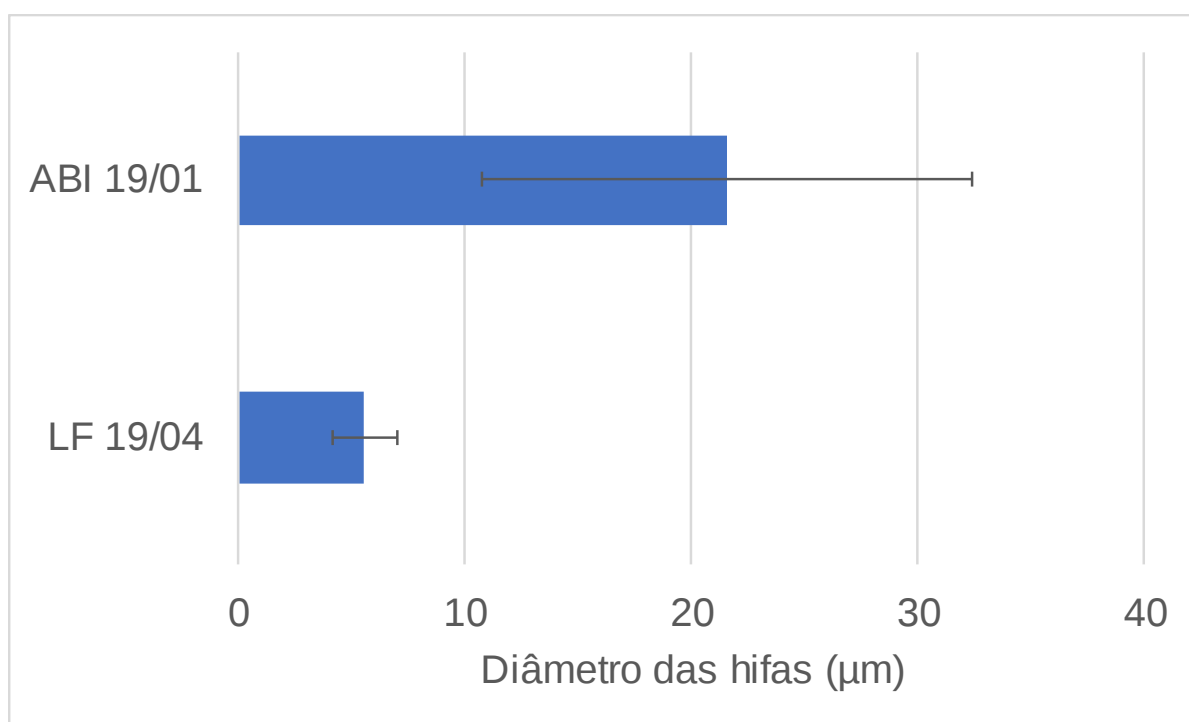


Figura 5: Diâmetro (μm) das hifas dos fungos *Agaricus bisporus* linhagem ABI 19/01 e *Lecanicillium fungicola* isolado LF 19/04 em placa de petri com meio BDA.

O fungo *L. fungicola* apresentou crescimento na placa mais rente ao meio de cultura enquanto as hifas do *A. bisporus* eram mais aéreas (Figura 6). Na figura 7 foi possível visualizar o momento em que os dois micélios se encontram não ocorrendo a paralisação do crescimento entre os fungos, inclusive ocorre a produção de esporos de *L. fungicola*, porém não é possível identificar interação entre os mesmos, como relatado por Gea e Navarro (2017). Na imagem, o micélio de *A. bisporus* obtém uma coloração mais escura (marrom), característica do envelhecimento (mycelial cord) e

morte das hifas formando uma estrutura pseudoparenquimatosa tridimensional (Umar e Van Griensven, 1998).

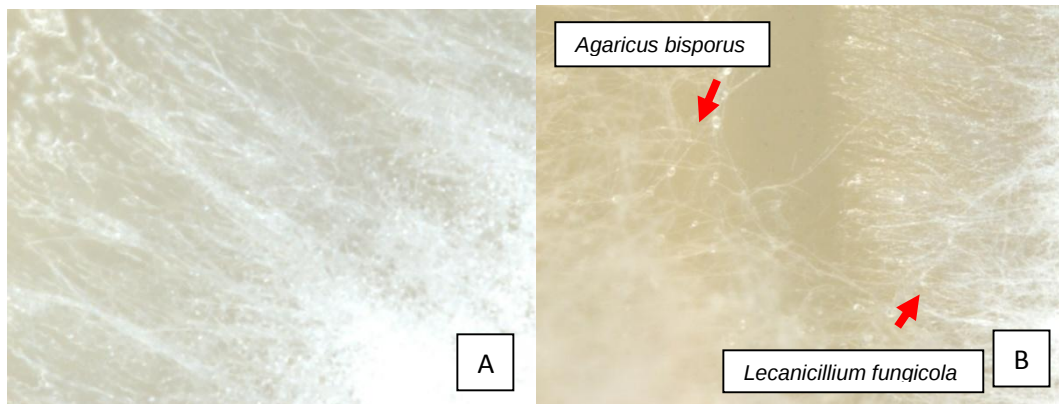


Figura 6: (a) Hifas verticiliadas do fungo *Lecanicillium fungicola* e (b) encontro com as hifas do fungo *Agaricus bisporus* em meio de cultura BDA.

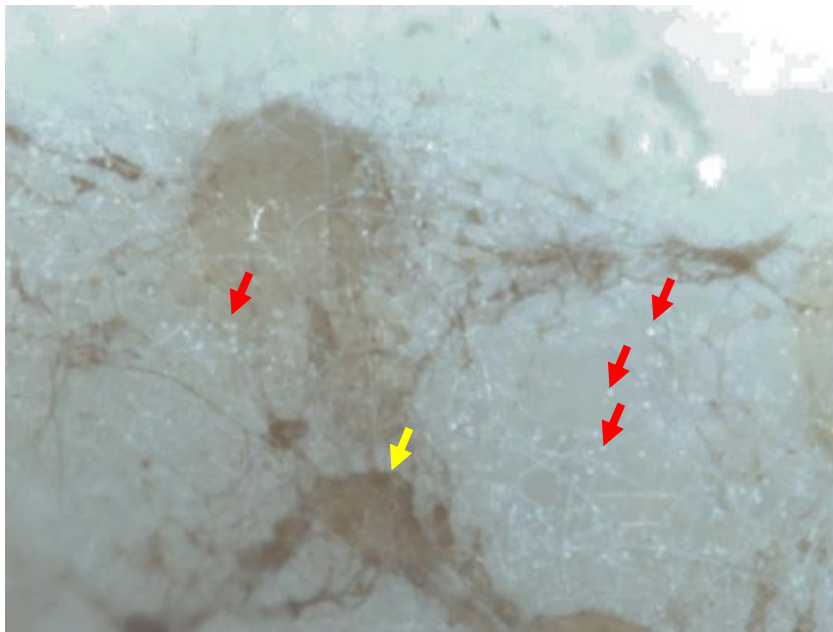


Figura 7: (Setas vermelhas) Hifas e estruturas reprodutivas do fungo *Lecanicillium fungicola* e (seta amarela) e hifas de *Agaricus bisporus* com coloração mais escura em meio de cultura BDA.

3.2. Caracterização da infecção patógeno hospedeiro *in vivo*

A taxa de crescimento dos cogumelos apresentou valores entre 10,47% e 18,36% a cada 12 horas (Tabela 1). Tais valores foram obtidos somente até 48h após

o início das medições pois com crescimento maior o cogumelo não era visualizado por inteiro pela lente do estereomicroscópio, impossibilitando prosseguir as medições. Neste sentido, a taxa de crescimento de 18,36% entre as 12 horas e 24 horas após a inoculação dos conídios, indica uma provável maior atividade metabólica, quando comparado com os valores dos demais períodos em que a medição ocorreu, que pode ter sido resultado da elevada demanda energética necessária para o cogumelo atingir o estágio fenológico 1, seguindo a classificação de Hammond e Nichols (1976).

Os sintomas de manchas no píleo dos cogumelos começaram a se manifestar com 36 horas após a inoculação dos conídios, quando se iniciou as medições do tamanho das manchas e, conseqüentemente a evolução da mancha, indicando que evoluíram com taxas de 8,03% e 11,44% do início do aparecimento até as 72 horas, após esse período a taxa de evolução do sintoma reduziu a quase nula, 0,029%. Os esporos foram visualizados após 60h da inoculação dos conídios acima das manchas escuras indicando os sinais da doença, e apresentaram tamanho de 2,71 a 3,53 μ m (Tabela 1), valores mais baixos que o relatado por Zare e Gams (2008) de 4,9 μ m.

Tabela 1: Taxa de crescimento dos cogumelos (%), tamanho da mancha (μm), evolução do sintoma (μm) e tamanho dos esporos (μm) de *Lecanicillium fungicola* inoculado em *Agaricus bisporus* coloração creme linhagem PB 19/01 a cada 12 horas.

Horas após a inoculação	Taxa de crescimento do cogumelo (%)	Tamanho da mancha (medida 1)* (μm)	Tamanho da mancha (medida 2)* (μm)	Evolução do nível do sintoma (%)	Tamanho dos conídios (μm)
0h	-	-	-	-	-
12h	10,69	-	-	-	-
24h	18,36	-	-	-	-
36h	17,08	1788,87	846,87	-	-
48h	10,47	1713,72	1741,54	-	-
60h	-	1863,37	1770,53	8,03	2,71
72h	-	2104,11	2114,23	11,44	3,18
90h	-	2104,72	2168,40	0,029	3,53

*Medidas retiradas de maneira horizontalmente e verticalmente das manchas.

Os esporos de *L. fungicola* foram visualizados acima das manchas no píleo dos cogumelos juntamente com as hifas do patógeno, na porção mais escura da mancha, conforme indica a Figura 8, com uma seta vermelha. Estas informações são importantes para o fungicultor pois indica que aproximadamente após dois dias a infecção dos cogumelos, os sintomas de manchas aparecem. Considerando que o desenvolvimento do cogumelo ocorre em praticamente 5 dias (desde a formação de primórdio ao ponto ideal de colheita) (Hammond, 1977), os 3 primeiros dias são cruciais para evitar a entrada do patógeno no hospedeiro, assim medidas cautelosas devem ser tomadas em relação a irrigação da camada de cobertura que pode disseminar esporos, contato com as mãos e o cogumelo no momento da colheita, e baixa incidência de moscas são fundamentais para manter os cogumelos sadios.



Figura 8: Mancha ocasionada pelo patógeno *Lecanicillium fungicola* (a) e hifas, esporangióforo e esporos do fungo (b).

Santos et al. (2017) reportaram que após 19 horas da inoculação de *L. fungicola* em *A. bisporus*, os esporos já estavam completamente germinados, o que indicava a ocorrência da infecção. Os autores utilizaram a microscopia elétrica de varredura, o que possibilita a visualização interna do tecido, diferente do presente trabalho que foi utilizado um estereomicroscópio que possibilita a visão externa da mancha.

3.3. Avaliação do desenvolvimento morfológico dos cogumelos

Os dados de massa e diâmetro do píleo foram crescentes para as duas linhagens conforme o horário de avaliação. Sendo que a linhagem ABI 19/09 apresentou um aumento de massa de 125% em 30 horas e a linhagem PB 19/01 um aumento de 123%, no mesmo período (Tabela 2). Já em diâmetro de píleo o aumento foi de 31,27% e 30,6% para a linhagem ABI 19/01 e PB 19/01, respectivamente. Estes dados demonstram a maior produtividade da linhagem de cogumelos coloração branca em comparação a linhagem coloração creme. Os mesmos resultados também foram verificados no capítulo 3 desta dissertação.

Tabela 2: Massa (g), diâmetro do píleo (mm) e porcentagem de ocorrência do rompimento do véu nos cogumelos analisados das linhagens ABI 19/01 e PB 19/01 a cada seis horas.

Horas	Massa (g)		Diâmetro do píleo (mm)		Rompimento do véu (% de ocorrência)	
	ABI 19/01	PB 19/01	ABI 19/01	PB 19/01	ABI 19/01	PB 19/01
1h	15,66 ±	21,66 ±	40,52 ±	45,3 ±	-	-
	2,08	3,05	2,08	2,76		
6h	21,33 ±	25 ± 5	40,59 ±	46,02 ±	-	-
	0,57		0,88	1,59		
12h	30,66 ±	36 ±	50,66 ±	55,91 ±	-	66,6
	5,68	11,35	4,18	2,31		
18h	36,33 ±	36 ±	54,29 ±	62,56 ±	-	66,6
	7,50	13,11	2,21	7,92		
24h	28,33 ±	43,33 ±	58,96 ±	65,29 ±	100	33,3
	8,02	14,01	3,16	8,40		
30h	35,33 ±	48 ±	63,23 ±	77,44 ±	100	100
	5,03	14,52	1,87	0,71		

Com o crescimento dos cogumelos durante as horas, o véu que recobre a lamela tende a se romper, o que foi visualizado às 12 horas após o início das avaliações para a linhagem creme e às 24 horas para a linhagem branca, o que

demonstra que a linhagem branca pode ter um período de prateleira maior (pós-colheita).

Ao final das análises (30 horas), todos os cogumelos colhidos das duas linhagens apresentaram o rompimento o véu (Figura 9). Deve-se ressaltar que o ponto ideal para a colheita está relacionado com o mercado consumidor, sempre associando que quanto mais desenvolvido o cogumelo estiver, menor será o período de armazenamento, mesmo a frio. Segundo Valverde (2017), a deterioração do cogumelo ocorre pela perda de massa, textura, aroma e sabor. Aguirre et al. (2009) ressalta que isto ocorre devido uma serie de reações bioquímicas devido a ação de enzimas oxidativas polifenólicas (PPO), particularmente as catecol oxidase e as lacase difenol oxidase.



Figura 9: Cogumelos *Agaricus bisporus* linhagens ABI 19/01 (a) e PB 19/01 (b) no último horário de colheita (30 hs).

4. Conclusão

Não ocorreu a paralisação do crescimento micelial *in vitro* no momento em que o patógeno e o hospedeiro se encontram. Após 36 horas a inoculação do patógeno foi possível a visualização de manchas no píleo e após 60hs a visualização de hifas e esporos. A linhagem coloração creme apresentou maior massa e diâmetro do píleo e menor porcentagem de rompimento do véu em relação a linhagem branca.

5. Referências Bibliográficas

Aguirre L, Frias JM, Barry-Ryan C, Grogan H (2009). Modelling browning and brown spotting of mushrooms (*Agaricus bisporus*) stored in controlled environmental conditions using image analysis. **Journal of Food Engineering**, 91:280-286.

Gea Alegría FJ, Tello JC, Honrubia M (1996) *In vitro* a sensibilidade de *Verticillium fungicola* aos fungicidas selecionados. **Mycopathologia** 136:133-137.

Gea FJ., Navarro, MJ (2017) Mushrooms diseases and control. In Zied. DC, Pardo-Gimenez A (Eds) **Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications**. West Sussex: John Wiley & Sons Wiley Blackwell, p. 239 – 259.

Hammond JBW, Nichols R (1976) Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing.: changes in soluble carbohydrates during growth of mycelium and sporophore. **Journal General Microbiology** 93:309-320.
<https://doi.org/10.1099/00221287-93-2-309>

Hammond JBW (1997) Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus*: oxidative pathways in mycelium and sporophore. **Microbiology** 102:245-248.

Umar HM, Van Griensven, Leo JLD (1998) The role of morphogenetic cell death in the histogenesis of the mycelial cord of *Agaricus bisporus* and in the development of macrofungi. **Mycological Research**, 102:719-735.

Santos TLD, Belan LL, Zied DC, Dias ES, Alves E (2017). Essential oils in the control of dry bubble disease in white button mushroom. **Ciência Rural**, 47:1-7.

Valverde Juan. Harvesting and Processing of Mushrooms (2017). In Zied. DC, Pardo-Gimenez A (Eds) **Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications**. West Sussex: John Wiley & Sons Wiley Blackwell, p. 239 – 259.

Zare R, Gams W (2008). A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. **Mycological Research** 112:811-824.

CAPÍTULO 3 – Tolerância De Linhagens de *Agaricus bisporus* Coloração Branca e Creme a Isolados de *Lecanicillium fungicola*

RESUMO – O objetivo do trabalho foi avaliar a produtividade de linhagens de *Agaricus bisporus* e verificar a tolerância das mesmas a diferentes isolados do patógeno *Lecanicillium fungicola* e a agressividade desses isolados em uma mesma linhagem. Além da elaboração de uma escala diagramática de cogumelos com sintomas de manchas. O experimento contou com duas linhagens de *A. bisporus* coloração branca e creme (ABI 19/01 e PB 19/01, respectivamente) e quatro isolados de *L. fungicola* (LF 19/01, FL 19/02, LF 19/03 e LF 19/04) contando com cinco repetições por tratamento que foram mantidas em câmara de cultivo climatizada. A linhagem de *A. bisporus* de coloração branca (ABI 19/01), atingiu produtividade de cogumelos saudáveis mais elevada em relação a linhagem de coloração creme (PB 19/01), obtendo os valores de 23,8% e 14,1% respectivamente. O patógeno LF 19/03 se mostrou mais agressivo, reduzindo a produtividade de cogumelos saudáveis em até 64,04% para a linhagem PB 19/01, e 49,6% para a linhagem ABI 19/01. Além disso, o mesmo isolado afeta maior área dos cogumelos já no segundo fluxo. A linhagem de *A. bisporus* de coloração branca proporcionou maior produtividade do que a linhagem de coloração creme. A linhagem de *A. bisporus* coloração branca é mais resistente aos isolados de *L. fungicola*. O isolado LF 19/03 apresentou maior agressividade nas linhagens de *A. bisporus*. Os diversos sintomas encontrados no decorrer da pesquisa possibilitaram a construção de uma escala diagramática para auxiliar o produtor na comercialização dos cogumelos doentes.

Palavras-chave: champignon, bolha seca, agressividade, fungos, cogumelos

CAPÍTULO 3 – Tolerance of Strains of *Agaricus bisporus* White and Cream to Isolates of *Lecanicillium fungicola*

ABSTRACT – The objective of this work was to evaluate the use of *Agaricus bisporus* strains and to verify the tolerance of different isolates of *Lecanicillium fungicola* and the aggressiveness of these isolates in the same strain. And the elaboration of a diagrammatic scale of mushrooms with symptoms of spots. The experiment reported with two *A. bisporus* strains, cream and white (ABI 19/01 and PB 19/01, respectively) and four isolates of *L. fungicola* (LF 19/01, LF 19/02, LF 19/03 and LF 19/04) with five treatment repetitions that were kept in the climatized chamber. A white *A. bisporus* strain achieved higher healthy mushrooms compared to the cream coloring strain (PB 19/01), obtaining values of 23.8% and 14.1% respectively. The pathogen LF 19/03 was more aggressive, recording healthy mushrooms up to 64.04% for strain PB 19/01 and 49.6% for strain ABI 19/01. In addition, the same isolate affects most mushrooms already in the second flush. A white *A. bisporus* strain provided higher performance to the cream strain. White *A. bisporus* strain is more resistant to *L. fungicola*. Isolate LF 19/03 presented higher aggressiveness in *A. bisporus* strains. The various symptoms found during the research made it possible to construct a diagrammatic scale for assist producer mushroom in marketing of sick mushrooms.

Keywords: Champignon, dry bubble, aggressiveness, fungus, mushrooms

1. Introdução

O *Agaricus bisporus* é um fungo basidiomiceto, lignolítico e saprófita, comumente cultivado em compostos formulados pasteurizados (Bonnen et al. 1994). Mais conhecido como champignon, o *A. bisporus* foi, segundo registros bibliográficos, descoberto na Europa e introduzido no Brasil em 1953, caracterizando-o como um cultivo recente.

Para a produção deste cogumelo é necessário um recobrimento do composto, etapa esta denominada de adição da camada de cobertura, que consiste, geralmente, em uma camada de turfa de musgo com a finalidade de dar suporte físico aos futuros cogumelos, além de manter a umidade do composto e fornecer água aos basidiomas, facilitando o transporte de nutrientes (Pardo-Gimenez et al. 2017). Apesar de todos os benefícios, a camada de cobertura pode ser associada a contaminação por *Lecanicillium fungicola*, causador da doença bolha seca (Stanojević et al. 2019).

O patógeno *L. fungicola* é uma dificuldade persistente para os produtores de cogumelos em todos os países (Gea Alegría et al. 2014). Fletcher et al. (1986) expressavam perfeitamente, em um texto clássico, o que este patógeno pode representar nos cultivos “A bolha seca é a doença mais comum e grave dos cultivos de champignon. Se não controlada, pode destruir completamente uma produção em 2 ou 3 semanas”.

A sintomatologia dos cogumelos atacados varia de acordo com a etapa de cultivo em que ocorre o contato patógeno-hospedeiro (Figura 1). O mais comum ocorre nos basidiomas já desenvolvidos, em estágio de colheita, com o aparecimento de manchas de coloração canela e contorno irregular na superfície do píleo. Outro tipo de sintoma ocorre quando o patógeno invade os tecidos do estipe, deixando-o com aspecto quebradiço (fendilhamento e até rachaduras, denominada craqueamento). O último tipo de sintoma é indicativo de uma infecção mais severa e precoce na camada de cobertura, neste caso, os primórdios recém-formados são infectados prematuramente, adquirindo uma forma globosa, malformada e desuniforme (Largeteau e Savoie 2010).

O controle dessa doença está associado a práticas de manejo, envolvendo higiene e limpeza do local e dos arredores. A aplicação de fungicidas também pode ser uma ferramenta de controle, porém no Brasil, a utilização desses produtos em

produções de cogumelos não é autorizada, obrigando o produtor a utilizar práticas como a pasteurização do lote após o cultivo para evitar a permanência e a multiplicação desta doença em sua propriedade (Zied et al. 2015).

Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar produtividades de *A. bisporus* coloração branca e creme quando submetidas ou não à inoculação do patógeno, indicando tolerância da linhagem do cogumelo ao *L. fungicola*. Ainda, identificar isolados do patógeno mais agressivos a uma determinada linhagem. Finalmente, confeccionar uma escala diagramática com sintomas de manchas nos cogumelos atacados.

2. Material e Métodos

2.1. Isolados de *Lecanicillium fungicola*

Os isolados de *L. fungicola* foram obtidos nas regiões de Castro no Estado do Paraná (LF 19/01 e LF 19/03) e em Cabreúva (LF 19/02) e Pinhalzinho (LF 19/04), no Estado de São Paulo. A coleta para o isolamento aconteceu em produções com histórico da doença através de cogumelos que apresentaram sintomas de lesões necróticas marrons na superfície do píleo ou o craqueamento do estipe. Os cogumelos foram acondicionados em sacos de papel para transporte e, em laboratório, foram desinfestados superficialmente com álcool 70% e um pequeno tecido com sintoma foi transferido para placa de petri com meio BDA (batata, dextrose e ágar), a qual foi mantida em BOD a 25°C (Gea Alegria 1996). Posteriormente o patógeno foi identificado visualmente pela morfologia do crescimento da colônia em placa, apresentando-se com micélios brancos densos e alta concentração de esporos (Zare e Gams 2008).

2.2. Linhagens de *Agaricus bisporus*

As linhagens de *A. bisporus* utilizadas foram de coloração branca - ABI 19/01 (popularmente conhecida como champignon) e de coloração creme - PB 19/01 (popularmente conhecida como Porto Belo), as quais estão mantidas na micoteca do

Centro de Estudos em Cogumelos, o CECOG, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Câmpus de Dracena. A replicação foi feita em placa de petri com meio BDA seguindo as etapas de produção da matriz primaria, secundaria, terciaria e “Spawn” (Zied et al. 2010).

2.3. Produção do composto

O substrato utilizado foi concedido pela empresa comercial Compobras, localizada na Cidade de Castro (PR), o qual foi preparado com palha de trigo, esterco de galinha, gesso e calcário. A Fase I de compostagem durou 18 dias, de modo que durante 5 dias os materiais foram umedecidos, logo foram transferidos para o primeiro Bunker, onde permaneceram por 5 dias, depois para um segundo Bunker (por 5 dias) e finalmente para um terceiro Bunker (3 dias). A Fase II de compostagem durou 18 horas, sendo realizado uma pasteurização a $59 \pm 1^\circ\text{C}$ e um condicionamento de 5 dias a $47 \pm 2^\circ\text{C}$. Após a pasteurização o composto apresentou a relação C/N de 19/1, teor de N de 2,3%, pH de 7,6 e umidade de 68%, atendendo os parâmetros de qualidade propostos por Zied et al. (2011).

2.4. Cultivo

A inoculação do composto foi feita em caixas plásticas medindo 30x40cm na proporção de 1% de inóculo em relação ao peso úmido do composto (Figura 1). Após 20 dias de corrida de micélio, a camada de cobertura a base de turfa foi adicionada. A suspensão de esporos de *L. fungicola* foi preparada com água deionizada autoclavada a partir de um esfregaço na placa de petri e posterior filtragem (Figura 2a e b). Uma câmara de Neubauer auxiliou na contagem de esporos da solução e as diluições foram feitas para obter a concentração de 10^5 conídios por m^2 (Gea Alegría, 1995; Gea Alegría et al., 2003) dos 4 isolados do patógeno coletados. A aplicação da suspensão de esporos na camada de cobertura foi feita com um aerógrafo Sagyma Pro® SW800 em movimentos de zigzag nas caixas posicionadas sobre uma bancada (Figura 2c), após 3 dias da adição da cobertura sobre o composto. A corrida de micélio nesse momento ocorreu em câmara de cultivo, mantida a 25°C e umidade relativa acima de 80%.



Figura 1: Inoculação do fungo *Agaricus bisporus* no composto (a), composto colonizado (b) e adição da camada de cobertura de turfa acima do composto colonizado (c).

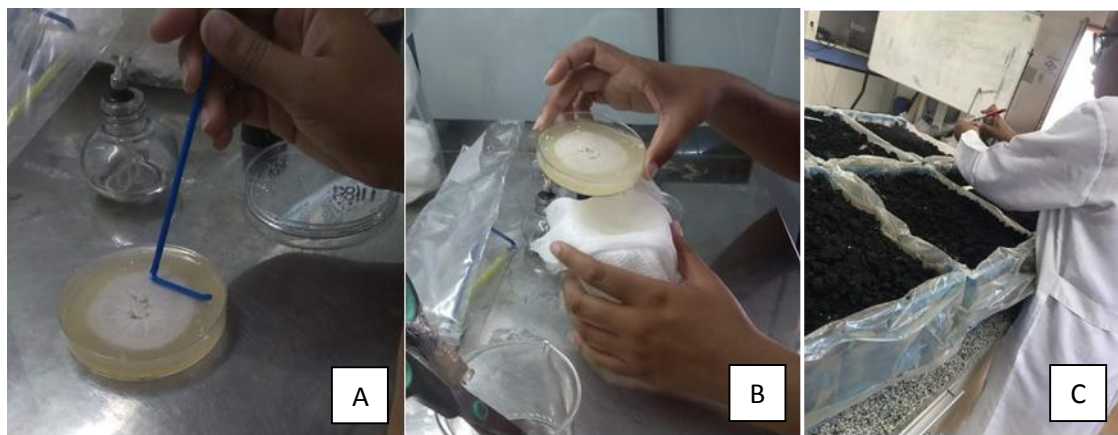


Figura 2: Remoção dos conídios de *Lecanicillium fungicola* da do meio de cultura BDA (a), filtragem da solução obtida em gaze esterilizada (b) e aplicação da suspensão de conídios na camada de cobertura (c).

No momento em que o micélio do cogumelo atingiu a superfície da camada de cobertura, foi realizado a indução de primórdios, reduzindo a temperatura 2°C ao dia até que atingisse 19°C, onde permaneceu para a realização da colheita.

Deve-se ressaltar que parte das caixas não receberam a suspensão de esporos (tratamento controle), as quais foram mantidas em outra câmara de cultivo separadas das que foram contaminadas propositalmente com o patógeno.

A colheita iniciou com 15 dias após a adição da camada de cobertura, se estendendo por 22 dias, totalizando 37 dias de cultivo. Os cogumelos doentes foram colhidos e separados de acordo com os sintomas, com ponto de colheita antes do rompimento do véu que recobre a lamela.

2.5. Variáveis analisadas

Com os cogumelos coletados e identificados foram avaliados a produtividade, a massa média de cogumelos, o número de cogumelos, a precocidade e o dia do início da colheita para cada tratamento. Ademais destes parâmetros agronômicos também se caracterizou a ecologia da doença através da sintomatologia. As fórmulas para obter valores de tais parâmetros são apresentadas a seguir.

Produtividade (P)

$$P = \frac{MFC}{MFS}$$

Onde:

P = Produtividade (%)

MFC = massa fresca dos cogumelos

MFS = massa fresca do substrato de cultivo

Massa média dos cogumelos

$$MM = \frac{MFC}{NC}$$

Onde:

MM = Massa média dos cogumelos colhidos

MFC = Massa fresca dos cogumelos

NC = Número de cogumelos colhidos

Precocidade

$$PC = \frac{T1}{Tt} \times 100$$

Onde:

PC = Precocidade (%)

T1 = Número de dias da primeira metade do período de colheita

Tt = Número de dias totais de colheita

Além disso, o incremento ou diminuição da produtividade, massa e número de cogumelos saudáveis quando a linhagem foi inoculada com o patógeno na camada de cobertura, foi calculada em relação ao tratamento controle, conforme a fórmula a seguir.

Variação percentual da produtividade

$$VP = \frac{P_{controle} - P_{tratamento}}{P_{controle}} \times 100$$

Onde:

VP = Variação percentual da produtividade (%)

Pcontrole = Produtividade do controle

Ptratamento = Produtividade do tratamento com o isolado do patógeno

A variação da massa média e número de cogumelos foram calculadas da mesma maneira utilizando os seus respectivos valores.

Os cogumelos da linhagem ABI 19/01 com sintomas de manchas foram separados em função dos isolados e fotografados com o píleo voltado para cima, em fundo preto. As imagens foram tratadas no software Quant v 1.0.2 com redução de

cores a 100 para destacar as áreas afetadas e saudáveis, logo foi confeccionada uma escala diagramática de acordo com a área afetada pelo patógeno.

2.6. Análises estatísticas

O experimento foi realizado em esquema DIC (delineamento inteiramente casualizado) fatorial duplo sendo 2 linhagens de *A. bisporus* vs 4 isolados de *L. fungicola* + 2 (controle) totalizando 10 tratamentos. Cada tratamento possuía cinco repetições referente a uma caixa contendo 3,5 kg de composto, o que resultou em 50 unidades experimentais. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (Anova) e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade pelo programa estatístico Sisvar 5.

3. Resultados e Discussão

No primeiro fluxo os isolados de *L. fungicola* não diferiram estatisticamente a produtividade das linhagens de *A. bisporus* em relação ao seu próprio controle (Tabela 1). Porém, os isolados 19/01, LF 19/03 e LF 19/04 afetaram a produtividade quando as linhagens são comparadas entre si, mostrando a linhagem PB 19/01 mais suscetível ao patógeno já no primeiro fluxo. No segundo fluxo o isolado de *L. fungicola* LF 19/03 foi mais agressivo, reduzindo a produtividade para 2,2% e 0,3%, respectivamente para as linhagens ABI 19/01 e PPB 19/01. Finalmente, no último fluxo ficou claro a ação do patógeno sob as linhagens de *A. bisporus*, sendo que praticamente já não houve mais colheita de cogumelos saudáveis nos tratamentos onde o patógeno foi inoculado.

Com relação a produtividade total de cogumelos saudáveis de *A. bisporus* sem a presença do patógeno, verificou-se que a linhagem branca é superior (23,8%) a creme (14,1%). Os valores de produtividade total também deixam evidente a redução significativa dos rendimentos na linhagem branca para todos os isolados estudados (32,6 a 49,7%), diferentemente do verificado para a linhagem creme, que sofreu redução significativa apenas da produtividade total sob a presença do patógeno LF 19/03 (64,04%) (Tabela 1).

Tabela 1: Produtividade (%) de cogumelos *Agaricus bisporus* ABI 19/01 e PB 19/01 saudáveis ideais para comercialização no primeiro, segundo e terceiro fluxo de cultivo submetidos aos isolados de *Lecanicillium fungicola*.

Linhagens	1° Fluxo, %		2° fluxo, %		3° fluxo, %		Produtividade total, %		Variação percentual*	
	ABI 19/01	PB 19/01	ABI 19/01	PB 19/01	ABI 19/01	PB 19/01	ABI 19/01	PB19/01	ABI 19/01	PB 19/01
Controle	10,2	6,7	11,2 A a	5,1 AB b	2,3 A	2,2 A	23,8 A a	14,1 A b	-	-
LF 19/01	11,8 a	7,4 b	3,7 BC	1,7 B	0,0 B	0,1 B	15,5 B a	9,4 AB b	-34,5	-33,04
LF 19/02	9,3	5,2	2,4 C	3,3 AB	0,2 B	0,3 B	11,9 B	9,0 AB	-49,7	-36,09
LF 19/03	9,5 a	4,7 b	2,2 C	0,3 B	0,0 B	0,0 B	11,7 B a	5,0 B b	-49,6	-64,04
LF 19/04	7,5 a	3,5 b	8,4 AB	8,4 A	0,0 B b	1,4 Aba	16,0 B	13,4 A	-32,6	-4,68

Ausência de não diferem estatisticamente. Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na coluna diferem estatisticamente segundo o teste Tukey a 5% de probabilidade. * Redução ou aumento percentual da produtividade total de cogumelos saudáveis quando submetidos a doença em relação ao tratamento controle.

É possível observar uma especificidade de cada isolado causar redução na produtividade nas linhagens cultivadas, ou seja, numa mesma cidade (Castro/PR), é possível observar uma redução de 34,5% com o patógeno LF 19/01 e de 49,6% com o patógeno LF 19/03, nos cogumelos coloração branca. Isto provavelmente se deve ao manejo adotado pelo produtor, como por exemplo, a aplicação de produtos químicos na camada de cobertura como formol e alguns fungicidas que, por não haver um uso correto recomendado, gera aplicações erradas e contínua do mesmo princípio ativo, o que pode proporcionar uma certa pressão de seleção proporcionando resistência ao patógeno. Ainda neste sentido o isolado LF 19/04, coletado em Pinhalzinho/SP se mostrou menos agressivo, o que pode ser um indicador de que os produtores desta cidade adotam boas práticas de cultivos, principalmente no que se refere a utilização de produtos químicos, tanto na camada de cobertura, como na limpeza das câmaras de produção. Foulongne-Oriol et al. (2011) ressaltaram que entre os métodos de controle de *L. fungicola*, um dos mais indicados é o físico, em especial a utilização de vapor d'água, na forma de pasteurização, tanto para a desinfestação do ambiente, como da camada de cobertura.

A massa dos cogumelos na presença do patógeno não foi afetada estatisticamente na linhagem branca, oposto da linhagem creme, onde o isolado LF 19/03 proporcionou um aumento de massa em aproximadamente duas vezes porém o número de cogumelos nesse tratamento foi o menor observado (Tabela 2). De certo modo observou-se que os tratamentos de *A. bisporus*, cor branca, ao serem inoculados com o patógeno apresentam um ganho de massa, na ordem de 1,8% a 74,5%. Deve-se destacar que todos esses cogumelos que foram avaliados estavam saudáveis e próprios para a comercialização.

Os cogumelos brancos se mostraram mais numerosos, obtendo maiores valores com o isolado LF19/04 (87 u), o tratamento controle (76 u) e o isolado LF 19/01 (46 u). Os cogumelos da linhagem creme não sofreram a influência do patógeno no que se refere ao número unitário de cogumelos colhidos durante o cultivo. De certo modo os tratamentos de *A. bisporus* que receberam os isolados do patógeno reduziram o número de cogumelos colhidos durante o cultivo, apesar dos valores não serem significativos, chegaram ao extremo de -71,1% (LF 19/01) para a coloração branca e -80,4% (LF 19/03) para a coloração creme.

Tabela 2: Massa média (g) e número de cogumelos (u) saudáveis de *Agaricus bisporus* colhidos submetidos ou não ao patógeno *Lecanicillium fungicola*.

Linhagens	Massa média, g		Variação percentual*		Número, u		Variação percentual*	
	ABI 19/01	PB 19/01	ABI 19/01	PB 19/01	ABI 19/01	PB 19/01	ABI 19/01	PB 19/01
Controle	11,0	15,3 B	-	-	76 AB	41	-	-
LF 19/01	12,6	13,3 B	+14,5	-13,1	46 ABC	27	-39,4	-39,4
LF 19/02	19,2	16,4 AB	+74,5	+7,2	22 C	19	-71,1	-53,6
LF 19/03	16,5 b	26,3 A a	+50,1	+71,8	33 BC	8	-56,5	-80,4
LF 19/04	10,8	12,6 B	+1,8	-17,6	87 A a	39 b	+14,4	-4,8

Ausência de não diferem estatisticamente. Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na coluna diferem estatisticamente segundo o teste Tukey a 5% de probabilidade. * Redução ou aumento percentual da produtividade total de cogumelos saudáveis quando submetidos a doença em relação ao tratamento controle.

Outra informação importante refere-se à precocidade, o que a linhagem branca se mostrou superior a creme, nos tratamentos sem a presença do patógeno. Os isolados do patógeno apenas influenciaram os valores de precocidade para os cogumelos de coloração creme, sendo o LF 19/01 e LF 19/03 agressivos, reduzindo expressivamente a produtividade do segundo e terceiro fluxo, o que de maneira inversa favorece o aumento da precocidade.

No que se refere ao dia para início da colheita, não se observou a influência deste parâmetro nas linhagens de *A. bisporus*, nem nos isolados de *L. fungicola*, exceto o LF 19/01. Associando esses valores com a pouca influência do patógeno no primeiro fluxo é possível concluir que o impacto do patógeno no cultivo, realmente ocorre da metade do período de cultivo ao final.

Tabela 3. Precocidade (%) e dias para o início da colheita de cogumelos saudáveis das linhagens de *Agaricus bisporus* submetidas ou não ao patógeno *Lecanicillium fungicola*.

Linhagens	Precocidade, %		Início da colheita, dias	
	ABI 19/01	PB 19/01	ABI 19/01	PB 19/01
Controle	84,1 a	68,6 B b	17,6	17,0
LF 19/01	93,3	98,0 A	17,6 a	16,0 b
LF 19/02	97,2	88,7 AB	17,2	16,6
LF 19/03	99,6	97,1 A	16,2	16,8
LF 19/04	96,4	85,9 AB	17,8	16,8

Ausência de letras minúsculas iguais na mesma linha e maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente segundo o teste Tukey a 5% de probabilidade.

Neste sentido a figura 3 apresenta detalhadamente a produtividade de *A. bisporus* (coloração branca), com os cogumelos colhidos com os sintomas do patógeno (manchado, craqueado e deformado), impróprios para a comercialização. É notável que no segundo fluxo o predomínio é de cogumelos manchados, sendo verificado uma perda de produtividade acima de 9% para os isolados LF 19/01 e LF 19/02. No terceiro fluxo observou-se um aumento do sintoma de cogumelos craqueados.

Para os cogumelos de coloração creme, os isolados do patógeno que causaram maior perda de produtividade (acima de 4%) no segundo fluxo, devido os sintomas de mancha no píleo dos cogumelos foram o LF 19/01 e LF 19/02. No terceiro fluxo, também se observou-se um aumento do sintoma de cogumelos craqueados na linhagem creme (Figura 4).

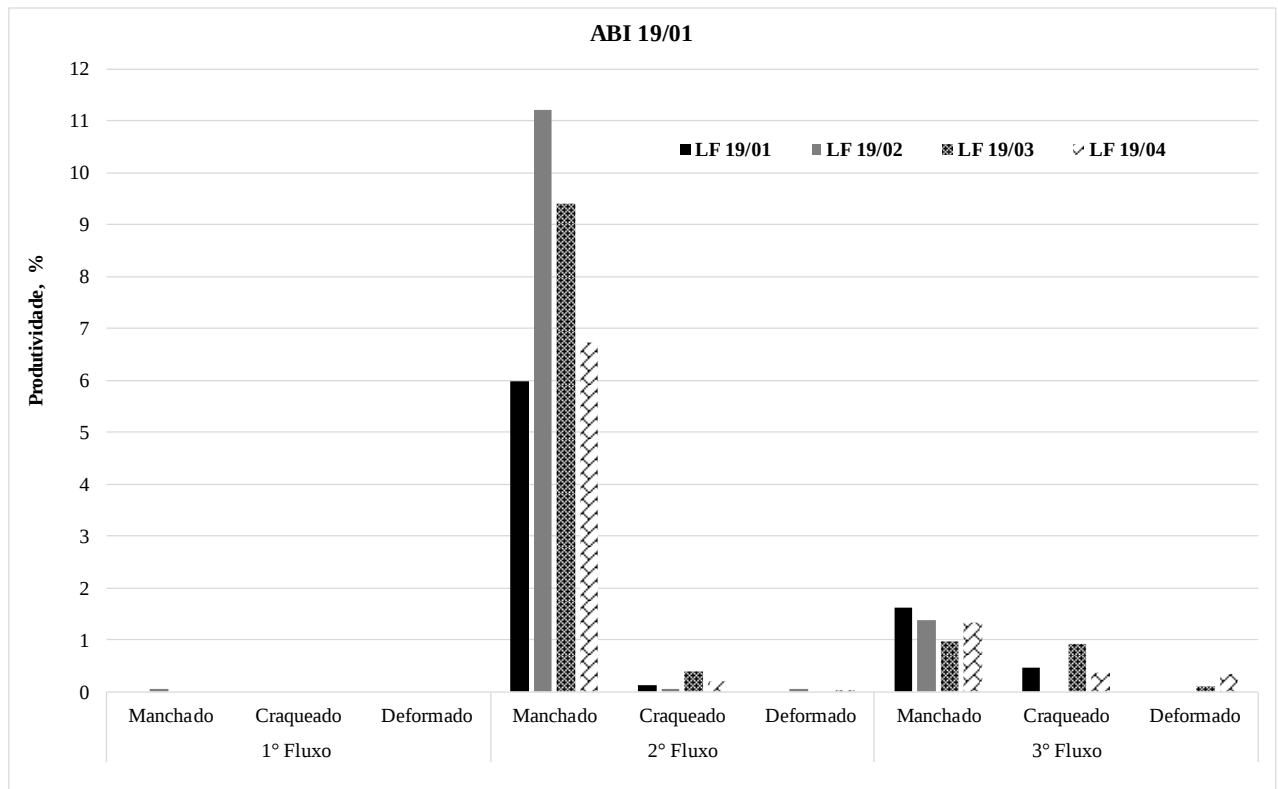


Figura 3: Produtividade (%) de cogumelos *Agaricus bisporus* linhagens ABI 19/01 branco com sintomas de manchas, craqueamento e deformação em cada fluxo de colheita.

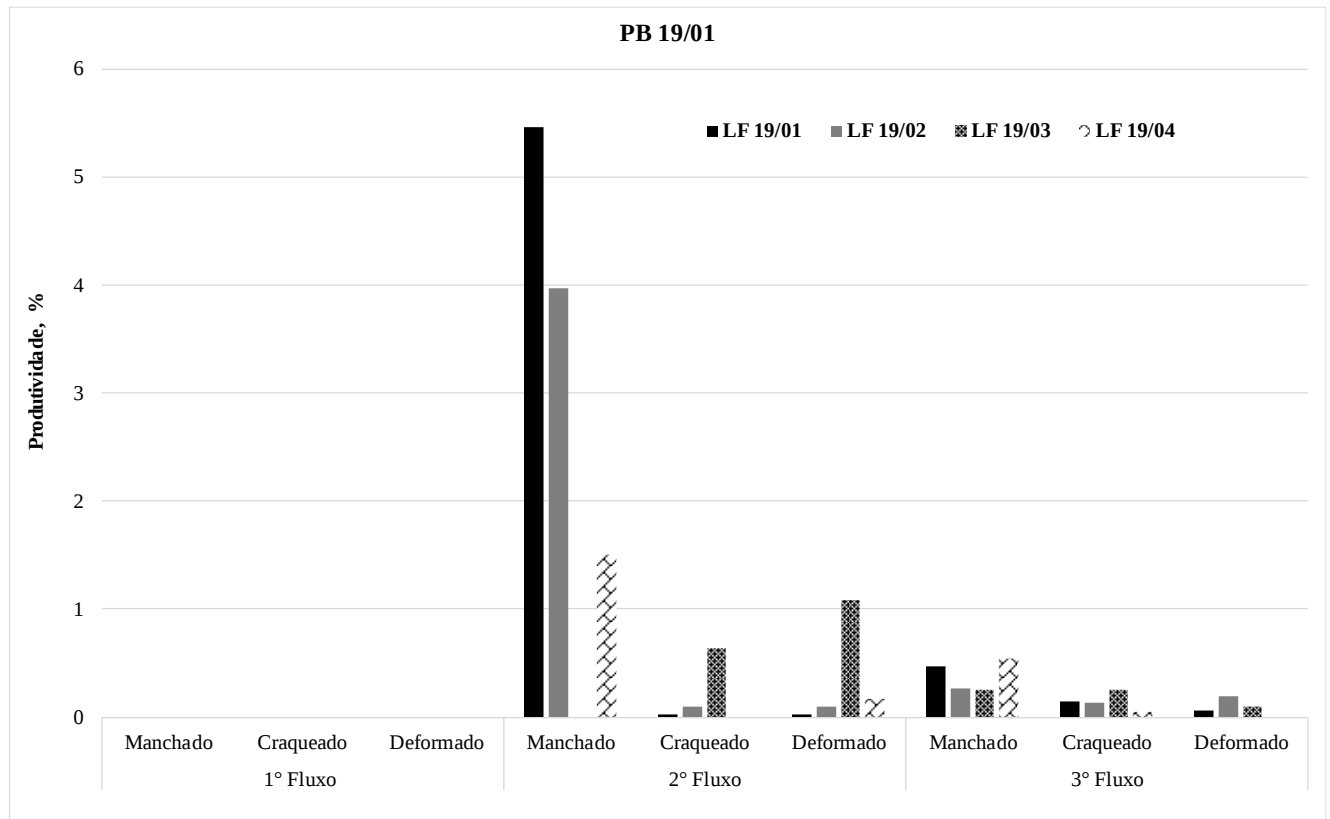


Figura 4: Produtividade (%) de cogumelos *Agaricus bisporus* PB 19/01 creme com sintomas de manchas, craqueamento e deformação em cada fluxo de colheita.



Figura 5: Sintomas causados pelo patógeno *Lecanicillium fungicola*: manchas (a), sintoma de craqueamento (b) e sintoma de deformação (c).

Com o intuito de caracterizar a dimensão das manchas causadas pelos isolados do patógeno, os cogumelos de coloração branca foram separados no segundo e terceiro fluxo e classificados segundo a área do píleo do cogumelo

danificada. Os isolados LF 19/01, LF 19/02 e LF 19/04 apresentaram menor área do píleo afetada pela doença no segundo fluxo, por outro lado, o isolado LF 19/03 se mostrou extremamente agressivo, proporcionando manchas no píleo com dimensões acima de 30% já no segundo e também no terceiro fluxo (Figura 3).

Finalmente a figura 4 apresenta de maneira sintética uma escala diagramática com 6 níveis de dano causados pelo patógeno, a qual pode ser utilizada como parâmetro para a verificação da área do píleo afetada, conforme descrito na figura 6. Assim os cogumelos com menor área afetada possuem manchas que ocupam a dimensão de apenas 1,5% do píleo, podendo estas chegarem a 48% do total do píleo.

Os resultados obtidos foram fundamentais para entender a ecologia do patógeno, de modo a se recomendar um cultivo curto, com apenas 2 fluxos de colheita. Na presente pesquisa, avaliando um tempo de cultivo de 37 dias, com 3 fluxos de produção, verificou-se um montante geral de cogumelos colhidos com 9,6% com sintomas de mancha no píleo, 0,6% com o estipe craqueado e 0,2% com deformação total do cogumelo, isso para o cogumelo de coloração branca. Para o cogumelo de coloração creme, se verificou 2,8% dos cogumelos com sintomas de manchas, 0,3% com sintomas de craqueamento e 0,4% com sintomas de deformação. Deste modo é possível constatar que os cogumelos de coloração creme foram mais resistentes ao ataque do patógeno do que os cogumelos de coloração branca.

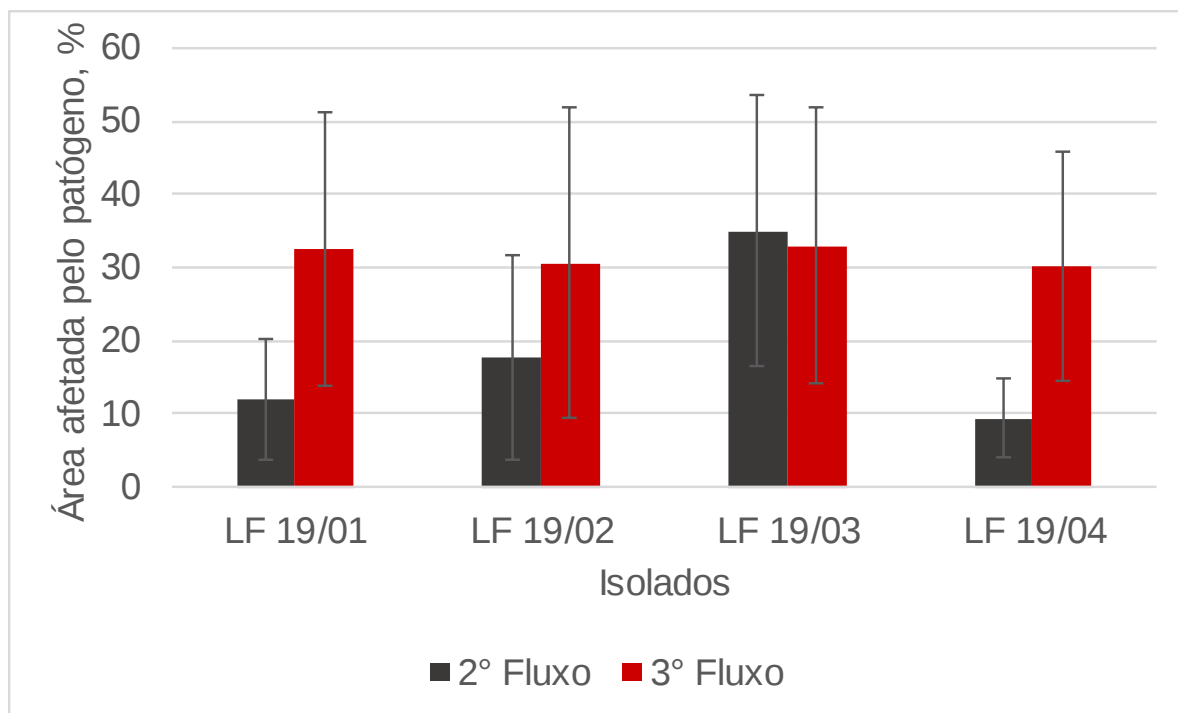


Figura 6: Evolução da área afetada pelo patógeno no cultivo de *A. bisporus* no 2º e 3º fluxo, com os diferentes isolados utilizados.

O fato das lesões causadas por *L. fungicola* (manchas marrons no píleo, craqueamento do estipe e massa indefinida) acontecerem em sequência entre o decorrer dos fluxos também foi observado por Stanojević et al. (2019). Os autores constataram o aparecimento de manchas em primeiro momento aos 21 e 26 dias de cultivo, e com o progresso do experimento as lesões evoluíram para os outros dois sintomas. Tal evolução dos sintomas é explicada por North e West (1993) pelo momento de infecção do patógeno, as machas são resultado da infecção tardia dos basidiomicetos saudáveis, já os demais sintomas são ocasionados por infecções anteriores a esta etapa, o seja, o entrelaçamento do micélio do cogumelo com o micélio do patógeno.

As figuras 6 e 7 demonstram a caracterização das manchas nos cogumelos coloração branca, pois são mais nítidos e permitem que o programa (Quant v 1.0.2) detecte tal área necrosada, o que não foi possível com os cogumelos coloração creme. Ainda neste sentido ressalta-se a agressividade do isolado LF 19/03, que já no segundo fluxo causou grandes lesões na superfície do píleo, na ordem de 34% da área total.

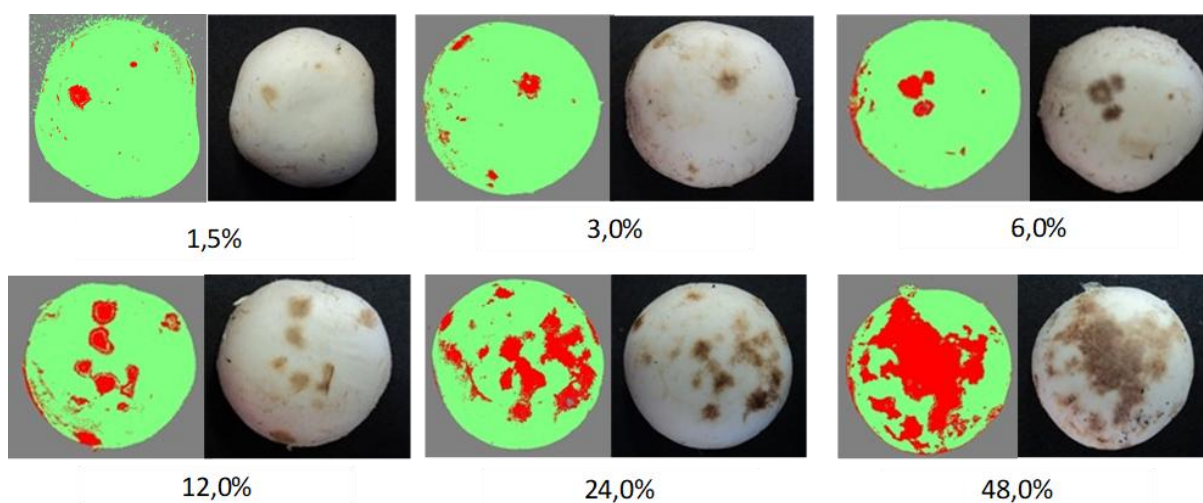


Figura 7: Escala diagramática de *L. fungicola* em *A. bisporus*. A esquerda imagem gerada pelo software Quant, que ilustra a porcentagem de doença e a direita, fotografia dos cogumelos com o sintoma da doença, utilizado para a geração da imagem.

A escala diagramática poderá ser utilizada para orientar maneiras alternativas da designação comercial dos cogumelos colhidos com os sintomas de mancha no píleo (Figura 4). Neste sentido sugere-se, de acordo com a aceitação do consumidor, que os cogumelos com sintomas de mancha ocupando a área de 1,5% possam ser comercializados inteiros, na forma “in natura” ou cozidos (em conserva), já os cogumelos com sintomas ocupando a área de 3 a 6%, sejam comercializados fatiados, na forma “in natura” ou cozidos (em conserva). Finalmente os cogumelos com sintomas acima de 12% não devem ser comercializados.

4. Conclusão

A linhagem de *A. bisporus* de coloração branca obteve maior produtividade do que a linhagem de coloração creme. O isolado LF 19/03 apresentou maior agressividade em ambas as linhagens de *A. bisporus*. Os diversos sintomas encontrados no decorrer da pesquisa possibilitaram a confecção de uma escala diagramática para auxiliar o produtor na comercialização dos cogumelos doentes.

5. Referências bibliográficas

Bonnen AM, Anton LH, Orth AB (1994) Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. **Applied Environmental Microbiology** 60:960-965.

Fletcher JT, White PF, Gaze RH (1986) Mushrooms: Pets and disease control. **Intercept**. Newcastle upon Tyne, 1986.

Foulongne-Oriol M, Rodier A, Rousseau T, Largeteau M, Savoie, J. M. (2011). Quantitative genetics to dissect the fungal–fungal interaction between *Lecanicillium verticillium* and the white button mushroom *Agaricus bisporus*. **Fungal biology** 115:421-431.

Gea Alegría FJ (1995) **Micosis del cultivo del Champiñón (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach) en Castilla-La Mancha. Estudio de la verticiliosis (agente causal *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk)**. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.

Gea Alegría FJ, Tello JC, Honrubia M (1996) *In vitro* a sensibilidad de *Verticillium fungicola* aos fungicidas seleccionados. **Mycopathologia** 136:133-137.

Gea Alegría FJ, Tello JC, Navarro MJ (2003) Occurrence of *Verticillium fungicola* var. *Fungicola* on *Agaricus bitorquis* Mushroom Crops in Spain. **Jounal Phytopathology** 151:98-100.

Gea FJ, Carrasco J, Diáñez F, Santos M, Navarro MJ (2014) Control of dry bubble disease (*Lecanicillium fungicola*) in button mushroom (*Agaricus bisporus*) by spent mushroom substrate tea. *European Journal of plant pathology* 138:711-720.

Largeteau ML, Savoie JM (2010) Microbial-induced diseases of *Agaricus bisporus*: biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production (mini-review). **Applied Microbiology and Biotechnology** 86:63-73.

North LH, Wuest PJ (2019) The infection process and symptom expression of *Verticillium* disease of *Agaricus bisporus*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 15:74-80.

Pardo-Giménez A., González JEP, Zied DC (2017) Casing materials and techniques in *Agaricus bisporus* cultivation. In Zied DC and Pardo-Gimézes (ed) **Edible and medicinal mushrooms: Technology and applications**, 1 ed. Wiley, UK, pp 149-163.

Sanchez JE, Zied DC, Albertó E (2018) Edible mushroom production in the Americas. In: 9th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. **Anais...** International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products 9:2-11.

Stanojević O, Berić T, Potočnik I, Rekanović E, Stanković S, Milijašević-Marčić S (2019) Biological control of green mould and dry bubble diseases of cultivated mushroom (*Agaricus bisporus* L.) by *Bacillus* spp. **Crop Protection** 126:104944.

Zare R, Gams W (2008). A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. **Mycology Research** 112:811-824.

Zied DC, Minhoni MTA, Kopytowski-Filho J, Andrade MCN (2010). Production of *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) on different casing layers and environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 26:1857-1863.

Zied DC, Pardo-González JE, Minhoni, MTA, Pardo-Giménez A (2011). A reliable quality index for mushroom cultivation. **Journal of Agricultural Science** 3:50.

Zied DC, Nunes JS, Nicolini VF, Gimenez AP, Rinker DL, Dias ES (2015). Tolerance to *Lecanicillium fungicola* and yield of *Agaricus bisporus* strains used in Brazil. **Scientia Horticulturae** 190:117-122.