

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

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DIFERENTES
CONDIÇÕES DE CULTIVO EM *Agaricus subrufescens***

Wagner Gonçalves Vieira Junior

Engenheiro Agrônomo

2020

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

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DIFERENTES
CONDIÇÕES DE CULTIVO EM *Agaricus subrufescens***

Discente: Wagner Gonçalves Vieira Junior

Orientador: Prof. 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

V658c	Vieira Junior, Wagner Gonçalves Caracterização genética e diferentes condições de cultivo em <i>Agaricus subrufescens</i> / Wagner Gonçalves Vieira Junior. -- Jaboticabal, 2021 82 p. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Diego Cunha Zied 1. Cogumelos cultivo. 2. Fungos morfologia. 3. Micologia. 4. Microbiologia agrícola. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO
EM *Agaricus subrufescens*

AUTOR: WAGNER GONÇALVES VIEIRA JUNIOR

ORIENTADOR: DIEGO CUNHA ZIED

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

Prof. Dr. DIEGO CUNHA ZIED (Participação Virtual)
FCAT-UNESP / Dracena/SP

Prof. Dr. EUSTÁQUIO SOUZA DIAS (Participação Virtual)
Biologia / Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. RAMIRO GONZALES-MATUTE (Participação Virtual)
Universidad Nacional del Sur / Bahía Blanca/AR

Jaboticabal, 18 de fevereiro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Wagner Gonçalves Vieira Junior – Nascido em 21 de dezembro de 1995, na cidade de Goianésia, Goiás, filho de Wagner Gonçalves Vieira e Durcilene Bernardo de Oliveira Vieira. No ano de 2014 ingressou na graduação em Agronomia na Faculdade Evangélica de Goianésia, e em 2018 recebeu o título de bacharel em Agronomia. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica desenvolvendo pesquisas na área da microbiologia do solo, sob orientação do Prof. Dr. Jadson Belém de Moura. Em 2019, ingressou no mestrado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP/FCAV Câmpus de Jaboticabal, no programa de Microbiologia Agropecuária como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob orientação do Prof. Dr. Diego Cunha Zied.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que por sua Divina Providência, me deu inspiração e sabedoria em todos os momentos da minha vida acadêmica.

Agradeço a minha mãe, Durcilene Bernardo de Oliveira e meu padrasto Nelcívado Anastácio das Neves, que, embora distantes fisicamente, sempre apoiaram e confiaram em mim.

Agradeço ao meu pai, Wagner Gonçalves Vieira, por todo apoio, consolo e orações durante a realização desse trabalho.

Agradeço ao meu irmão, Tiago Gonçalves Vieira e meu primo Samuel Moraes Vieira por serem meus principais estimuladores e companheiros durante essa importante fase na minha vida acadêmica.

Agradeço a meus avós paternos, Onilson Vieira da Mota e Orides Gonçalves Pereira Mota, e também aos meus avós maternos, João Noel de Oliveira e Gasparina Pereira de Oliveira, por todo apoio, ânimo e orações que foram direcionados a mim, sem eles nada disso seria possível.

Agradeço ao meu tio, Odair José de Oliveira, que sempre esteve ao meu lado me apoiando ao longo de toda trajetória.

Agradeço, de modo geral, a toda minha família pelo apoio durante todo o processo.

Agradeço a Jenifer Bianca Ferreira dos Santos, por ter sido a minha principal conselheira e minha constante companheira, nos momentos mais felizes e também nos momentos mais difíceis.

Agradeço meu orientador, Prof. Dr. Diego Cunha Zied, pelos ensinamentos, apoio e confiança para realização desse projeto.

Agradeço ao Centro de Estudo em Cogumelos (CECOG) pelo auxílio na instalação e manutenção dos experimentos, em especial ao Matheus Rodrigo Iossi, Ma. Cinthia Elen Cardoso Caitano, Isabela de Arruda Palú e Lucas da Silva Alves.

Estendo os agradecimentos a Faculdade de Ciência Agrárias e Tecnológicas – FCAT (Unesp, câmpus Dracena) pelas estruturas e equipamentos disponibilizados, além de todo apoio técnico e administrativo.

Agradeço o programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias pela formação intelectual e apoio na realização desse trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani e ao Dr. Douglas Moraes Mendel Soares pelo auxílio para a caracterização genética das linhagens.

Agradeço ao Prof. Dr. Ronaldo Cintra pelo auxílio na obtenção dos dados meteorológicos.

Agradeço a FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/00419-8) pelo apoio financeiro na concessão de bolsa de Mestrado, que foi essencial para realização dessa pesquisa.

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

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	2
2.1. Macrofungos	2
2.2. <i>Agaricus subrufescens</i>	3
2.2.1. Variabilidade genética	4
2.2.2. Variabilidade Morfológicas	4
2.3. Cultivo de <i>A. subrufescens</i>	5
2.3.1. Ambiente de Cultivo	6
2.3.1.1. Cultivo a campo	6
2.3.1.2. Cultivo protegido	7
2.3.2. Linhagens	8
3. Referências bibliográficas	9
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA DE LINHAGENS DE <i>Agaricus subrufescens</i>	16
1. Introdução	18
2. Material e Métodos	19
2.1. Caracterização genética	19
2.2. Caracterização morfológica	23
3. Resultados e discussão	24
4. Conclusões	31
5. Referências Bibliográficas	32
CAPÍTULO 3 – COMPORTAMENTO AGRONÔMICO DE LINHAGENS DE <i>Agaricus subrufescens</i> CULTIVADAS A CÉU ABERTO	36
1. Introdução	38
2. Material e métodos	39
2.1. Inóculo	40
2.2. Composto	41
2.3. Inoculação	42
2.4. Colheita	42

2.5. Variáveis Analisadas	43
2.5.1. Características agronômicas	43
2.5.2. Dados climáticos	43
3. Resultados e discussão	44
4. Conclusão	51
5. Referências bibliográficas	52
CAPÍTULO 4 – RENDIMENTO DE DIFERENTES LINHAGENS DE <i>Agaricus</i> <i>subrufescens</i> CULTIVADAS EM AMBIENTE CONTROLADO	55
1. Introdução	57
2. Material e Métodos.....	58
2.1. Inóculo	58
2.2. Composto.....	59
2.3. Camada de cobertura.....	60
2.4. Indução de primórdios e colheita.....	61
2.5. Parâmetros de avaliação.....	61
2.6. Análise de dados.....	61
3. Resultados e discussão	62
4. Conclusão	67
5. Referências bibliográficas	68

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO EM

Agaricus subrufescens

RESUMO – A espécie *Agaricus subrufescens*, popularmente conhecido como cogumelo do sol, é cultivado em vários locais do mundo, porém ainda em pequena escala, comparando com a produção de outros cogumelos. A espécie é originária do Brasil e, até os tempos atuais, é produzida por intermédio de adaptações de tecnologias provindas do cultivo de outras espécies, conseqüentemente a espécie possui em sua maioria um baixo rendimento e longo período de cultivo. Assim, este trabalho aborda quais são os principais processos que influenciam o comportamento agrônômico (produtividade, número e massa de cogumelos, tempo para o primeiro fluxo e precocidade) do produto final. Para isso, avaliou-se a influência de distintas linhagens, partindo de um cultivo à campo (baixo nível tecnológico) até um cultivo em câmara climática, específica para a produção de cogumelos (alto nível tecnológico), a qual em ambas as situações o produto avaliado foi o cogumelo. Foi realizado também a caracterização genética das linhagens, através da taxa de polimorfismo da região ITS. Neste trabalho foi encontradas linhagens de ITS tipo A (ABL 03/44 e ABL 16/01) e tipo A/B (ABL 04/49, ABL 98/11, ABL 18/01, ABL 19/01 e ABL CS7), que é uma característica de linhagens encontradas nas Américas e Europa. A maioria das linhagens não apresentaram taxa de polimorfismos. A linhagem ABL CS7 quando cultivada a campo apresentou produtividade (20,95%) próxima a encontrada em câmara climática, porém dos sete meses estudados apenas dois foram considerados eficientes (maio e junho). Os principais limitantes são as condições ambientais desfavoráveis. O cultivo em câmara climática apresentou maiores rendimentos, sendo a linhagem ABL 19/01 a mais produtiva com 21,69%. O cultivo em câmaras climáticas pode possibilitar a condução de até 4 ciclos durante o ano, por conta de todas condições serem controladas. Em ambos os cultivos, a escolha da linhagem é fundamental para altos rendimentos.

Palavras-Chave: Cogumelos cultivo, Fungos morfologia, Micologia, Microbiologia agrícola

DIFFERENT CULTIVATION CONDITIONS AND GENETIC CHARACTERIZATION OF *Agaricus subrufescens*

ABSTRACT - The species *Agaricus subrufescens*, popularly known as the sun mushroom, is cultivated in several places around the world, but still on a small scale, compared to the production of other mushrooms. The species is originally from Brazil and, up to the present time, it is produced through adaptations of technologies from the cultivation of other species, consequently the species has mostly a low yield and a long period of cultivation. Thus, this work addresses which are the main processes that influence the agronomic behavior (productivity, number and mass of mushrooms, time for the first flow and precocity) of the final product. For this, the influence of different strains was evaluated, starting from a field cultivation (low technological level) to a climatic chamber cultivation, specific for the production of mushrooms (high technological level), which in both situations the product evaluated was the mushroom. The genetic characterization of the strains was also carried out through the polymorphism rate of the ITS region. In this work, ITS strains type A (ABL 03/44 and ABL 16/01) and type A / B (ABL 04/49, ABL 98/11, ABL 18/01, ABL 19/01 and ABL CS7) were found, which is a characteristic of strains found in the Americas and Europe. Most strains did not show a polymorphism rate. The strain ABL CS7 when cultivated in the field showed productivity (20.95%) close to that found in the climatic chamber, however, of the seven months studied, only two were considered efficient (May and June). The main limitations are unfavorable environmental conditions. The cultivation in climatic chamber showed higher yields, with the ABL 19/01 strain being the most productive with 21.69%. Cultivation in climatic chambers can allow up to 4 cycles to be conducted during the year, due to all conditions being controlled. In both crops, the choice of lineage is essential for high yields.

Keywords: Cultivation mushrooms, Fungi morphology, Mycology

CAPITULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Além de uma fonte de renda alternativa, os cogumelos se destacam por possuírem elevada atividade metabólica e bioconversão, o que permite o cultivo em diversos resíduos agroindustriais, em pequenos espaços físicos, num curto período de tempo, durante praticamente o ano todo. Isso proporciona um produto final de elevada qualidade nutricional, superior aos obtidos por produtos de origem animal e vegetal (Wang et al., 2014), destacando-se ainda mais por não emitirem gases de efeito estufa, como por exemplo o metano.

Diante do exposto, os cogumelos representam um produto valioso no mercado exterior, possuindo alto valor comercial, apresentando características organolépticas diferenciadas, tais como textura, sabor e odor (Guillamón et al., 2010). No entanto, esse mercado é restrito e pouco estudado no Brasil, principalmente no que se refere a espécies de origem nativa.

O *Agaricus subrufescens*, sinônimo de *Agaricus blazei* e *Agaricus brasiliensis*, é conhecido popularmente como Cogumelo do Sol® ou cogumelo medicinal, sendo de origem natural brasileira, o que facilita o cultivo em condições de clima tropical, podendo ser uma excelente alternativa de renda ao pequeno produtor (Firenzuoli et al., 2008). Contudo nos dias de hoje esta espécie é pouco produzida pelo mundo.

A produção de *A. subrufescens* enfrentou diversos problemas até então, dentre eles os baixos rendimentos em comparação a outros *Agaricus* (Largeteau et al., 2011). Com o passar dos anos, através de pesquisas, essa questão tem sido solucionada. Anos atrás, Minhoni et al. (2005) relataram rendimentos de 6,5% a 9,5% e Braga et al. (2006) em torno de 6,27% a 15,29%. Posteriormente, Zied et al. (2010) relataram produtividades entre 12,4 e 16,1% e, mais recentemente, Zied et al. (2018) encontraram produtividades de até 28,16% para a linhagem ABL 16/01, em substrato suplementado com resíduos da polpa de acerola.

Esses incrementos de produtividade foram possíveis através de estudos com foco nas tecnologias de produção, dentre elas: a formulação do composto, diferentes camadas de cobertura, diferentes ambientes de cultivo e seleção de linhagens com potencial comercial (Pardo-Giménez et al., 2020; Zied et al., 2014; Zied et al., 2018). Contudo, o cultivo de *A. subrufescens* ainda é muito longo (aproximadamente 120 dias) e muitas das linhagens que estão disponíveis no mercado possuem um baixo rendimento, expondo a necessidade de estudos focados na redução do tempo de cultivo e também na seleção de linhagens eficazes.

Com isso o objetivo deste trabalho foi; i) realizar a caracterização genética de sete linhagens comerciais de *A. subrufescens*; ii) verificar as diferenças morfológicas de diferentes linhagens e como o ambiente de cultivo pode afetá-las e iii) caracterizar a interação entre linhagens e o ambiente de cultivo; iv) determinar como as condições de cultivo podem interferir nos parâmetros agronômicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MACROFUNGOS

Os macrofungos são fungos conhecidos por possuírem estruturas reprodutivas visíveis a olho nu (Arnolds, 1992; Kirk et al., 2001) e pertencem aos filos Ascomycota e Basidiomycota (Kirk et al., 2001; Wijayawardene et al., 2017). O filo Basidiomycota é um dos mais abundantes em espécies, abaixo apenas do filo Ascomycota (Wijayawardene et al., 2018, 2017) com um total de 1.589 gêneros e mais de 30.000 espécies já classificadas (Dai et al., 2015; Kirk et al., 2008), onde são encontrados os cogumelos comestíveis e medicinais, utilizados há milhares de anos pela civilização (Horm and Ohga, 2008; Power et al., 2015; Reginald Buller, 1914; Wasson and Wasson, 1957).

Os cogumelos são fonte de compostos polifenólicos, aminoácidos, polissacarídeos, terpenóides, e esteróis e também é um alimento de baixa taxa

calórica e ricos em minerais e fibras (Firenzuoli et al., 2008), e com uma ampla gama de vitaminas (Vitamina B1 e C, riboflavina, biotina e niacina). Este também é associado a ações antioxidantes, anticancerígenas, atividades antimicrobianas, atividades antidiabéticas, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras, antialérgicas e antivirais (Kalač, 2016; Kalaras et al., 2017; Merdivan and Lindequist, 2017; Roncero-Ramos and Delgado-Andrade, 2017; Soccol et al., 2017; Ramos et al., 2019). Além disso, desempenham importante papel no ambiente em que está inserido, sendo os principais decompositores de material orgânico, além daqueles que também atuam como simbioses, favorecendo o crescimento vegetal (Mattila et al., 2000).

2.2. *Agaricus subrufescens*

O *A. subrufescens* (Kerrigan, 2005), também classificado como *Agaricus blazei* Murril e *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al., 2002), pertence à família Agaricaceae e ordem Agaricales (Firenzuoli et al., 2008). Este foi descoberto a princípio na América do Norte e depois na América do Sul (Arrillaga and Parra, 2006; Kerrigan, 2005; Dai et al., 2015).

A espécie tem sido amplamente estudada por conta de compostos bioativos isolados tanto do corpo de frutificação quanto do micélio (Ferrari et al., 2021; Firenzuoli et al., 2008; Rahmani-Nezhad et al., 2019). Segundo Takaku et al. (2001), a ingestão deste cogumelo pode prevenir doenças como câncer, diabetes, hiperlipidemia, arteriosclerose e hepatite crônica, além de ser conhecido por estimular o sistema imunológico.

Dentre os cogumelos medicinais mais produzidos e estudados o *A. subrufescens* é o único que se utiliza de resíduos agrícolas, como bagaço de cana, palhas de gramíneas e dentre outros. Seu substrato é preparado pelo método de compostagem seguido da pasteurização, promovendo custos reduzidos ao ser comparado com outras espécies, como *Ganoderma lucidum* e *Flammulina velutipes* que são produzidos através de substratos a base de madeira (Atila, 2020; Rezaeian e

Pourianfar, 2017), e necessitam ser esterilizados, o que acarreta maior custo de investimento e produção.

2.2.1. VARIABILIDADE GENÉTICA

A. subrufescens é uma espécie distribuída em vários continentes, como as Américas, Ásia, Europa, Oceania e África (Kerrigan, 2005; Thongklang et al., 2016, 2014), e possui alta variabilidade morfológica e genética (Kerrigan, 2005). Segundo a literatura, o cogumelo cultivado no Brasil é nativo do Estado de São Paulo (Largeteau et al., 2011).

A variabilidade genética deste fungo foi estudada durante muitos anos utilizando como marcador molecular a região do espaçador transcrito interno (Internal Transcribed Spacer – ITS). Esta região é utilizada para o estudo da taxonomia e filogenia de várias espécies de fungos, devido à sua facilidade de amplificação pela técnica de PCR, e um alto grau de variação interespecífica, possibilitando a distinção da maioria das espécies (Chen et al., 2016; Schoch et al., 2012). O *A. subrufescens* demonstra alto nível de polimorfismo na região ITS do DNA ribossômico nuclear (rDNA) (Kerrigan, 2005). As regiões ITS encontradas nesta espécie são as do tipo A, B e A/B, que são comumente encontradas nas Américas e na Europa, e do tipo C comumente encontrada na Ásia e Oceania (Chen et al., 2016).

2.2.2. VARIABILIDADE MORFOLÓGICA

A variação morfológica apresentada por diferentes linhagens é de grande importância do ponto de vista comercial. O mercado é cada vez mais exigente quanto às características dos alimentos, da mesma forma a exigência por cogumelos que atendam condições específicas são de suma importância para o produtor. Os

cogumelos podem ser classificados como extra, A e B, sendo os extras com maior valor agregado e B como o menor valor. Os cogumelos extras possuem por volta de 80 mm de comprimento e largura da base do estipe em torno de 35 a 50 mm, além de possuir o píleo fechado (Zied et al., 2017a, 2017b). A cor também é uma característica muito importante na comercialização destes cogumelos, onde é exigido pelo mercado, píleos que apresentem coloração mais claras, porém ainda não há padrões específicos de coloração.

O *A. subrufescens* possui cogumelos que podem obter variações morfológicas de tamanho e cor conforme o ambiente onde são coletados ou cultivados. No geral, os basidiomas são robustos, com tamanho entre 60-150 mm, com coloração que varia entre marrom-acastanhado, marrom avermelhado ou marrom-ouro e com estipe cujo tamanho varia de curto e grosso a fino e longo (Firenzuoli et al., 2008; Wisitrassameewong et al., 2012b). Essas características morfológicas podem variar devido ao genótipo ou também conforme as condições climáticas da região (Kerrigan, 2005).

2.3. CULTIVO DE *A. subrufescens*

Sabe-se que o Brasil é o único produtor de *A. subrufescens* das Américas (Sanchez et al. 2018), onde durante muito tempo esta espécie é cultivada em pequena escala (Pardo-Guiménez et al. 2020). Na última safra (2020/2021) estima que apenas 10 produtores brasileiros realizaram o cultivo dessa espécie, sendo destes, 80% do estado de São Paulo, onde a produtividade varia de 8% a 16% conforme o nível de tecnificação do produtor. Llrena-Hernández et al. (2013) observaram que países como a China, Japão, Taiwan e Coreia são um dos únicos que cultivam a espécie a nível industrial. No Brasil o preço pago pelo produto desidratado varia conforme a qualidade dos cogumelos, partindo de R\$200,00/kg até R\$350,00/kg.

Quando comparado aos demais cogumelos cultivados em escala comercial, o *A. subrufecens* é referenciado como um grande desafio, pois as tecnologias utilizadas em seu cultivo são recentes, não estão consagradas, formadas de adaptações de

tecnologias utilizadas na produção de *Agaricus bisporus* (Arif Mahmud et al., 2007; Mantovani et al., 2007; Zied et al., 2010; Largeteau et al., 2011; Dias et al., 2013). Como consequência, o período de produção é longo e a produtividade baixa, mesmo com grandes melhorias durante décadas de pesquisa (Pardo-Giménez et al., 2014).

Para a produção de *A. subrufescens* são utilizadas diferentes formulações de substratos, sendo principalmente a base de: bagaço de cana de açúcar, palhas de gramíneas (aveia, massai, trigo, cevada, arroz), e entre outros. Também é realizada a suplementação com fontes de nitrogênio e fósforo (Mendonça et al., 2005; Minhoni, 2005; Zied and Minhoni, 2009; González Matute et al., 2010). Em seguida, o substrato é compostado de acordo com o método de “compostagem tradicional” para preparo de substrato para cogumelos e em seguida realizado a pasteurização (Eira, 2003; Zied et al., 2014).

2.3.1. AMBIENTE DE CULTIVO

A escolha do ambiente de cultivo pode interferir no rendimento e qualidade dos cogumelos, porém, vale ressaltar que, adotando técnicas de cultivos específicas, pode-se obter altos rendimentos mesmo em ambientes de cultivos mais rústicos.

2.3.1.1. CULTIVO A CAMPO

Trabalhos que abordam o cultivo a campo (céu aberto) de *A. subrufescens* são escassos na literatura. Sabe-se que o cultivo a campo consiste em adicionar um composto já colonizado pelo fungo em sulcos abertos no solo a céu aberto, onde, em seguida, o composto é coberto com o mesmo solo retirado no local e então acrescenta-se uma camada espessa de palha sobre os canteiros com o intuito de manter um microclima adequado para o desenvolvimento fúngico, além de impedir que a radiação solar atinja o solo diretamente. O terreno deve possuir uma leve

inclinação e, se possível, ser próximo a matas, perto de uma fonte abundante de água de qualidade (Eira, 2003).

As condições climáticas no Brasil favorecem a produção deste cogumelo em ambiente a céu aberto. Nos dias de hoje, em algumas regiões do país está prática ainda é adotada, isto se deve principalmente a gastos na implementação e condução do cultivo serem inferiores em comparação ao ambiente protegido (Cavalcante et al., 2008; Eira, 2003). Como ponto negativo, a campo o cultivo não é eficiente durante todas as estações, ademais, os cogumelos podem apresentar características morfológicas inferiores (tamanho, diâmetro de píleo e estipe, entre outras), os fluxos de produção não são controlados e em algumas situações, a colheita dos cogumelos pode ocorrer embaixo de chuva, o que proporciona ao produtor um desconforto muito grande.

2.3.1.2. CULTIVO PROTEGIDO

A produção em ambiente protegido (estufas e barracões de alvenaria) é mais utilizada, por permitir a realização de até 3 cultivos durante o ano, cada um com aproximadamente 110 dias de colheita (Zied et al., 2010). Porém, assim como o cultivo a céu aberto, o cultivo protegido que não possui controle das variáveis ambientais, é prejudicado por condições climáticas locais (Mendonça et al., 2005). A utilização do controle climático das câmaras pode proporcionar maior produtividade, além de permitir um controle padrão e constante dos fluxos. Para a obtenção dos fluxos de produção uma das opções é reduzir a temperatura de 28°C, para 20°C, obedecendo a escala 2°C por dia (Zied et al., 2017a). Com o mesmo composto é possível obter até 6 fluxos de produção. O ambiente protegido também proporciona um cultivo com uma menor incidência de pragas e doenças (Martos et al., 2017).

Diversas instalações são utilizadas, partindo de estruturas rústicas (como estufas de plástico, madeira, bambu e dentre outras) (Braga et al., 2006; Eira, 2003; Minhoni, 2005; Zied et al., 2014) até as mais tecnificadas (alvenaria e câmaras climáticas).

2.3.2. LINHAGENS

Atualmente, algumas linhagens de *A. subrufescens* são encontradas no mercado nacional e utilizadas com sucesso por produtores de diversas regiões do Estado de São Paulo e Minas Gerais. No Centro de Estudo de Cogumelos (CECOG), da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT/UNESP) existe uma micoteca, com diversas linhagens que já foram estudadas e caracterizadas em outras pesquisas (Zied et al., 2017a, Martos et al. 2017, Zied et al. 2018).

A qualidade do material genético a ser utilizado é fundamental para o sucesso do cultivo de *A. subrufescens*. Zied et al. (2014) apontaram esse quesito como a segunda fonte de variação na produtividade, dentre todas as etapas envolvidas na produção, ficando atrás apenas do ambiente de cultivo.

Linhagens coletadas em diferentes regiões geográficas podem apresentar taxa de polimorfismo, o que já foi constatado através de estudos genéticos anteriores (Neves et al., 2005; Tomizawa et al., 2007).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arif Mahmud MD, Kitaura H, Fukuda M, Yamada A (2007) AFLP analysis for examining genetic differences in cultivated strains and their single-spore isolates and for confirming successful crosses in *Agaricus blazei*. **Mycoscience** 48:297–304.

Atila F (2020) Comparative study on the mycelial growth and yield of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst. on different lignocellulosic wastes. **Acta Ecologica Sinica** 40:153-157.

Arnolds E (1992) The analysis and classification of fungal communities with special reference to macrofungi, in: Winterhoff W. (Ed.) **Fungi in Vegetation Science, Handbook of Vegetation Science**, p. 7–47.

Arrillaga P, Parra LA (2006) El género *Agaricus* L. en España. XI. *Agaricus subrufescens*, primera cita para España. **Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid** 30:201–207.

Braga GC, Montini RMC, Salibe AB (2006) Parâmetros da produção de *Agaricus blazei* sob diferentes condições ambientais de cultivo. **Scientia Agraria Paranaensis** 5:47–56.

Cavalcante JLR, Gomes VFF, Kopytowski Filho J, Minhoni MTA, Andrade MCN (2008) Cultivation of *Agaricus blazei* in the environmental protection area of the Baturité region under three types of casing soils. **Acta Scientiarum. Agronomy** 30:513–517.

Chen J, Moinard M, Xu J, Wang S, Foulongne-Oriol M, Zhao R, Hyde KD, Callac P (2016) Genetic Analyses of the Internal Transcribed Spacer Sequences Suggest Introgression and Duplication in the Medicinal Mushroom *Agaricus subrufescens*. **PLOS ONE** 11 e0156250.

Dai YC, Cui BK, Si J, He SH, Hyde KD, Yuan HS, Liu XY, Zhou LW (2015) Dynamics of the worldwide number of fungi with emphasis on fungal diversity in China. **Mycological Progress** 14:62.

Dias ES, Abe C, Schwan RF (2004) Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. **Scientia Agricola** 61:545–549.

Dias ES, Zied DC, Rinker DL (2013) Physiologic response of *Agaricus subrufescens* using different casing materials and practices applied in the cultivation of *Agaricus bisporus*. **Fungal Biology** 117:569–575.

Eira A (2003). Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murrill) SS Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.). Viçosa, Aprenda Fácil, 398p.

Ferrari SAB, Oliveira AG, Mannocho Russo H, Bertozo AL, Bolzani SV, Zied DC, ... & Zeraik ML (2021) *Pleurotus ostreatus* e *Agaricus subrufescens*: investigação da composição química e propriedades antioxidantes desses cogumelos cultivados com diferentes suplementos artesanais e comerciais. **International Journal of Food Science & Technology** 56:452-460.

Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G (2008) The medicinal mushroom *Agaricus blazei* murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 5:3–15.

González-Matute R, Figlas D, Curvetto N (2010) Sunflower seed hull based compost for *Agaricus blazei* Murrill cultivation. **International Biodeterioration & Biodegradation** 64:742–747.

Guillamón E, García-Lafuente A, Lozano M, D'Arrigo M, Rostagno MA, Villares A, Martínez JA (2010) Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. **Fitoterapia** 81:715–723.

Gyawali R, Ibrahim SA (2014) Natural products as antimicrobial agents. **Food Control** 46:412–429.

Györfi J, Geösel A, Vetter J (2010) Mineral composition of different strains of edible medicinal mushroom *Agaricus subrufescens* Peck. **Journal of medicinal food** 13:1510–1514.

Horm V, Ohga S (2008) Potential of compost with some added supplementary materials on the development of *Agaricus blazei* murrill. **Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University** 53:417–422.

Jin H, McCaffery JM, Grote E (2008) Ergosterol promotes pheromone signaling and plasma membrane fusion in mating yeast. **Journal of Cell Biology** 180:813–826.

Kalač P (2016) Chapter 4 - Health-stimulating compounds and effects. **Edible mushrooms chemical** 137–153.

Kalaras MD, Richie JP, Calcagnotto A, Beelman RB (2017) Mushrooms: A rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione. **Food Chemistry** 233:429–433.

Kerrigan RW (2005) *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia** 97:12–24.

Kirk P, Cannon P, Minter D, Stalpers J (2008) Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. Cabi.

Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA (2001) Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. CABI publishing 9:655 p.

Kohno K, Miyake M, Sano O, Tanaka-Kataoka M, Yamamoto S, Koya-Miyata S, Arai N, Fujii M, Watanabe H, Ushio S (2008) Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of 2-amino-3H-phenoxazin-3-one. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 31:1938–1945.

Largeteau ML, Llerena-Hernández RC, Regnault-Roger C, Savoie JM (2011) The medicinal *Agaricus* mushroom cultivated in Brazil: biology, cultivation and non-medicinal valorisation. **Applied Microbiology and Biotechnology** 92:897–907.

Levitz SM (2010) Innate Recognition of Fungal Cell Walls. **PLOS Pathogens** 6:e1000758.

Mantovani TRD, Linde GA, Colauto NB (2007) Effect of the addition of nitrogen sources to cassava fiber and carbon-to-nitrogen ratios on *Agaricus brasiliensis* growth. **Canadian Journal of Microbiology** 53:139–143.

Martos ET, Zied DC, Junqueira PPG, Rinker DL, Silva R, Toledo RCC, Dias ES (2017) Casing layer and effect of primordia induction in the production of *Agaricus subrufescens* mushroom. **Agriculture and Natural Resources** 51:231–234.

Mattila P, Suonpää K, Piironen V (2000) Functional properties of Edible mushrooms. **Nutrition** 16:694–696.

Mendonça M, Kasuya MC, Cadorin A, Vieira AJ (2005) *Agaricus blazei* cultivation for a living in Brazil. **Shiitake cultivation** 246–257.

Merdivan S, Lindequist U (2017) Ergosterol Peroxide: A Mushroom-Derived Compound with Promising Biological Activities - A Review. **International Journal of Medicinal Mushrooms** 19:93-105.

Minhoni MTA, Kopytowski Filho J, Andrade MCN (2005) Cultivo de *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann. Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais (FEPAF).

Neves MA, Kasuya MCM, Araujo EF, Leite CL, Camellini CM, Ribas LCC, Mendonça MM (2005) Physiological and Genetic Variability of Commercial Isolates of Culinary-Medicinal Mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (Agaricomycetideae) Cultivated in Brazil. **International Journal of Medicinal Mushrooms** 7:553-564.

Pardo-Giménez A, Pardo JE, Dias ES, Rinker DL, Caitano CEC, Zied DC (2020) Optimization of cultivation techniques improves the agronomic behavior of *Agaricus subrufescens*. **Scientific reports**, 10:1-9.

Pardo-Giménez A, Pardo González JE, Reis FV, Zied DC (2014) Adaptabilidad de cepas brasileñas de *Agaricus subrufescens* Peck a la fructificación sobre diferentes capas de cobertura en cultivo comercial. **Revista Iberoamericana de Micología** 31:125–130.

Power RC, Salazar-García DC, Straus LG, González Morales MR, Henry AG (2015) Microremains from El Mirón Cave human dental calculus suggest a mixed plant–animal subsistence economy during the Magdalenian in Northern Iberia. **Journal of Archaeological Science** 60:39–46.

Rahmani-Nezhad S, Dianat S, Mahdizadeh V, Fooladi Z, Hariri R, Najafi Z, ... & Ardekani MS (2019) Investigação de extratos de polissacarídeos de cepas iranianas e francesas de *Agaricus subrufescens* contra enzimas envolvidas na doença de Alzheimer. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 18:544-554.

Ramos M, Burgos N, Barnard A, Evans G, Preece J, Graz M, Ruthes AC, Jiménez-Quero A, Martínez-Abad A, Vilaplana F, Ngoc LP, Brouwer A, Van Der Burg B, Carmen Garrigós M, Jiménez A (2019) *Agaricus bisporus* and its by-products as a source of valuable extracts and bioactive compounds. **Food Chemistry** 292:176–187.

Reginald Buller AH (1914) The fungus lore of the Greeks and Romans. **Transactions of the British Mycological Society** 5:21–66.

Rezaeian S, Pourianfar HR (2017) A comparative study on bioconversion of different agro wastes by wild and cultivated strains of *Flammulina velutipes*. **Waste and Biomass Valorization** 8:2631-2642.

Roncero-Ramos I, Delgado-Andrade C (2017) The beneficial role of edible mushrooms in human health. **Current Opinion in Food Science** 14, 122–128.

Sánchez EJ, Zied DC, Alberto E (2018) Edible mushroom production in the Americas, in 9th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. WSM BMP, Shanghai, China, pp. 2–11.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Consortium FB (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **PNAS** 109:6241–6246.

Soccol CR, Vítola FMD, Rubel R, Falbo MK, Letti LAJ, Bellettini M, Soccol VT (2017) Cogumelos uma fonte promissora de compostos ativos para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e nutracêuticos, in: *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4*. Editora Blucher, pp. 315–360.

Thongklang N, Chen J, Bandara AR, Hyde KD, Raspé O, Parra LA, Callac P (2016) Studies on *Agaricus subtilipes*, a new cultivatable species from Thailand, incidentally reveal the presence of *Agaricus subrufescens* in Africa. **Mycoscience** 57:239–250.

Thongklang N, Hoang E, Rodriguez Estrada AE, Sysouphanthong P, Moinard M, Hyde KD, Kerrigan RW, Foulongne-Oriol M, Callac P (2014) Evidence for amphithallism and broad geographical hybridization potential among *Agaricus subrufescens* isolates from Brazil, France, and Thailand. **Fungal Biology** 118:1013–1023.

Tomizawa MM, Dias ES, Assis LJ, Gomide PHO, Santos JB (2007) Genetic variability of mushroom isolates *Agaricus blazei* using markers RAPD. **Ciência e Agrotecnologia** 31:1242-1249.

Villares A, Mateo-Vivaracho L, Guillamón E, (2012) Structural features and healthy properties of polysaccharides occurring in mushrooms. **Agriculture (Switzerland)** 2:452–471.

Wang XM, Zhang J, Wu LH, Zhao YL, Li T, Li JQ, Wang YZ, Liu HG (2014) A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. **Food Chemistry** 151:279–285.

Wasser SP, Didukh MY, Amazonas MALA, Nevo E, Stamets P, Eira AF (2002) Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun *Agaricus* (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms** 4:267–290.

Wasson VP, Wasson RG (1957) Mushrooms Russia and history IN: Pantheon Books, New York.

Wijayawardene NN, Hyde KD, Lumbsch HT, Liu JK, Maharachchikumbura SSN, Ekanayaka AH, Tian Q, Phookamsak R (2018) Outline of Ascomycota: 2017. **Fungal Diversity** 88:167–263.

Wijayawardene NN, Hyde KD, Tibpromma S, Wanasinghe DN, Thambugala KM, Tian Q, Wang Y, Fu L (2017) Towards incorporating asexual fungi in a natural classification: checklist and notes 2012–2016. **Mycosphere** 8:1457–1555.

Wisitrassameewong K, Karunarathna SC, Thongklang N, Zhao R, Callac P, Moukha S, Férandon C, Chukeatirote E, Hyde KD, (2012a). *Agaricus subrufescens*: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences** 19:131–146.

Wisitrassameewong K, Karunarathna SC, Thongklang N, Zhao RL, Callac P, Chukeatirote E, Bahkali AH, Hyde KD (2012b). *Agaricus subrufescens*: new to Thailand. **Chiang Mai Journal of Science** 39:281–291.

Zied DC, Caitano CE, Pardo-Gimenez A, Dias ES, Zeraik ML, Pardo JE (2018) Using of appropriated strains in the practice of compost supplementation for *Agaricus subrufescens* production. **Frontiers in Sustainable Food Systems** 2:26.

Zied DC, González JEP, Dias ES, Pardo-Giménez A (2017a) Characteristics, Production, and Marketing of the Sun Mushroom: The New Medicinal Cultivated Mushroom, IN: Edible and Medicinal Mushrooms. John Wiley & Sons p. 361–384.

Zied DC, Minhoni MA (2009) Influência do ambiente de cultivo na produção do cogumelo *Agaricus blazei* ss. Heinemann (A. brasiliensis). **Energia na Agricultura** 24:17–36.

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 Giménez A, Pardo González JE, Dias ES, Carvalho MA, Minhoni MTA (2014) Effect of Cultivation Practices on the β -Glucan Content of *Agaricus subrufescens* Basidiocarps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 62:41–49.

Zied DC, Pardo JE, Tomaz RS, Miasaki CT, Pardo-Giménez A (2017b). Mycochemical Characterization of *Agaricus subrufescens* considering Their Morphological and Physiological Stage of Maturity on the Traceability Process. **BioMed Research International** 2017:ID2713742.

CAPÍTULO 2 – Caracterização genética e morfológica de linhagens de *Agaricus subrufescens*

RESUMO – O cogumelo *Agaricus subrufescens* tem sido objeto de estudo durante as últimas décadas quanto a sua origem e distribuição. Sabe-se que as principais linhagens utilizadas em cultivos experimentais são do Brasil, França, Espanha, Estados Unidos, México, Taiwan, Bélgica e Itália. Com intuito de verificar as distinções entre linhagens comerciais de *A. subrufescens*, realizou-se a caracterização genética de 7 linhagens (ABL 03/44, ABL 04/49, ABL CS7, ABL 16/01, ABL 18/01 e ABL 19/01) através da amplificação, clonagem e sequenciamento de DNA da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) de DNA ribossomal nuclear (rDNA). Também foram avaliadas as características morfológicas das linhagens, onde 30 cogumelos foram analisados quanto a: comprimento total do cogumelo, do píleo e do estipe, largura do estipe, da base do estipe e do píleo e finalmente tamanho do véu. Todas as linhagens de *A. subrufescens* caracterizadas aqui, são filogeneticamente relacionadas aos espécimes das Américas / Europa, apresentando uma região ITS do tipo A (ABL 03/44 e ABL 16/01) ou ambos os tipos A e B (ABL 04/49, ABL 98/11, ABL 18/01, ABL 19/01 e ABL CS7). As análises morfológicas das linhagens apresentaram distinção em todas características avaliadas. Em câmara climática as linhagens ABL 04/49 e ABL CS7 foram as que apresentaram cogumelos maiores e a linhagem ABL 19/01 menores. No cultivo a campo, as linhagens ABL 19/01 e ABL 16/01 obtiveram cogumelos maiores. A linhagem ABL 98/11 obteve cogumelos mais claros que as demais, nas duas condições de cultivo. A coloração conforme o ambiente não seguiu um padrão.

Palavras-chave: Caracterização genética, Cogumelo-do-sol, Fungos, ITS

CHAPTER 2 - Genetic and morphological characterization of *Agaricus subrufescens* strains

ABSTRACT - The mushroom *Agaricus subrufescens* has been the object of study during the last decades regarding its origin and distribution. It is known that the main strains used in experimental crops are from Brazil, France, Spain, United States, Mexico, Taiwan, Belgium and Italy. In order to verify the distinctions between commercial lines of *A. subrufescens*, the genetic characterization of 7 lines (ABL 03/44, ABL 04/49, ABL CS7, ABL 16/01, ABL 18/01 and ABL 19 / 01) by amplifying, cloning and sequencing DNA from the ITS (Internal Transcribed Spacer) region of nuclear ribosomal DNA (rDNA). The morphological characteristics of the strains were also evaluated, where 30 mushrooms were analyzed for: total length of the mushroom, cap and stem, width of the cap, base of cap and cap and finally size of the veil. All *A. subrufescens* strains characterized here, are phylogenetically related to specimens from the Americas / Europe, presenting an ITS type A region (ABL 03/44 and ABL 16/01) or both types A and B (ABL 04/49 , GLA 98/11, GLA 18/01, GLA 19/01 and GLA CS7). The morphological analyzes of the strains showed distinction in all evaluated characteristics. In a climatic chamber, the strains ABL 04/49 and ABL CS7 were the ones that presented larger mushrooms and the strain ABL 19/01 smaller. In field cultivation, the ABL 19/01 and AB 16/01 strains obtained larger mushrooms. The ABL 98/11 strain obtained lighter mushrooms than the others, in both growing conditions. The coloring according to the environment did not follow a pattern.

Keywords: Genetic characterization, Sun mushroom, Fungi, ITS

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o cogumelo *Agaricus subrufescens* tem sido objeto de discussão quanto a sua origem, distribuição e nomenclatura (Kerrigan, 2007, 2005; Neves et al., 2005; Wasser et al., 2002). Sua história é dividida em 3 períodos. O primeiro foi, aproximadamente, entre 1894 a 1918, relatado por Kerrigan (2005), quando a espécie foi cultivada nos Estados Unidos (Falconer 1904; Anonymous 1984). A segunda ocorreu entre 1965 e 1997, relatada por Iwade e Ito (1982), Iwade e Mizuno (1997) e Mizuno (1997), que descreveram o cultivo no Brasil, Japão, China e Coréia e apresentaram avanços tecnológicos na área de melhoramento de cogumelos. Por fim, o último período teve início com o incremento da pesquisa sobre a espécie no Brasil (Colauto et al., 2002; Eira et al., 2005), o que permitiu a disseminação de pesquisas por vários países, tais como: Argentina, Canadá, França, Eslovênia, México, Taiwan, Noruega, etc. (Chu et al., 2012; Matute et al., 2010; Gregori et al., 2008; Lisiecka et al., 2013; Sousa et al., 2016; Stoknes et al., 2013).

As linhagens usadas em cultivos experimentais são providas principalmente de países como Brasil, França, Espanha, Estados Unidos, México, Taiwan, Bélgica e Itália (Hernandez et al., 2011). Nas últimas décadas, os estudos foram realizados com linhagens isoladas de cultivos comerciais (Brasil) ou coletadas na natureza (França, Espanha, Tailândia e outros). As dificuldades encontradas no cultivo deste cogumelo estavam relacionadas ao rendimento obtido, peso médio dos cogumelos e características morfológicas (cor e formato) do píleo e do estipe (Colauto et al., 2010; Llarena-Hernández et al., 2013). Neste sentido alguns híbridos foram desenvolvidos (Jatuwong et al., 2014; Zied et al., 2011), porém, não se sabe exatamente por que esses híbridos não são ainda usados comercialmente.

Estudando a variação genética de linhagens japonesas e brasileiras, Fukuda et al. (2003) relataram pouca diferença entre os isolados, sugerindo que as linhagens poderiam ter-se originado da mesma população. Por fim, os autores sugeriram o desenvolvimento de estudos de divergência genética entre linhagens integradas a diversos outros aspectos, tais como fisiologia e produtividade, a fim de se ter uma

análise precisa e consistente de linhagens e o desenvolvimento eficiente para o cultivo.

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização genética e morfológica de linhagens de *A. subrufescens* coletadas em diferentes locais no Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi dividido em 2 avaliações para melhor apresentação dos dados: a primeira referente à caracterização genética, e a segunda à caracterização morfológica do cogumelo. Foram utilizadas sete linhagens comerciais de *A. subrufescens*: ABL 03/44 (isolada de cultivo na região de Lençóis Paulistas, SP, BRA), ABL 04/49 (Isolada de cultivos da região de São José do Rio Preto, SP, BRA), ABL 98/11 (isolada de cultivos da região de Mogi das Cruzes, SP, BRA), ABL CS7 (adquirida da Universidade Federal de Lavras, MG, BRA), ABL 16/01 (Linhagem comercial isolada do laboratório comercial em Valinhos, SP, BRA), ABL 18/01 (isolada de produtor da região de São Paulo, SP, BRA) e ABL 19/01 (linhagem isolada da região de Dracena, SP, BRA). Não foi possível a obtenção de cogumelos da linhagem ABL 03/44, sendo assim, não estará presente no tópico de caracterização morfológica dos cogumelos.

2.1. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

A fim de fornecer uma caracterização genética das linhagens de *A. subrufescens* ABL 04/49, ABL 98/11, ABL CS7, ABL 16/01, ABL 18/01 e ABL 19/01, realizou-se à amplificação, clonagem e sequenciamento de DNA da região ITS (Internal Transcribed Spacer) de DNA ribossomal nuclear (rDNA), bastante utilizado na taxonomia de fungos (Schoch et al., 2012). Inicialmente, 100 mg de micélio de *A.*

subrufescens foram adicionados em tubos de lise innuSPEED de 2,0 mL contendo esferas de aço (5 x 4,7 mm) e 400 µL de tampão AP1 (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN) para ruptura da parede celular. As amostras foram homogeneizadas durante dois ciclos de 1 min cada, no equipamento SpeedMill PLUS (Analytik Jena). Em seguida, 4 µL de RNase foram adicionados em cada tubo, seguido de incubação a 65 °C por 10 minutos. Todas as etapas da extração de DNA genômico foram realizadas conforme recomendação do fabricante (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN).

Amostras de DNA genômico (gDNA) foram eluídas em água destilada autoclavada e quantificadas no equipamento NanoPhotometer® (IMPLEN). As reações PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL com a enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), utilizando 50 ng de gDNA. Já os primers foram conservados flanqueando uma região de rDNA contendo as sequências ITS: ITS5F (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG- 3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3') (White, 1990).

As reações foram incubadas no termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems) a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de: desnaturação a 94 °C por 30 s; anelamento dos primers a 50 °C por 30 s; e extensão de DNA a 72 °C por 1 minuto. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% durante 35 min a 130 V. As Bandas de DNA (~ 700 bp) foram excisadas e purificadas usando o kit de extração em gel GenElute™ (Sigma Aldrich) e eluídas em um volume de 40 µL, seguido de quantificação no equipamento NanoPhotometer®. Os amplicons de PCR purificados foram clonados em vetores pGEM-T Easy (Promega), usando uma razão molar 5 (inserção): 1 (vetor), de acordo com as instruções do fabricante. As células competentes de *Escherichia coli* Stellar foram transformadas com as reações de ligação. As reações foram inoculadas em meio LB seletivo contendo ampicilina e, posteriormente, incubadas a 37 °C por 16 h. Os clones positivos foram confirmados por extração de DNA de plasmídeo, seguido de digestão com EcoRI e eletroforese em gel de agarose 1,5%.

As reações de sequenciamento de DNA foram preparadas com o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) usando 5 µL de DNA de plasmídeo (100 ng / µL) e 2,5 µL de 5 µM de iniciadores de sequenciamento M13F

(5'-CGCCAGGGTTTTTCCCAGTCACGAC-3') ou M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Quatro clones de cada amostra foram sequenciados em duplicata pelo método de Sanger, utilizando o ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems), no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (CEGH-USP, Brasil). As sequências de consenso para cada linhagem de *A. subrufescens* foram obtidas a partir da análise de todas as cópias de sequenciamento de DNA, usando o software Geneious Prime® 2020.2.4 (Biomatters). Um alinhamento múltiplo MUSCLE foi realizado usando essas sequências de consenso e outras sequências ITS de 23 linhagens de *A. subrufescens* de diferentes regiões geográficas (Tabela 01). Uma árvore de consenso foi gerada a partir do Geneious Tree Builder usando o método Neighbour-Joining e o modelo de distância genética Jukes-Cantor, com 10.000 réplicas no método de reamostragem bootstrap.

Tabela 1: Códigos de acesso GenBank para 23 sequências de ITS de *A. subrufescens* de diferentes regiões geográficas.

Sequência	Região geográfica	Acesso GenBank	Tipo de ITS*
CA487-C5	France	KU557352	A
WC837-S43	Brazil	KJ541797	A
F2285	Martinique	JF797201	A
CA487-C6	France	KU557353	B
WC837-S04	Brazil	KJ541796	B
L0341732	UK	AY818649	B
WC837	Brazil	KU557350	A/B
SBRF	USA	AY818657	A/B
CA864	France	KU557349	A/B
CA487-C2	France	KU557351	C
GY121118	China	KJ755633	C
GY128956	China	KJ755632	C
GY128883	China	KJ755634	C
GY133048	China	KJ755635	C
XHW1614	China	KJ755636	C
CA918	Thailand	KJ541798	C
ZRL2036	Thailand	KU557345	C
ZRL2134	Thailand	KU557346	C
NT001	Thailand	KU557347	C
CA935	Thailand	KU557348	C
KRP070	Hawaii	AY818648	C
DEH513	Hawaii	AY818646	C
DEH1073	Hawaii	AY818647	C

*Conforme classificação proposta por Chen et al. (2016).

2.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Para as avaliações morfológicas, 30 cogumelos de cada linhagem foram selecionados de forma aleatória antes da ruptura do véu (ponto de colheita recomendado) e os seguintes parâmetros foram avaliados: comprimento total do cogumelo, do píleo e do estipe, largura do estipe, da base do estipe e do píleo e tamanho do véu. As medidas foram realizadas conforme a figura 1, com auxílio de paquímetro digital de 150 mm, com precisão de 0,1 mm.

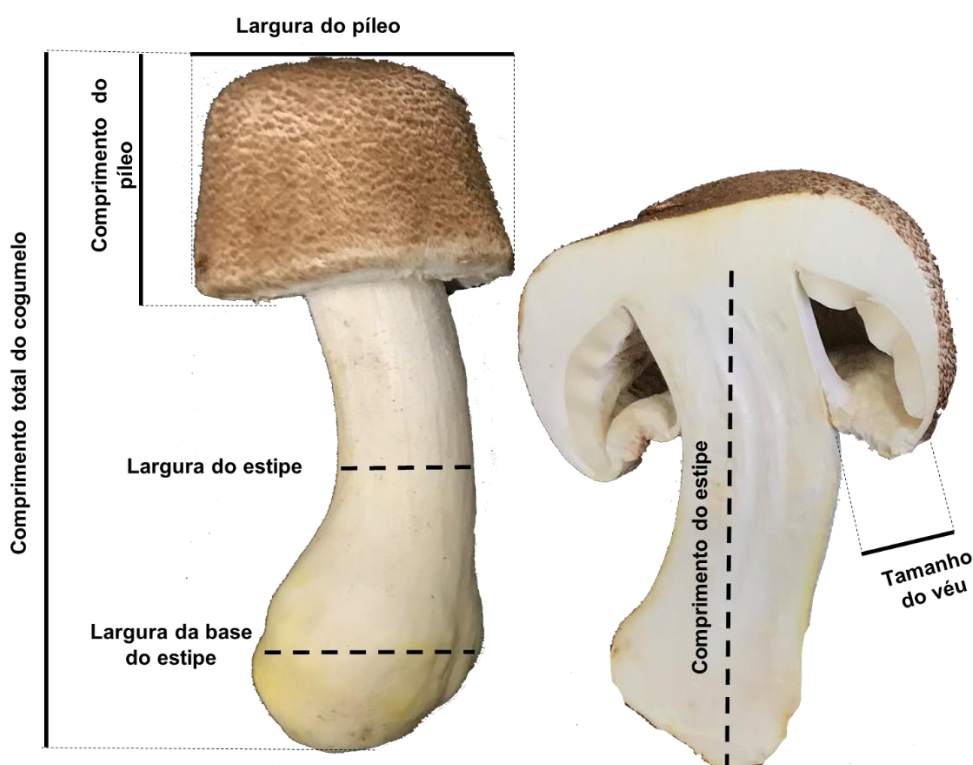


Figura 1: Avaliação das características morfológicas de cogumelos de linhagens de *A. subrufescens*.

Para avaliar a coloração do píleo, foi utilizado um estereoscópio binocular Discovery V20 e uma câmera color Axiocam 503 fabricada pela Zeiss®. As leituras foram feitas com duas linhas em forma de X, cada uma com cerca de 1000 pontos.

Após a medição, foi obtida a média de todos os pontos e, assim, cada cogumelo constituiu uma repetição. Os dados de cores foram obtidos no formato RGB (Vermelho, Verde e Azul) e analisados estatisticamente separados de acordo com o espectro de cores.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sequenciamento do DNA da região ribossomal (rDNA) de seis linhagens de *A. subrufescens* (ABL 03/44, ABL 18/01, ABL 04/49, ABL 98/11, ABL 16/03, ABL 19/01 e ABL CS7) mostrou uma amplificação bem sucedida da região genômica com 773pb, estando incluído uma região parcial da subunidade do gene do RNA ribossômico, sequências completas do gene do RNA ribossômico ITS1, 5,8s e ITS 2 e também uma sequência parcial do gene RNA ribossômico da subunidade maior (28s).

Ao se analisar regiões polimórficas através de um alinhamento múltiplo realizado entre as sequências ITS tipos A, B, A/B e C de *A. subrufescens* (Chen et al., 2016), foi possível constatar a ocorrência de ITS do tipo A para as linhagens ABL 03/44 e ABL 16/01 e do tipo ITS A/B para as linhagens ABL 04/49, ABL 98/11, ABL 18/01, ABL 19/01 e ABL CS7 (Tabela 02).

Variações de nucleotídeos foram observadas entre as sequências ITS das linhagens de *A. subrufescens* ABL 03/44, ABL 18/01, ABL 04/49, ABL 98/11, ABL 16/03, ABL 19/01, ABL CS7 e outras 23 sequências ITS de *A. subrufescens* oriundas de diferentes regiões geográficas (Tabela 01).

Tabela 2: Variações de nucleotídeos observadas em sequências ITS das cepas de *A. subrufescens*: ABL 03/44, ABL 18/01, ABL 04/49, ABL 98/11, ABL 16/03, ABL 19/01, ABL CS7 e outras 23 sequências ITS de *A. subrufescens* oriundas de diferentes regiões geográficas (listadas na Tabela 01).

	Posições polimórficas em sequências ITS																	
	90	168	176	184	199	200	208	224	240	254	323	389	521	525	614	644	673	704
ITS A	T	A	A	A	G	A	C	T	T	T	G	A	A	T	G	A	T	T
ABL 03/44	T	A	A	A	G	A	C	T	T	T	G	A	A	T	G	A	T	T
ABL 16/01	T	A	A	A	G	A	C	T	T	T	G	A	A	T	G	A	T	T
ITS B	-	G	G	G	A	T	Y	T	T	C	G	R	A	T	R	R	T	W
ITS A/B	T/-	A	R	R	R	W	Y	T	T	Y	G	A	A	T	G	R	T	T
ABL 04/49	T/-	A	R	R	R	W	Y	T	T	Y	G	A	A	T	G	R	T	T
ABL 98/11	T/-	A	R	R	R	W	Y	T	T	Y	G	A	A	T	G	R	T	T
ABL 18/01	T/-	A	R	R	R	W	Y	Y	T	Y	G	A	A	T	G	R	Y	T
ABL 19/01	T/-	A	R	G	R	W	Y	T	T	Y	G	A	A	T	G	A	T	T
ABL CS7	T/-	A	R	R	R	W	Y	T	Y	Y	G	A	A	T	G	R	T	T
ITS C	-	A	G	G	A	T	C	T	T	C	A	A	C	-	G	A	T	T

Além dos polimorfismos em 13 posições (90, 168, 176, 184, 199, 200, 254, 323, 521, 525, 614 e 704), já relatados por Chen et al. (2016), foi possível encontrar outros dois novos polimorfismos nas posições 208 e 644 para ITS tipo B e para as linhagens ABL 04/49, ABL 98/11, ABL 18/01 e ABL CS7 e na posição 208 para linhagem ABL 19/01. O sequenciamento de DNA de mais clones foi necessário para confirmar as variações nas posições 224, 240 e 673.

Uma árvore de consenso foi construída a partir do alinhamento múltiplo entre as sequências ITS adquiridas e outras 23 sequências ITS de *A. subrufescens* das Américas, Ásia, Europa e Oceania. O alinhamento revelou que todas as cepas analisadas neste trabalho são filogeneticamente mais próximas dos espécimes das Américas e da Europa (ITS do tipo A, B ou A/B) do que os da Ásia e Oceania, caracterizadas com ITS tipo C (Figura 2).

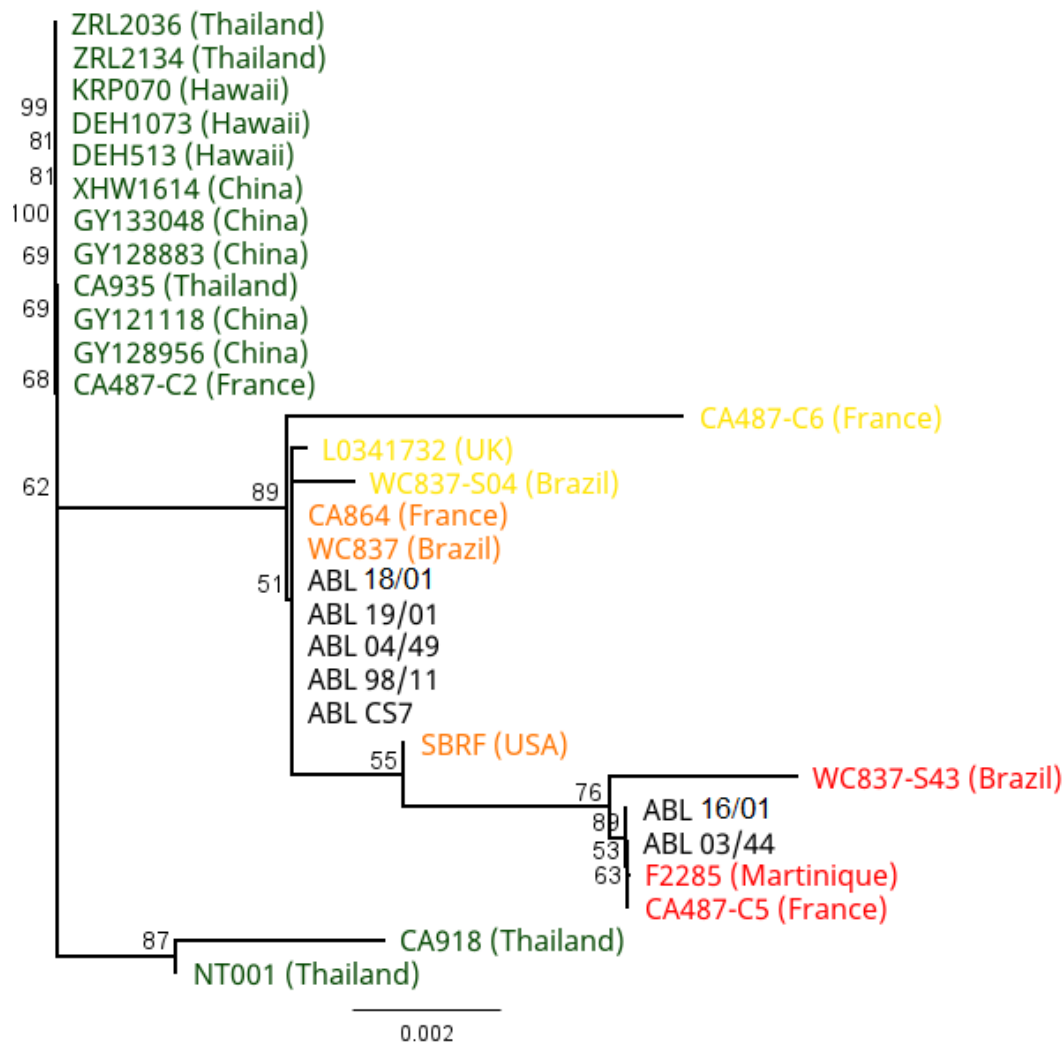


Figura 2: Árvore de consenso de união de vizinhos de sequências ITS com linhagens de *A. subrufescens* ABL 16/01, ABL 18/01, ABL 98/11, ABL CS7, ABL 04/49, ABL 03/44, ABL 19/01 e outras 23 sequências ITS de *A. subrufescens* de diferentes regiões geográficas. Diferentes cores são usadas para ilustrar os tipos de sequências ITS de *A. subrufescens*: vermelho para ITS A, amarelo para ITS B, verde para ITS C e laranja para ITS A / B; seguindo a classificação anteriormente proposta por Chen et al. (2016). Valores de suporte de bootstrap maiores que 50% e a escala de comprimentos de ramos são indicados.

Os cogumelos de *A. subrufescens* mostram um alto nível de polimorfismo na região ITS (Internal Transcribed Spacer) da região do DNA ribossômico nuclear (rDNA) (Kerrigan, 2005). Comparando sequências ITS de *A. subrufescens* de diferentes regiões geográficas, Chen et al. (2016) observaram uma distribuição de ITS do tipo A, B ou ambos A/B. Por outro lado, espécimes da Ásia ou Oceania exibiram ITS do tipo C, com exceção do isolado selvagem francês CA487, com ITS dos tipos A, B e C.

Os resultados revelaram que todas as linhagens de *A. subrufescens* caracterizadas neste trabalho são filogeneticamente relacionadas aos espécimes das Américas / Europa, portanto ITS do tipo A (ABL 16/01) ou ambos os tipos A e B (ABL 03/44, ABL 04/49, ABL 98/11, ABL 19/01, ABL 18/01 e ABL CS7). Assim, eventuais diferenças nas características agronômicas entre as linhagens devem ser relacionadas a diferenças em outras regiões genômicas. Essas regiões podem ser estudadas por outros métodos moleculares, incluindo os marcadores de repetição de sequência simples (SSR - Simple Sequence Repeats), uma ferramenta molecular de alto potencial para estudar a diversidade genética e biologia reprodutiva (Foulongne-Oriol et al., 2014, 2012).

Avaliando a morfologia dos cogumelos, verificou-se grande diferença entre as linhagens. Na análise de comprimento total dos cogumelos, as linhagens ABL 04/49 e ABL CS7 apresentaram os maiores valores no cultivo em câmara climática e a linhagem ABL 19/01 o menor valor. No cultivo em campo, a linhagem ABL CS7 e ABL 16/01 apresentaram os maiores valores e o restante das linhagens apresentaram valores inferiores. Em relação ao comprimento do píleo, a linhagem ABL 18/01 apresentou o maior valor, tanto no ambiente em câmara climática quanto em cultivo a campo (Tabela 04).

Quanto à largura do píleo, a linhagem ABL 18/01 apresentou maior valor em câmara climática, enquanto que a ABL 04/49 apresentou maior valor no cultivo a campo. Em quase todas as linhagens, a largura foi maior em cogumelos cultivados em câmara climática, com exceção da linhagem ABL 16/01. No tamanho do véu, a linhagem ABL 18/01 obteve os maiores valores tanto em câmara quanto em campo e

a linhagem 16/01 os menores valores também nos dois ambientes, onde o cultivo a campo favoreceu maiores valores com exceção da linhagem ABL 04/49. (Tabela 04).

A espessura do estipe foi analisada e constatou-se que a linhagem ABL 18/01 apresentou maior valor para cultivo em câmara e a linhagem ABL 98/11 o maior valor para cultivo em campo. Os maiores valores desta característica foram observados no cultivo a campo, com exceção da linhagem ABL 19/01. Por último a linhagem ABL 18/01 apresentou maiores média em câmara, para a espessura da base do estipe e, juntamente com as linhagens ABL 98/11, 16/01, apresentou maior média também no cultivo a campo (Tabela 03).

Tabela 3: Características morfológicas de basidiocarpos de diferentes linhagens de *A. subrufescens*.

Linhagens						
Ambiente	ABL 04/49	ABL 98/11	ABL CS7	ABL 16/01	ABL 18/01	ABL 19/01
Comprimento total do cogumelo						
Câmara	106,78 a A	98,53 b A	102,35 a A	95,25 b A	97,29 b A	80,23 c B
Campo	90,35 b B	94,65 b A	103,30 a A	99,80 a A	93,54 b A	99,41 a A
CV (%)	9,69					
Largura do píleo						
Câmara	47,10 b A	46,94 b A	37,34 c B	37,35 c B	65,15 a B	38,29 c B
Campo	48,28 c A	50,46 b A	45,74 c A	44,77 c A	70,59 a A	52,43 b A
CV (%)	13,82					
Comprimento total do píleo						
Câmara	38,61 b A	38,10 b A	34,94 c A	28,30 d B	41,10 a A	36,22 c A
Campo	44,05 a B	34,05 c B	30,50 d B	33,57 c A	38,46 b B	36,32 c A
CV (%)	11,1					
Tamanho do véu						
Câmara	15,07 b A	14,94 b B	14,22 b A	10,50 c B	16,61 a B	13,23 b B
Campo	11,24 d B	17,40 b A	14,27 c A	14,92 c A	20,45 a A	18,36 b A
CV (%)	18,52					
Comprimento total do estipe						
Câmara	103,52 a A	85,78 c A	94,35 b A	83,25 c A	82,24 c A	69,94 d B
Campo	72,75 c B	80,32 c A	94,97 a A	85,80 b A	80,87 c A	89,83 b A
CV (%)	10,31					
Espessura do estipe						
Câmara	16,92 c A	21,84 b B	19,12 c B	18,45 c B	26,68 a A	17,70 c A
Campo	17,81 d A	29,10 a A	22,72 c A	26,11 b A	26,32 b A	14,31 e B
CV (%)	14,71					
Espessura da base do estipe						
Câmara	24,75 d B	33,83 b A	30,24 c A	27,75 d B	42,46 a A	25,99 d A
Campo	28,11 b A	32,81 a A	23,70 c B	35,44 a A	34,61 a B	21,13 c B
CV (%)	18,52					

Médias com letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas distintas entre colunas diferiram pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Também houve diferença na coloração dos cogumelos conforme as linhagens estudadas. A ABL 98/11 obteve os maiores valores em todos os espectros de cor, sendo classificada como uma linhagem mais clara em comparação as demais. Observa-se que há um leve escurecimento da linhagem quando cultivada a campo, onde apenas o espectro azul é igual nos dois ambientes. A linhagem ABL 19/01 apresentou os menores valores em todas as cores, sendo apenas a cor vermelha afetada pelo ambiente de cultivo. A linhagem, então, é classificada por apresentar cogumelos mais escuros (Figura 04).

Tabela 4: Coloração do píleo de diferentes linhagens de *A. subrufescens*.

	Linhagens					
Ambiente	ABL 04/49	ABL 98/11	ABL CS7	ABL 16/01	ABL 18/01	ABL 19/01
	Vermelho (0-255)					
Câmara	215,60 a A	221,45 a A	132,41 c B	198,55 b A	188,20 b A	136,55 c A
Campo	158,55 b B	202,90 a B	154,25 b A	199,70 a A	129,45 c B	117,15 c B
CV (%)	15,52					
	Verde (0-255)					
Câmara	183,50 b A	211,20 a A	105,82 c B	169,30 b B	161,55 b A	113,65 c A
Campo	155,00 b B	188,30 a B	129,90 c A	194 a A	128,90 c B	100,05 d A
CV (%)	18,74					
	Azul (0-255)					
Câmara	151,90 b A	186,15 a A	77,13 d B	142,15 b B	123,80 c A	82,15 d A
Campo	151,65 b A	172,63 a A	132,10 c A	177,70 a A	129,75 c A	90,00 d A
CV (%)	22,03					

Letras diferentes dentro de cada cor avaliada difeririam pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, sendo minúsculas comparam nas linhas e maiúsculas nas colunas.

As características morfológicas dos cogumelos são importantes na seleção de linhagens a serem cultivadas comercialmente. No Brasil, a comercialização de cogumelos é baseada em padrões como comprimento (altura) do cogumelo, largura da base e estipe, e nível de abertura de véu (quanto mais fechado, melhor preço), sendo classificado como cogumelo extra, cogumelo A, cogumelo B e aberto (Zied et al., 2017). Esse trabalho demonstra que há linhagens que podem proporcionar cogumelos que estão classificados como cogumelos extra (ABL 16/01 e ABL 18/01),

atendendo a todos os padrões de qualidade, com comprimento acima de 80mm, largura de base entre 35 e 50mm e píleo fechado.

Em geral, o tamanho do píleo é em torno de 20 a 70mm e de 60 a 150 no estágio maduro, sendo um cogumelo carnoso (Wisitrassameewong et al., 2012). Além da variação do píleo, dados da literatura mostram que outras partes do cogumelo podem variar bastantes (Kerrigan, 2005). O formato do píleo e a coloração da lamela são das poucas características que apresentam um certo padrão (Firenzuoli et al., 2008).

Tamanho dos basidiocarpos podem ter variações devido ao genótipo e também quanto às influências ambientais (Kerrigan, 2005), justificando por que a mesma linhagem por ter características morfológicas variáveis em locais de cultivo distintos. Em relação à cor do píleo das linhagens, a mesma está ligada ao grau de maturação do cogumelo (próximo à ruptura do véu torna-se mais claro) e ao número de pequenas escamas no píleo. Pardo-Giménez et al. (2020) relataram que o método de indução dos primórdios também influencia a cor do píleo, de modo que a indução lenta mantém o píleo mais escuro, utilizando a linhagem ABL 99/30. Em geral, essa espécie apresenta uma variabilidade morfológica muito grande que é influenciada por diferentes climas e ecossistemas (Wisitrassameewong et al., 2012).

4. CONCLUSÕES

Todas as linhagens de *A. subrufescens* caracterizadas neste trabalho são filogeneticamente relacionadas a linhagens das Américas e Europa por possuírem ITS do tipo A ou ambos os tipos A e B. As linhagens possuem alta variação morfológica de todas características avaliadas, e podem ser influenciadas conforme o ambiente de cultivo, porém não apresentam altas taxas de polimorfismo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Chen J, Moinard M, Xu J, Wang S, Foulongne-Oriol M, Zhao R, Hyde KD, Callac P (2016) Genetic Analyses of the Internal Transcribed Spacer Sequences Suggest Introgression and Duplication in the Medicinal Mushroom *Agaricus subrufescens*. **PLOS ONE** 11 e0156250.

Chu J-N, Young C-C, Tan C-C, Wu S-P, Young L-S (2012) Improvement of productivity and polysaccharide-protein complex in *Agaricus blazei*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 47:96–102.

Colauto NB, Dias ES, Gimenes MA, Eira AF (2002) Genetic characterization of isolates of the basidiomycete *Agaricus blazei* by RAPD. **Brazilian Journal of Microbiology** 33:131–133.

Colauto NB, Silveira AR, Eira A, Linde GA (2010) Alternative to peat for *Agaricus brasiliensis* yield. **Bioresource Technology** 101:712–716.

Eira AF, Kaneno R, Filho ER, Barbisan LF, Pascholati SF, Piero RMD, Salvadori DMF, Lima PLA, Ribeiro LR (2005) Farming Technology, Biochemistry Characterization, and Protective Effects of Culinary-Medicinal Mushrooms *Agaricus brasiliensis* S.Wasser et al. and *Lentinus edodes* (Berk.) Singer: Five Years of Research in Brazil. **International Journal of Medicinal Mushrooms** 7:281-299.

Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G (2008) The medicinal mushroom *Agaricus blazei murrill*: review of literature and pharmaco-toxicological problems. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 5:3–15.

Foulongne-Oriol M, Brito MR, Cabannes D, Clément A, Spataro C, Moinard M, Dias ES, Callac P, Savoie J-M (2016) The Genetic Linkage Map of the Medicinal Mushroom *Agaricus subrufescens* Reveals Highly Conserved Macrosyteny with the Congeneric Species *Agaricus bisporus*. **G3: Genes, Genomes, Genetics** 6:1217–1226.

Foulongne-Oriol M, Lapalu N, Férandon C, Spataro C, Ferrer N, Amselem J, Savoie J-M (2014) The first set of expressed sequence tags (EST) from the medicinal mushroom *Agaricus subrufescens* delivers resource for gene discovery and marker development. **Applied microbiology and biotechnology** 98:7879–7892.

Foulongne-Oriol M, Spataro C, Moinard M, Cabannes D, Callac P, Savoie J-M (2012) Development of polymorphic microsatellite markers issued from pyrosequencing technology for the medicinal mushroom *Agaricus subrufescens*. **FEMS Microbiology Letters** 334:119–126.

Fukuda M, Ohno S, Kato M (2003) Genetic variation in cultivated strains of *Agaricus blazei*. **Mycoscience** 44:431–436.

González Matute R, Figlas D, Curvetto N (2010) Sunflower seed hull based compost for *Agaricus blazei* Murrill cultivation. **International Biodeterioration & Biodegradation** 64:742–747.

Gregori A, Pahor B, Glaser R, Pohleven F (2008) Influence of carbon dioxide, inoculum rate, amount and mixing of casing soil on *Agaricus blazei* fruiting bodies yield. **Acta Agriculturae Slovenica** 91:371–378.

Hernandez RCL, Largeveau M, Farnet A-M, Minvielle N, Regnault-Roger C, Savoie J-M (2011) Phenotypic variability in cultivars and wild strains of *Agaricus brasiliensis* and *Agaricus subrufescens*. Presented at the 7. International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, INRA.

Iwade I, Mizuno T (1997) V. Cultivation of kawariharatake (*Agaricus blazei* Murrill). **Food Reviews International** 13:383–390.

Jatuwong K, Kakumyan P, Chamyuang S, Chukeatirote E, Hyde K (2014) Optimization condition for cultivation of *Agaricus subrufescens* hybrid strains. Presented at the 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.

Kerrigan RW (2007) Inclusive and Exclusive Concepts of *Agaricus subrufescens* Peck: A Reply to Wasser et al. **International Journal of Medicinal Mushrooms** 9:79-84.

Kerrigan RW (2005) *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia** 97:12–24.

Lisiecka J, Sobieralski K, Siwulski M, Jasinska A (2013) Almond mushroom *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.) – properties and culture conditions. **Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus** 12:27–40.

Llarena-Hernández RC, Largeteau ML, Farnet A-M, Foulongne-Oriol M, Ferrer N, Regnault-Roger C, Savoie J-M (2013) Potential of European wild strains of *Agaricus subrufescens* for productivity and quality on wheat straw based compost. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 29:1243–1253.

Neves MA, Kasuya MCM, Araujo EF, Leite CL, Camellini CM, Ribas LCC, Mendonca MM (2005) Physiological and Genetic Variability of Commercial Isolates of Culinary-Medicinal Mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (Agaricomycetideae) Cultivated in Brazil. **International Journal of Medicinal Mushrooms** 7:553-564.

Pardo-Giménez A, Pardo González JE, Figueirêdo VR, Zied DC (2014) Adaptabilidad de cepas brasileñas de *Agaricus subrufescens* Peck a la fructificación sobre diferentes capas de cobertura en cultivo comercial. **Revista Iberoamericana de Micología** 31:125–130.

Pardo-Giménez A, Pardo JE, Dias ES, Rinker DL, Caitano CEC, Zied DC (2020) Optimization of cultivation techniques improves the agronomic behavior of *Agaricus subrufescens*. **Scientific Reports** 10:1-9.

Sousa MAC, Zied DC, Marques SC, Rinker DL, Alm G, Dias ES (2016) Yield and enzyme activity of different strains of almond mushroom in two cultivation systems. **Sydowia** 68:35–40.

Stoknes K, Beyer DM, Norgaard E (2013) Anaerobically digested food waste in compost for *Agaricus bisporus* and *Agaricus subrufescens* and its effect on mushroom productivity. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 93:2188–2200.

Thongklang N, Chen J, Bandara AR, Hyde KD, Raspé O, Parra LA, Callac P (2016) Studies on *Agaricus subtilipes*, a new cultivatable species from Thailand, incidentally reveal the presence of *Agaricus subrufescens* in Africa. **Mycoscience** 57:239–250.

Thongklang N, Hoang E, Rodriguez Estrada AE, Sysouphanthong P, Moinard M, Hyde KD, Kerrigan RW, Foulongne-Oriol M, Callac P (2014) Evidence for amphithallism and broad geographical hybridization potential among *Agaricus subrufescens* isolates from Brazil, France, and Thailand. **Fungal Biology** 118:1013–1023.

Wasser SP, Didukh MY, Amazonas MALA, Nevo E, Stamets P, Eira AF (2002) Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun *Agaricus* (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms** 4:267–290.

Wisitrassameewong K, Karunarathna SC, Thongklang N, Zhao R, Callac P, Moukha S, Férandon C, Chukeatirote E, Hyde KD (2012) *Agaricus subrufescens*: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences** 19:131–146.

Zied DC, Pardo JE, Tomaz RS, Miasaki CT, Pardo-Giménez A (2017) Mycochemical Characterization of *Agaricus subrufescens* considering Their Morphological and Physiological Stage of Maturity on the Traceability Process. **BioMed Research International** 2017:ID2713742.

Zied DC, Pardo-Gimenez A, Savoie J-M, Pardo-Gonzalez JE, Callac P (2011) “Indoor” method of composting and genetic breeding of the strains to improve yield and quality of the almond mushroom *Agaricus subrufescens*. Presented at the 7. International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, INRA.

CAPITULO 3 – Comportamento agrônômico de linhagens de *Agaricus subrufescens* cultivadas a céu aberto

RESUMO – O cultivo de *Agaricus subrufescens* em sua maioria é realizado em ambientes protegidos. Em contrapartida, a utilização de cultivos a céu aberto requer menor investimento. Dentre vários fatores importantes, estudar quais linhagens se adaptam nessas condições de cultivo é de suma importância, além de estipular quais são os aspectos limitantes durante o cultivo. O objetivo deste trabalho foi investigar o comportamento agrônômico de diferentes linhagens de *Agaricus subrufescens* cultivadas a céu aberto. Para isso, foram instalados três experimentos divididos durante 7 meses do ano (dezembro de 2019 a junho de 2020), para caracterizar o rendimento das linhagens. Cada experimento foi conduzido durante 100 dias, sendo o primeiro dia contado a partir da inoculação do composto. Os cogumelos foram colhidos manualmente antes do rompimento do véu, foram pesados e contados para analisar: dias para primeira colheita, precocidade, eficiência biológica, taxa de produtividade, produtividade, número de cogumelos e massa média de cogumelos. A linhagem ABL CS7 mostrou-se mais adaptada a temperaturas elevadas e foi a única que produziu em todos os experimentos, além de obter a maior produtividade no terceiro cultivo (20,95%), chegando a margens de produtividade próximas a cultivos em ambientes controlados. No segundo cultivo, a linhagem ABL 98/11 alcançou a maior produtividade com apenas 4,83%. A temperatura foi considerada o principal limitante para produção do fungo a céu aberto, sendo que, apenas alguns meses do ano foram considerados eficientes (maio e junho).

Palavra-chaves: Cogumelo do sol, Cultivo de cogumelos, Fungos, Micologia

CHAPTER 3 – Agronomic behavior of *Agaricus subrufescens* strains cultivated in open environment

ABSTRACT - The cultivation of *Agaricus subrufescens* is mostly carried out in protected environments. In contrast, the use of open crops requires less investment. Among several important factors, studying which strains adapt under these cultivation conditions is of paramount importance, in addition to stipulating which are the limiting aspects during cultivation. The objective of this work was to investigate the agronomic behavior of different strains of *Agaricus subrufescens* cultivated in the open. For this, three experiments were installed divided over 7 months of the year (December 2019 to June 2020), to characterize the yield of the strains. Each experiment was conducted for 100 days, the first day being counted from the inoculation of the compound. The mushrooms were harvested manually before the veil was broken, weighed and counted to analyze: days for first harvest, precocity, biological efficiency, productivity rate, productivity, number of mushrooms and average mushroom mass. The ABL CS7 strain proved to be more adapted to high temperatures and was the only one that produced in all experiments, in addition to obtaining the highest productivity in the third crop (20.95%), reaching productivity margins close to crops in controlled environments. In the second crop, the ABL 98/11 strain achieved the highest productivity with only 4.83%. Temperature was considered the main limiting factor for the production of open fungus, and only a few months of the year were considered efficient (May and June).

Keywords: Sun mushroom, Mushroom cultivation, Fungi, Mycology

1. INTRODUÇÃO

Dentre os cogumelos produzidos, os medicinais são considerados um dos mais importantes, por apresentarem diversos benefícios para a saúde humana (Chang and Wasser, 2012; Gargano et al., 2017; Taofiq et al., 2017). O *Agaricus subrufescens* é cultivado há muitos anos, porém, sua produção ainda está limitada a apenas alguns países (Largeteau et al., 2011), sendo o Brasil um destes, mesmo com uma quantidade pequena de produtores.

O Cultivo de *A. subrufescens* é realizado na maioria das vezes com um baixo nível tecnológico, em ambientes protegidos sem controle rigoroso de umidade e temperatura. O cultivo em céu aberto é outra forma de produção, que é uma alternativa para produtores que optam por um menor custo de instalação, porém esse tipo de sistema apresenta menores rendimentos (Largeteau et al., 2011). Segundo Stamets (2000), o cultivo a céu aberto só é possível, de forma contínua, em regiões do sul dos Estados Unidos, ou também nos meses de verão em outros países. Tal limitação seria decorrente da sensibilidade da espécie a condições climáticas (Eira, 2003).

Trabalhos que abordem o cultivo a céu aberto são escassos na literatura e ainda não se sabe ao certo quais são as condições ideais para maiores rendimentos, como foi o caso de Cavalcante et al. (2005), que realizaram o cultivo em ambiente aberto em uma área próxima à floresta nativa, na região de Guaramiranga, no estado do Ceará, e obtiveram apenas 6,5% de produtividade, valor abaixo do índice médio de produtividade brasileira, que pode chegar em 16% em ambiente protegido (Zied et al., 2011).

Além das condições climáticas, é de se supor que diferentes linhagens podem se adaptar melhor ao cultivo em céu aberto. Segundo Zied et al. (2014), ao avaliar diferentes estruturas de cultivo protegido, a linhagem é responsável por 81,3% na variação da produtividade, ressaltando assim a importância do estudo desses dois fatores (ambiente de cultivo e linhagem), o que pode ocasionar ao produtor maiores rendimentos.

Sendo assim o objetivo desse trabalho foi avaliar as características agrônômicas de linhagens de *A. subrufescens*, cultivadas a céu aberto em diferentes períodos do ano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na área experimental do Centro de Estudo em Cogumelos da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (CECOG/FCAT - UNESP), em blocos casualizados, em um esquema fatorial simples com 6 linhagens de *A. subrufescens*, cada tratamento constituído de 09 repetições. O experimento foi repetido três vezes em diferentes épocas do ano, sendo o primeiro experimento conduzido de novembro/2019 a março/2020, o segundo de janeiro/2020 a março/2020 e o terceiro de março/2020 a julho/2020.

O cultivo foi realizado a céu aberto, onde, 20 dias antes da abertura dos sulcos, foi aplicado carbonato de cálcio na área experimental, visando aumentar o pH do solo para 7,5; em seguida os sulcos foram abertos com 50 cm de largura e 30 cm de profundidade, sendo eles espaçados em uma distância de 60cm.

Após a total colonização do composto pelo fungo (que durou em média 20 dias), que ocorreu em ambiente controlado sob a temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade de $80 \pm 5 \%$ e o teor de CO_2 de 1000 ± 200 ppm, o mesmo foi disposto nos sulcos previamente abertos no solo. Em seguida, o próprio solo retirado na abertura dos sulcos foi adicionado sobre o composto colonizado, formando a camada de cobertura, com 5 cm de altura (Figura 1). Uma camada de capim seco com cerca de 50cm foi adicionada sobre a camada de cobertura, para evitar o ressecamento do solo. Uma vez ao dia foi aplicada uma lâmina de irrigação, visando manter um microclima úmido (Cavalcante et al., 2008). Todos os experimentos foram conduzidos por 100 dias, período contado da inoculação do composto até a última colheita.

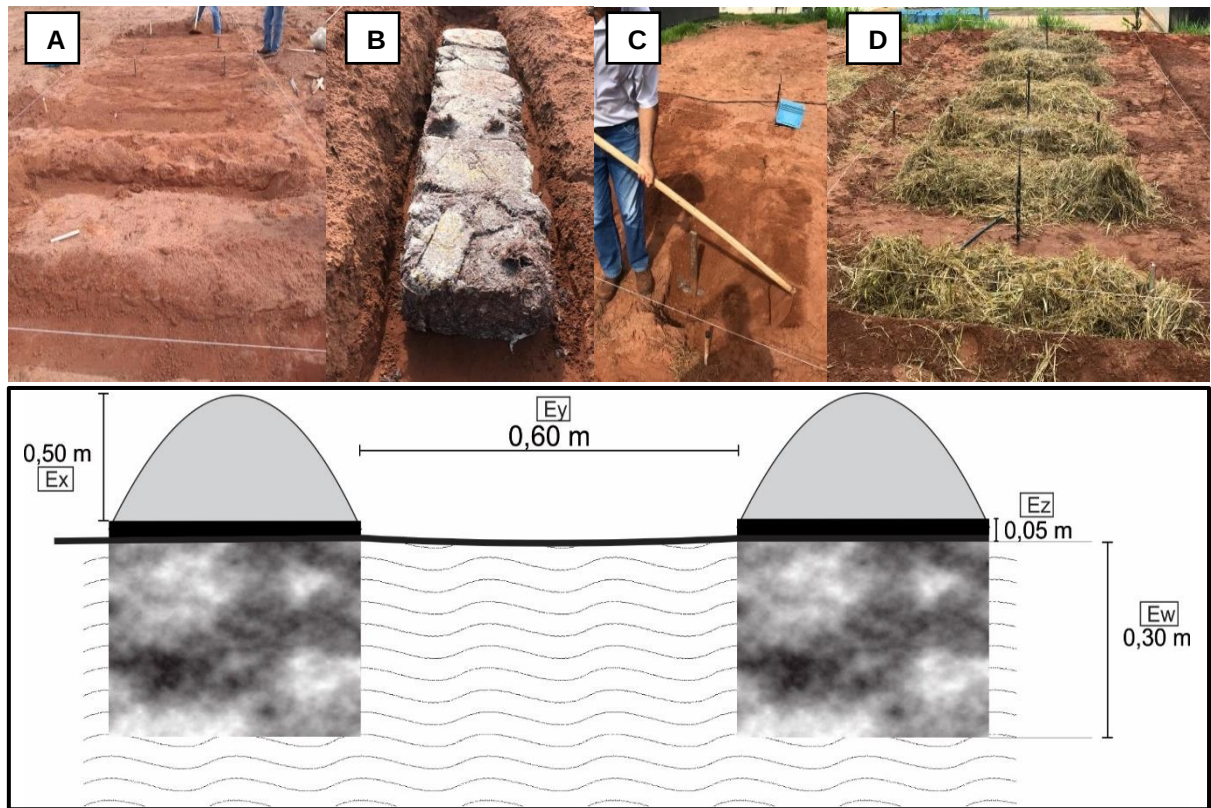


Figura 1: Instalação de cultivo a céu aberto de *A. subrufescens*, sendo A: abertura do sulco no solo; B: adição do composto colonizado no sulco; C: cobertura do composto com o mesmo solo retirado; D: cobertura das linhas de cultivo com palha seca e E: esquema da condução do cultivo, onde Ex: refere-se a altura da palha, Ey: distância entre linhas de cultivo, Ez: altura da camada de cobertura e Ew: profundidade do sulco de plantio.

2.1. INÓCULO

No primeiro e segundo cultivo foram utilizadas as linhagens ABL 04/49, ABL 98/11, ABL CS7, ABL 18/01, ABL 16/03 e ABL 03/44. No terceiro cultivo, a linhagem ABL 03/44 foi substituída pela linhagem ABL 19/01. O inóculo foi produzido através do isolamento de um cogumelo. A metodologia utilizada para produção seguiu os procedimentos adotados por Zied e Minhoni (2009), com as seguintes etapas: seleção

de um cogumelo para o isolamento em meio de cultura (matriz primária), produção de matriz secundária, produção de pré-inóculo (matriz terciária) e produção de inóculo. Todos os processos foram realizados em câmara de fluxo, com ambiente estéril. Para a produção da matriz terciária e do inóculo foram utilizadas sementes de sorgo, previamente cozidas e misturadas a 2% de calcita conforme o peso úmido (Figura 2).

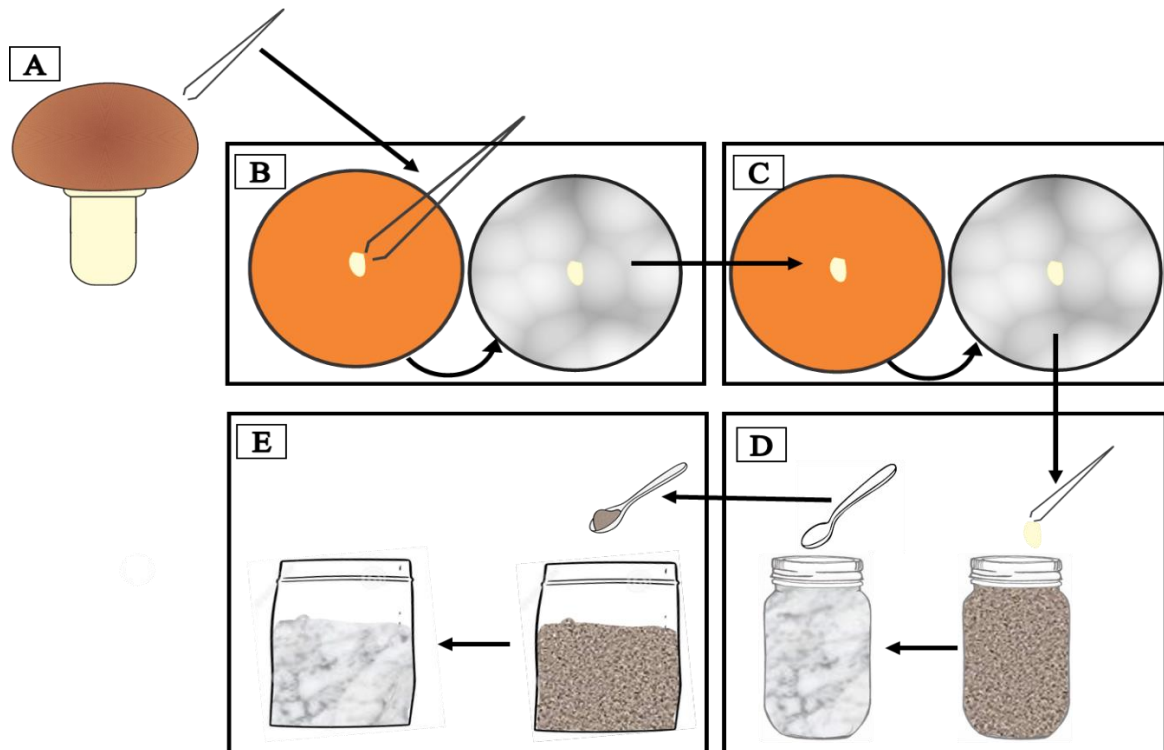


Figura 2: Produção de inóculo de *A. subrufescens* sendo, A: cogumelo; B: matriz primária; C: matriz secundária; D: matriz terciária; E: inóculo.

2.2. COMPOSTO

Foram preparados 3 compostos, sendo um para cada cultivo. Todos foram a base de braquiária e bagaço de cana, acrescidos de ureia, sulfato de amônia, calcário e gesso, com relação C/N em torno de 20/1 (Tabela 1). A compostagem foi realizada pelo método tradicional seguindo metodologia proposta por Zied et al. (2018), que foi constituído de duas fases, sendo elas: i) estabelecida por 7 dias de pré-umedecimento

e 19 dias de fermentação, sendo realizado a viragem do composto a cada 4 dias e ii) onde o composto foi encaminhado para salas de pasteurização e mantido primeiramente por 8 horas a uma temperatura de $59 \pm 1^\circ\text{C}$ e posteriormente mais 8 dias a $47 \pm 2^\circ\text{C}$. Observa-se, na tabela 1, a análise química de cada composto.

Tabela 1. Análise química de composto para produção de *A. subrufescens*

Composto	%								mg kg ⁻¹ matéria seca							pH
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	S	MO	C	Na	Cu	Fe	Mn	Zn	C/N		
A	1,85	0,29	3,16	0,47	0,08	1,02	73	41	3456	220	2109	254	228	22:1	7,5	
B	2,04	0,34	3,14	1,00	0,08	1,07	68	38	3955	208	1562	274	286	18:1	7,7	
C	2,2	1,38	3,46	6,6	0,66	1,68	68	39	3846	181	1095	190	239	17:1	7,2	

Composto A utilizado no primeiro experimento, composto B no segundo e composto C no terceiro.

2.3. INOCULAÇÃO

Ao término do processo de pasteurização (final da fase 2), 9 kg do composto foram dispostos em caixas plásticas e misturados com 90 g de inóculo (1% de inóculo). As caixas foram incubadas em média 20 dias (até que o fungo colonizasse todo o composto) em uma temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade em torno de $80 \pm 5\%$ sem a presença de luz.

2.4. COLHEITA

A colheita foi manual, realizada quando o píleo ainda estava fechado, sem o rompimento do véu. Após a tomada dos dados, os cogumelos foram lavados em água corrente com auxílio de uma bucha de lavar louças. Após foram cortados ao meio e desidratados a 40°C por 36 horas, em desidratador próprio para o processo, com as seguintes características: velocidade do ar de 1m/s e 15% de renovação de ar (Zied et al., 2017).

2.5. VARIÁVEIS ANALISADAS

2.5.1. CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS

Os cogumelos colhidos foram contados e pesados para a avaliação de: dias requeridos para primeira colheita (dias da inoculação até a primeira colheita), precocidade (rendimento na primeira metade do tempo total de colheita / rendimento no tempo total de colheita x 100, expresso em porcentagem), eficiência biológica (peso fresco de cogumelos/peso seco do substrato inicial x 100, expresso em porcentagem), taxa de produtividade (eficiência biológica / tempo em dias requeridos para a colheita), produtividade (massa fresca dos cogumelos (g)/peso do substrato inicial úmido (g) x 100, expresso em porcentagem), número (contagem manual(u)) e massa de basidiomas (massa fresca dos cogumelos/número de cogumelos, expresso em gramas) (Oliveira et al., 2007; Pardo-Giménez et al., 2010; Zied et al., 2010).

Depois da obtenção dos dados, os mesmos foram submetidos à análise de variância e em seguida comparou-se as médias pelo teste de Scott-Knott a 5% (Scott and Knott, 1974). Foi utilizado o software SISVAR 4.2, desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, BRASIL (Ferreira, 2014). O desvio padrão relativo foi determinado pela seguinte equação:

$$\text{Desviopadrão relativo} = \frac{\text{Desviopadrão do intervalo de dados}}{\text{Média do intervalo de dados}} * 100$$

2.5.2. DADOS CLIMÁTICOS

Os dados climáticos utilizados, tais como: temperatura, umidade do ar, velocidade do vento, chuvas e insolação foram coletados pela estação meteorológica da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT-UNESP).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro cultivo, apenas a linhagem ABL CS7 frutificou. Foram necessários em média 104 dias após a inoculação para a primeira colheita. A linhagem obteve um valor de 5,52% para produtividade, com cerca de 5,33 cogumelos, pesando em média 37,69g.

No segundo cultivo, apenas quatro linhagens produziram. A linhagem ABL 98/11 se destacou pela formação de primórdios aos 90 dias após a inoculação. Em questão de precocidade, apenas a linhagem ABL 04/49 foi classificada como precoce, já as demais (ABL 98/11, ABL CS7 e ABL 16/01) foram classificadas como tardias. Abordando o rendimento, a linhagem ABL 98/11 foi a mais produtiva com 4,83%, seguida da linhagem ABL 04/49 e por último as linhagens ABL CS7 e ABL 16/01 com 1,83% e 1,33%, respectivamente. A linhagens ABL 98/11 e ABL 04/49 apresentaram maior quantidade de cogumelos colhidos, sendo a ABL 98/11 com cogumelos de maior massa média (34,66g).

A linhagem ABL 98/11 e ABL 04/49, no terceiro cultivo, demandaram 40,66 e 41,50 dias, respectivamente, para a primeira colheita, sendo a linhagem ABL 16/01 que necessitou maior quantidade de dias. Todas as linhagens foram classificadas como precoce nesse cultivo. A linhagem ABL CS7 foi a mais produtiva com 20,95% e também a com maior quantidade de cogumelos colhidos. A ABL 16/01 apresentou baixa produtividade (5,55%) com menor quantidade de cogumelos, porém foi a que apresentou cogumelos mais pesados. Assim como a produtividade, o mesmo se repetiu para eficiência biológica e a taxa de produtividade.

Tabela 2: Avaliações de características agrônômicas de diferentes linhagens de *A. subrufescens* em três períodos de cultivo a céu aberto.

Linhagens	DPC (dias)	PRC (%)	EFB (%)	TXP	PROD (%)	NC (u)	MMC (%)
Cultivo 01							
			17,72		5,52		
ABL CS7	104 (0)	100 (0)	(45,85)	0,17 (45,85)	(45,85) ^o	5,33 (38,52)	37,69 (12,72)
CV(%)	-	-	-	-	-	-	-
Cultivo 2							
		57,97 a	13,16 a	0,131 a	3,83 b		
ABL 04/49	93 b (4,48)	(68,61)	(18,45)	(18,45)	(18,45)	6 a (19,24)	25,04 b (8,95)
		25,04 b	15 a	0,15 a	4,83 a		
ABL 98/11	90 a (5,67)	(106,72)	(19,18)	(19,18)	(19,18)	5 a (20)	34,66 a (2,76)
	95,16 b		5,83 b	0,05 b	1,83 c	2,66 b	26,56 b
ABL CS7	(0,72)	0 b (0)	(16,93)	(16,93)	(16,93)	(27,95)	(20,57)
			4,16 b	0,04 b	1,33 c	1,83 b	27,20 b
ABL 16/01	95 b (0)	0 b (0)	(21,43)	(21,43)	(21,43)	(20,33)	(15,85)
CV (%)	3,55	127	22,4	22,4	24,1	23,4	13,6
Cultivo 3							
	40,66 a	57,37 b	40,34 b	0,40 b	13,75 b	26,83 b	30,72 d
ABL 04/49	(1,83)	(21,03)	(22,44)	(22,44)	(22,44)	(18,18)	(11,57)
	41,50 a	74,73 b	42,15 b	0,42 b	14,37 b	20,16 c	42,71 b
ABL 98/11	(1,20)	(21,73)	(28,98)	(28,98)	(28,98)	(25,18)	(11,47)
	43,83 b	60,78 b	61,45 a	0,61 a	20,95 a		35,35 c
ABL CS7	(4,25)	(18,62)	(12,63)	(12,63)	(12,63)	36 a (17,56)	(10,63)
	56,66 c		16,27 c	0,16 c	5,55 c	6,83 d	48,24 a
ABL 16/01	(1,66)	100 a (0)	(25,12)	(25,12)	(25,12)	(17,75)	(12,36)
	43,66 b	61,89 b	46,73 b	0,46 b	15,93 b		
ABL 18/01	(1,70)	(28,17)	(22,14)	(22,14)	(22,14)	22 c (18,92)	43,21 b (3,81)
	45,66 b		50,27 b	0,50 b	17,14 b	34,66 a	29,73 d
ABL 19/01	(1,66)	69,87 b (0)	(25,12)	(25,12)	(25,12)	(17,75)	(12,36)
CV (%)	2,68	19,6	24,7	23,7	24,7	23,2	11
Média geral	68,10	67,52	28,46	0,281	9,55	15,21	34,65

Médias seguidas de linhas distintas entre colunas diferiram pelo teste estatístico de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ^o valor correspondente ao coeficiente de variação relativo (%). DPC: dias para a primeira colheita (dias); PRC: precocidade (%); EFB: eficiência biológica (%); TXP: taxa de produtividade; Prod: Produtividade (%); NC: número de cogumelos (u); MMC: massa média de cogumelos(g).

O rendimento obtido em algumas linhagens nos cultivos 1 e 2 são próximos ao encontrado por Cavalcante e Gomes (2005) ao produzir em ambiente aberto no estado do Ceará-BRA, que foi em média de 6,5%. No Brasil, o estado de São Paulo é um dos maiores produtores de *A. subrufescens* e a média de produção do estado está em torno de 7,5% para ambiente em céu aberto (Braga, 1999; Ferreira, 1998) e pode chegar a 16% em ambientes protegido (Zied et al., 2011). Todas as linhagens do terceiro experimento, com exceção da ABL 16/01, obtiveram valores acima da média para cultivos a campo, permitindo compara-las a valores de produtividade encontrados em ambientes controlados (Zied et al., 2014).

Um aspecto interessante a ser ressaltado é que cogumelos produzidos a campo apresentaram maior massa média do que cultivos em ambiente protegido, conforme os dados encontrados na literatura. Zied et al. (2014) encontraram valores para massa média de cogumelos em torno de 17,61g para a linhagem ABL 04/49 em um experimento avaliando diferentes formulações de composto. Neste trabalho, foram encontrados valores de 30,72g para a mesma linhagem.

A não frutificação do fungo em alguns meses pode ser devido as temperaturas registradas, chegando a máximas acima de 30°C, superior a recomendada pela literatura (Bononi et al., 2001; Braga, 1999;).

Ao se analisar as condições climáticas dos cultivos, observa que a temperatura é uma característica limitante na produção a céu aberto para promover a frutificação. Ao se observar a Figura 02, a temperatura influencia diretamente na produção, sendo que, algumas linhagens podem ser mais adaptadas a frutificar em temperaturas mais altas e outras necessitam de temperaturas mais baixas.

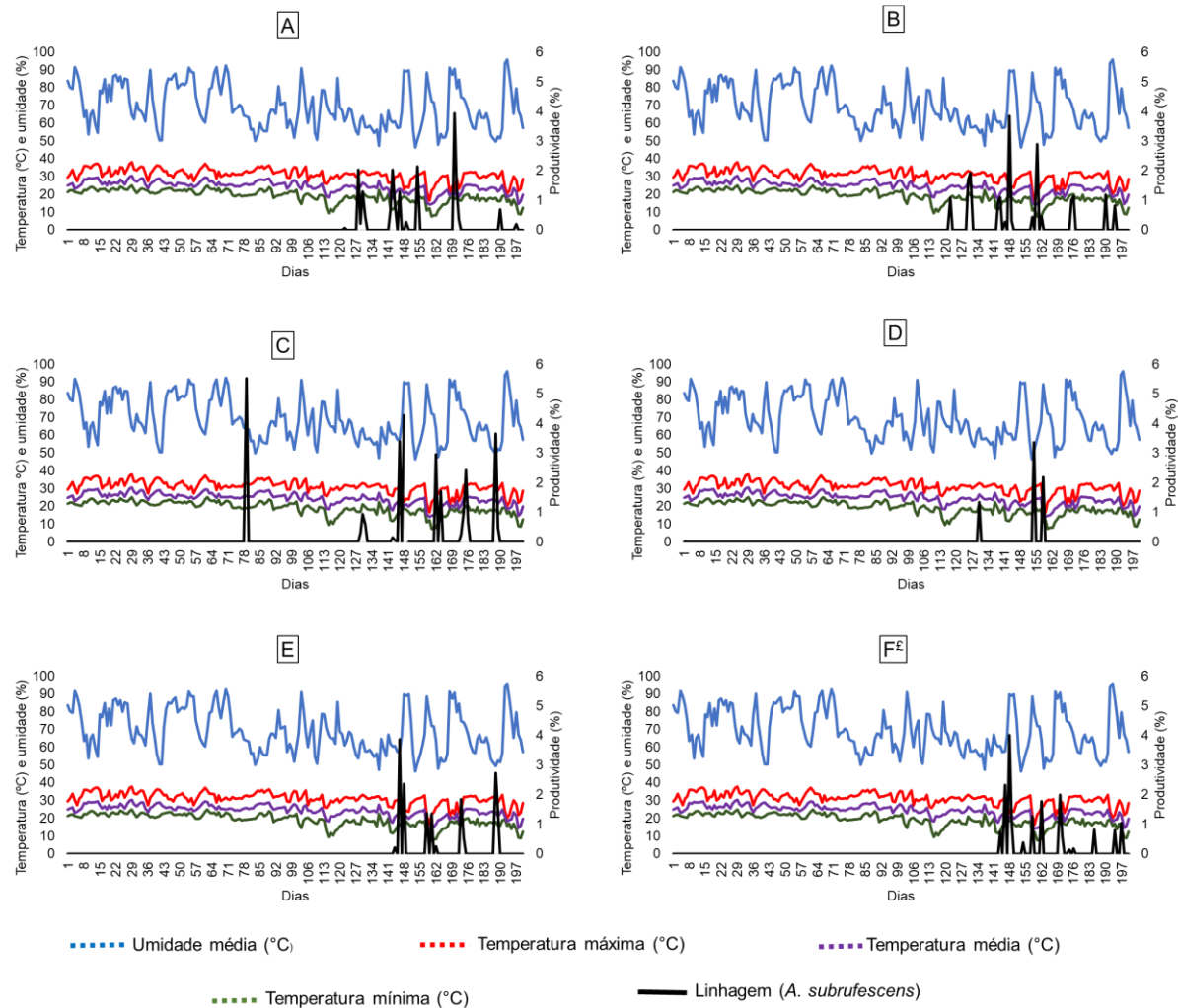


Figura 3: Produtividade (%) de *A. subrufescens* conforme condições climáticas e dias do ano, sendo: A) ABL 04/49, B) ABL 98/11, C) ABL CS7, D) ABL 16/01, E) ABL 18/01 e F) ABL 19/01. Dias 1-79 referente ao cultivo 1, dias 80-136 referente ao cultivo 2 e dias 137-200 referente ao cultivo 3. [£] Dados adquiridos apenas do cultivo 3.

A linhagem ABL CS7 foi a que demonstrou maior aptidão para frutificação em temperaturas mais elevadas, sendo a única a produzir no primeiro experimento, visto que a temperatura média estava em torno de 25°C, máxima em torno de 32°C e mínima em torno de 19,5. As demais linhagens iniciaram a produção apenas a partir da queda brusca da temperatura por um longo período. Isso ocorreu por volta do dia 115, em que foi registrado uma mínima de 9,4°C. Mais tarde, com o aumento da

temperatura para uma média de 20°C, ocorreram as frutificações e, consequentemente, logo após, as colheitas (Figura 3).

Todas as linhagens tiveram os picos de produção em datas próximas, com exceção da linhagem ABL CS7, que foi capaz de produzir no primeiro experimento. Apenas a linhagem ABL 19/01 não foi analisada em todo período, já que foi utilizada apenas no terceiro cultivo.

A literatura mostra que em ambientes protegidos, temperaturas em torno de 20°C são consideradas ótimas para indução de frutificação de *A. subrufescens* (Kopytowski Filho et al., 2008; Minhoni, 2005).

Stamets (2000) afirmou que o verão é ideal para produção em alguns países, estação em que também se concentra a maior parte dos cultivos brasileiros. Porém, na região de condução desse experimento a estação do ano com maior rendimento foi durante o outono e início do inverno (maio, junho e julho).

A umidade relativa do ar não foi considerada um fator limitante por si só, durante os três cultivos, dado que havia irrigação constante durante todo o cultivo. Em geral, a frutificação iniciou-se com a umidade relativa em torno de 50 a 60%, porém nota-se que os maiores picos de colheita das linhagens ABL 04/49 e ABL 16/01 foram registrados após um aumento brusco na umidade média para 90%.

As temperaturas médias mensais do terceiro cultivo foram notoriamente menores do que os meses sem colheita, visto que apresentaram temperatura médias elevadas: dezembro/19 (26,4 °C), janeiro/20 (27,1°C), fevereiro/20 (25,9°C) e março/20 (26,2°C). (Tabela 2 e Figura 4). Esses meses foram considerados impróprios para o cultivo na região onde foi realizado esse trabalho (Dracena, São Paulo). Assim como a temperatura, as chuvas foram inferiores as registradas nos meses improdutivos. A velocidade do vento se mostrou constante durante todos cultivos. A insolação foi superior nos meses produtivos.

Tabela 3: Condições climáticas em diferentes meses do ano na região de Dracena, SP no cultivo de *A. subrufescens*.

Mês	Temperatura (°C)			Umidade relativa do ar (%)			Velocidade do vento (m/s)		Chuva	Insolação
	Média	Máx	Mín	Média	Máx	Mín	Máx	Média	mm	h/dia
dez/19	26,4	33	22	74,2	93	48	6,7	1,4	186,9	1,6
jan/20	27,1	34	22	73,7	93	46	6,9	1,4	160,4	1,6
fev/20	25,9	32	22	79,8	94	53	6,7	1,3	226,1	1,1
mar/20	26,2	33	20	64,8	86	39	6,7	1,5	62,5	2,8
abr/20	24	31	18	64	87	38	6,2	1,3	60,9	2,6
mai/20	20,9	28	15	63,7	85	38	6,1	1,3	27,4	2,9
jun/20	22,4	29	17	69	87	46	6,9	1,7	110	3,4
jul/20	21,9	30	16	58,6	82	32	6,8	1,7	0,3	3,7

A temperatura é apontada como um fator importante no crescimento e frutificação de *A. subrufescens*, o fungo é extremamente sensível a condições fora da faixa ideal, onde temperaturas altas podem diminuir ou inibir os rendimentos e temperaturas baixas podem cessar o aparecimento de primórdios (Mendonça et al., 2005). O mês de maio apresentou temperatura média de 20,9°C e umidade média de 63,7%, sendo estas condições consideradas ideais para a produção da espécie em ambiente aberto.

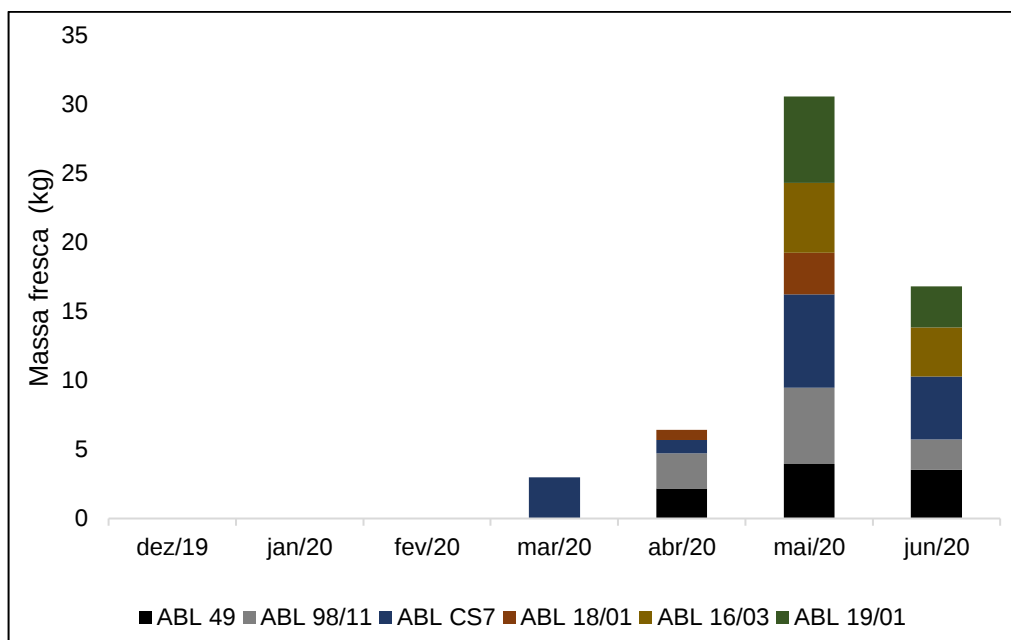


Figura 4: Produtividade em gramas fresca de 6 linhagens de *A. subrufescens*, sendo de dez/19 até mar/20 dados do cultivo 1, abr/20 dados do cultivo 2 e mai/20 e jun/20 dados do cultivo 3.

Em ambientes de céu aberto observa-se que a temperatura está relacionada com a linhagem utilizada. Na maioria dos casos é necessário maior quantidade de dias com temperaturas baixas, já que a temperatura do solo é de certa forma diferente da temperatura do ar, onde a diminuição da temperatura é ocasionada conforme resíduos presentes na superfície que refletem a radiação e isola a superfície do solo (Shinners et al., 1994; Van Wijk et al., 1959). Sendo assim, quanto menor a temperatura, mais rápido o solo perderá temperatura para o ar, o que é de suma importância para o estresse do fungo e, consequentemente, provocar a frutificação.

O cultivo em ambiente aberto possui menor custo de instalação e como esse trabalho apresentou, pode ser possível obter produtividades próximas às encontradas em ambiente protegido, porém cabe ressaltar que há a limitação do período a ser conduzido, já que como observado na maioria dos meses do ano é inviável a produção.

4. CONCLUSÃO

A escolha das linhagens e época são os principais fatores que devem ser considerados antes do início do cultivo de *Agaricus subrufescens* a céu aberto. A produção em ambiente aberto na região de Dracena, SP pode obter valores de produtividade próximos aos encontrados em ambientes controlados, porém é restrito a meses com baixas temperaturas (maio e junho), tornando o cultivo inviável nos outros meses estudados (dezembro, janeiro, fevereiro, março e abril). A linhagem ABL CS7 obteve os melhores resultados, sendo a única a frutificar em todos cultivos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bononi V, Okino L, Tanaka J, Capelari M (2001) Cultivo de *Agaricus blazei* Murrill: o cogumelo do sol. São Paulo: INSTITUTO DE BOTÂNICA, 20p.

Braga GC (1999) **Produtividade de *Agaricus blazei* Murril em função do ambiente de cultivo, massa do substrato e camada de cobertura.** 83 f. Tese de doutorado (doutorado em Agronomia (Energia na Agricultura)) – Unesp, Botucatu.

Cavalcante JLR, Gomes VFF (2005) Cultivo do *Agaricus blazei* (Murrill) no Estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica** 36:255–261.

Cavalcante JLR, Gomes VFF, Kopytowski Filho J, Minhoni MTA, Andrade MCN (2008) Cultivation of *Agaricus blazei* in the environmental protection area of the Baturité region under three types of casing soils. **Acta Scientiarum. Agronomy** 30:513–517.

Chang ST, Wasser SP (2012) The Role of Culinary-Medicinal Mushrooms on Human Welfare with a Pyramid Model for Human Health. **International Journal of Medicinal Mushrooms** 14:95-134.

Eira AF (2003) Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murrill) ss. *Heineman*. Aprenda Fácil, Viçosa, MG.

Ferreira DF (2014) Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia** 38:109–112.

Ferreira JEF (1998) **Produção de cogumelos.** Guaíba: Agropecuária LTDA, 137p.

Gargano ML, Griensven LJLD, Isikhuemhen OS, Lindequist U, Venturella G, Wasser SP, Zervakis GI (2017) Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology** 151:548–565.

Jumes FMDJMD, Lugarini DL, Bastos-Pereira ALBPL, Oliveira AO, Christoff AOCO, Linde GALA, doValle JSVS, Colauto NBCB, Acco AA (2010) Effects of *Agaricus brasiliensis* mushroom in Walker-256 tumor-bearing rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** 88:21-27.

Kopytowski Filho J, Minihoni MTA, Andrade MCN, Zied DC (2008) Effect of compost supplementation (soybean meal and Champfood) at different phases (spawning and before casing) on productivity of *Agaricus blazei* ss. *Mush Sci* 17:260–270.

Largeteau ML, Llerena-Hernández RC, Regnault-Roger C, Savoie JM (2011) The medicinal *Agaricus* mushroom cultivated in Brazil: biology, cultivation and non-medicinal valorisation. **Applied Microbiology and Biotechnology** 92:897–907.

Mendonça M, Kasuya MC, Cadorin A, Vieira AJ (2005) *Agaricus blazei* cultivation for a living in Brazil. SHIITAKE cultivation. Seoul: MushWorld 246–257.

Minihoni MTA (2005) **Cultivo de *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann**. Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais.

Oliveira MA, Donega MA, Peralta RM, Souza CGM (2007) Produção de inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet - CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. **Food Science and Technology** 27:84–87.

Pardo-Giménez A, Zied DC, Pardo-González JE (2010) Utilización de compost agotado de champiñón como capa de coberturas en nuevos ciclos de producción. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 45:1164–1171.

Scott AJ, Knott M (1974) A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics** 30:507–512.

Shinners KJ, Nelson WS, Wang R (1994) Effects of residue-free band width on soil temperature and water content. **Transactions of the ASAE (USA)** 37:39-49.

Stamets P 2000: Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press, 350p.

Taofiq O, Fernandes Â, Barros L, Barreiro MF, Ferreira ICFR (2017) UV-irradiated mushrooms as a source of vitamin D₂: A review. **Trends in Food Science & Technology** 70:82–94.

Van Wijk WR, Larson WE, Burrows WC (1959) Soil temperature and the early growth of corn from mulched and unmulched soil. **Soil Science Society of America Journal** 23:428–434.

Zied DC, Caitano CEC, Pardo-Gimenez A, Dias ES, Zeraik ML, Pardo JE (2018) Using of Appropriated Strains in the Practice of Compost Supplementation for *Agaricus subrufescens* Production. **Frontiers in Sustainable Food Systems** 2:26

Zied DC, González JEP, Dias ES, Pardo-Giménez A (2017) Characteristics, Production, and Marketing of the Sun Mushroom: The New Medicinal Cultivated Mushroom. In.: Zied DC, Pardo- Giménez A (Eds.) **Edible and Medicinal Mushrooms**. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 361–384.

Zied DC, Minhoni MTA (2009) Influência do ambiente de cultivo na produção do cogumelo *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*). **Energia na Agricultura** 24:17–36.

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, Minhoni MTA, Kopytowski-Filho J, Barbosa L, Andrade MCN (2011) Medicinal mushroom growth as affected by non-axenic casing soil. **Pedosphere**, 21:146-153.

Zied DC, Pardo Giménez A, Pardo González JE, Dias ES, Carvalho MA, Minhoni, MTA (2014) Effect of Cultivation Practices on the β -Glucan Content of *Agaricus subrufescens* Basidiocarps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 62:41–49.

CAPITULO 4 – Rendimento de diferentes linhagens de *Agaricus subrufescens* cultivadas em ambiente controlado

RESUMO – Mesmo após grandes melhorias no processo de cultivo de *Agaricus subrufescens* sua produção ainda é referenciada como um grande desafio, sendo o principal empecilho o longo período de cultivo que pode chegar a 120 dias. Neste sentido, estudos que abordem melhorias, como a escolha do ambiente de cultivo e linhagem a ser utilizada, são fundamentais para melhorias no rendimento da espécie. Sendo assim o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial agrônomo de linhagens de *Agaricus subrufescens*, cultivadas em um ambiente totalmente controlado. Foram instalados dois experimentos (duplicata), cultivados durante 77 dias, de modo que, o primeiro dia consistiu da inoculação do composto, seguido da incubação, adição de camada de cobertura e colheita. Ao final, foram avaliados quanto aos dias necessários para primeira colheita (dias), precocidade (%), eficiência biológica (%), taxa de produtividade, produtividade (%), números de cogumelos (u) e massa média de cogumelos (g). As linhagens se comportaram de forma distinta em todos parâmetros avaliados. As linhagens ABL 98/11 e ABL 49 tiveram a maior produtividade no primeiro cultivo, 11,49% e 12,16% respectivamente, sendo também as mais precoces e, juntamente com a ABL CS7, foram as que necessitaram menor quantidade de dias para primeira colheita. No segundo cultivo, a linhagem ABL 19/01 foi a mais produtiva com 21,69%. Em dias para primeira colheita e precocidade, a linhagem ABL 16/01 demandou mais dias para a colheita, sendo as demais estatisticamente iguais. Foi possível diminuir em até 40 dias o tempo de cultivo (em comparação a outros experimentos) sem abrir mão dos rendimentos, através do uso de ambiente totalmente controlado. Diferentes linhagens podem se comportar de forma variada em condições de cultivo totalmente controlado, sendo que linhagens aqui estudadas (ABL 04/49, ABL 18/01 e ABL 19/01), possuem grande potencial para cultivo comercial.

Palavras-chave: Cogumelo medicinal, Condições cultivo, Cultivo protegido, Produção cogumelos

CHAPTER 4 – Productivity of different strains of *Agaricus subrufescens* in a controlled environment

ABSTRACT - Even after major improvements in the cultivation process of *Agaricus subrufescens*, its production is still referred to as a major challenge, the main obstacle being the long cultivation period that can reach 120 days. In this sense, studies that address improvements, such as the choice of the cultivation environment and lineage to be used, are fundamental for improvements in the species' yield. Thus, the present work aimed to evaluate the agronomic potential of strains of *Agaricus subrufescens*, cultivated in a fully controlled environment. Two experiments (duplicate) were installed, cultivated for 77 days, so that, the first day consisted of the inoculation of the compound, followed by incubation, addition of cover layer and harvest. At the end, they were evaluated regarding the days required for the first harvest (days), precocity (%), biological efficiency (%), productivity rate, productivity (%), numbers of mushrooms (u) and average mass of mushrooms (g) . The strains behaved differently in all evaluated parameters. The strains ABL 98/11 and ABL 49 had the highest productivity in the first cultivation, 11.49% and 12.16% respectively, being also the earliest and, together with ABL CS7, were the ones that needed the least amount of days to first harvest. In the second crop, the ABL 19/01 strain was the most productive with 21.69%. In days for first harvest and precocity, the line ABL 16/01 demanded more days for the harvest, the others being statistically equal. It was possible to decrease the cultivation time by up to 40 days (compared to other experiments) without giving up the yields, through the use of a fully controlled environment. Different strains can behave in different ways under fully controlled cultivation conditions, and strains studied here (ABL 04/49, ABL 18/01 and ABL 19/01), have great potential for commercial cultivation.

Keywords: Medicinal mushroom, Cultivation conditions, Protected cultivation, Mushroom production

1. INTRODUÇÃO

A produção e comercialização de cogumelos tem crescido nas últimas décadas por conta da sua ampla utilização na fabricação de diversos produtos, como alimentícios, nutracêuticos e cosmecêuticos (Chen et al., 2018; Ferreira et al., 2015; Taofiq et al., 2016).

O *Agaricus subrufescens* é um cogumelo medicinal de origem brasileira, o que facilita seu cultivo em climas tropicais e pode ser uma excelente alternativa de renda ao pequeno produtor (Firenzuoli et al. 2008). O Brasil já foi considerado como o maior produtor dessa espécie (Dias et al., 2004; Mendonça et al., 2005) e nos dias de hoje é o único país das Américas que ainda possui produtores desta espécie (Sánchez et al., 2018).

Os cultivos em ambiente protegido tem sido maioria na produção de *A. subrufescens*. Isso ocorre devido a possibilidade de até 3 cultivos durante o ano, sendo cada cultivo conduzido por aproximadamente 110 dias (Zied et al., 2010). Porém, ambientes que não tenham controle de temperatura estão expostos a condições climáticas do ambiente, as quais podem levar a redução no rendimento. Zied et al. (2014) mostraram que a condições do cultivo é o principal determinante da produtividade, afetando em 82,1%.

Nesse sentido a utilização de câmaras climáticas com controle de temperatura e umidade pode ser uma ferramenta eficaz para promover a otimização do processo de cultivo. Sua utilização já é comum para produção de algumas espécies de cogumelos (Xiong et al., 2019; Girmay et al., 2016; Moraes et al., 2014), sendo esse método, caracterizado como um alto nível tecnológico, atuando na diminuição dos riscos de baixo rendimento por conta de condições climáticas, além de proporcionar um cultivo com menor números de pragas e doenças (Martos et al., 2017), devido a possibilidade de pasteurização do ambiente antes do início do cultivo ou ao final.

Assim como o ambiente de cultivo, a escolha das linhagens a serem utilizadas são de suma importância para um alto rendimento no cultivo (Zied et al., 2014), podendo apresentar morfologia, rendimento e coloração distintas (Zied et al., 2017a,

2017b). Devido a exigência do mercado por cogumelos padronizados, estudos que visem a caracterização e análise dos rendimentos agrônômicos das linhagens utilizadas comercialmente, são extrema importância.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características agrônômicas de diferentes linhagens de *Agaricus subrufescens*, cultivadas em câmaras climáticas com um alto nível tecnológico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Centro de Estudo em Cogumelos (CECOG) da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT/UNESP), utilizando um delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial simples, composto por 6 linhagens de *A. subrufescens* e 9 repetições por linhagens. Vale ressaltar que o experimento foi realizado em duplicata. Para o primeiro experimento foram utilizadas as seguintes linhagens: ABL 04/49, ABL 98/11, ABL CS7, ABL 16/01, ABL 18/01 e ABL 03/44. Para o segundo experimento, a linhagem ABL 03/44 foi substituída pela linhagem ABL 19/01, pois não se obteve a frutificação da referida linhagem. Os dois cultivos foram mantidos por 77 dias, contando do dia da inoculação até o término do quarto fluxo de cultivo.

2.1. INÓCULO

O inóculo foi preparado através de matriz primária, secundária, terciária e inóculo, conforme metodologia proposta por Zied et al. (2010). Utilizou-se, então sementes de sorgo cozidas e acrescidas de 2% de calcita conforme seu peso úmido, para preparo da matriz terciária e inóculo.

2.2. COMPOSTO

O composto foi preparado através do método de compostagem tradicional, constituído por 2 fases, sendo: i) com 7 dias de pré-umedecimento e 19 dias de fermentação, realizando a viragem a cada 4 dias; ii) o composto foi pasteurizado por 8 horas a $59 \pm 1^\circ\text{C}$ e condicionado por 8 dias a $47 \pm 2^\circ\text{C}$. A formulação foi à base de braquiária, bagaço de cana, ureia, sulfato de amônia, calcário e gesso, com uma relação C/N em torno de 20/1. A composição química dos compostos está presente na Tabela 1.

Tabela 1: Composição química de composto para produção de *A. subrufescens*, sendo o composto A e B para os cultivos 1 e 2 respectivamente

Composto*	%									mg kg ⁻¹ matéria seca						
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	S	MO	C		Na	Cu	Fe	Mn	Zn	C/N	pH
A	1,85	0,29	3,16	0,47	0,08	1,02	73	41		3456	220	2109	254	228	22:1	7,5
B	2,2	1,38	3,46	6,6	0,66	1,68	68	39		3846	181	1095	190	239	17:1	7,2

*composto A utilizado no primeiro experimento e composto B utilizado no segundo experimento.

Após o processo de pasteurização, 9kg do composto foram dispostos em caixas plásticas e misturados com 90g (1%) de inóculo. As caixas com composto foram então incubadas em média 20 dias (até que houvesse a total colonização do substrato) em uma temperatura de $28^\circ\text{C} \pm 1$ e umidade em torno de $80 \pm 5\%$ na ausência de luz. Após a total colonização do composto, foi adicionado uma camada de 4cm de turfa de musgo.

2.3. CAMADA DE COBERTURA

Optou-se por utilizar turfa de musgos por sua capacidade de proporcionar maior capacidade de retenção de água e porosidade e menor compactação, permitindo assim as trocas gasosas entre o substrato e o ambiente. Além do que, juntamente com a câmara climática, esse método de produção é definido pelo seu alto nível tecnológico, que proporciona o controle dos fluxos de colheita e a indução de primórdios (Figura 01).

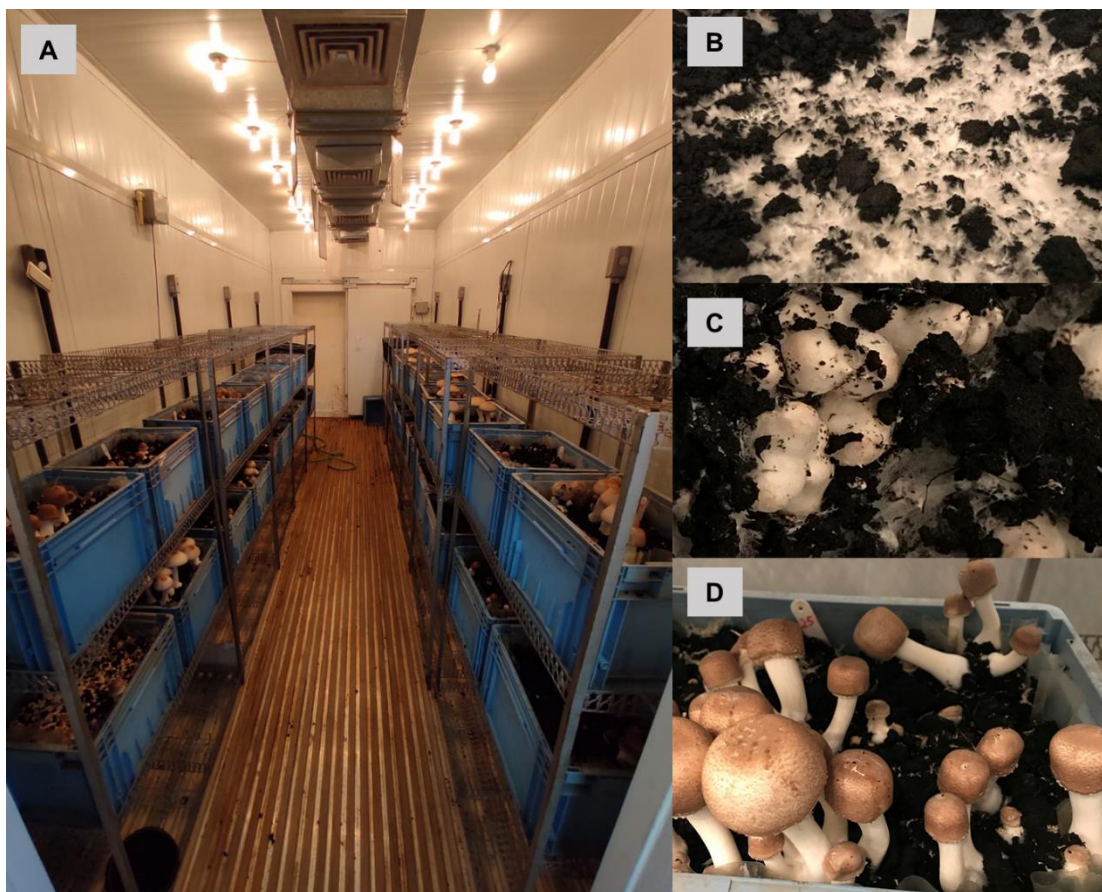


Figura 1: Cultivo em câmara climática, onde A) câmara climática específica para a produção de cogumelos; B) micélio se desenvolvendo em camada de cobertura a base de turfa de musgo; C) formação de primórdios; e D) cogumelos em fase colheita.

2.4. INDUÇÃO DE PRIMÓRDIOS E COLHEITA

A indução de primórdios aconteceu diminuindo a temperatura para 20°C e em seguida aumentando para 28°C. Foram necessários 7 dias para cada indução, já que a variação de temperatura foi realizada a 2°C por dia. A colheita foi manual, ainda com os cogumelos de píleo fechado, sem o rompimento do véu.

2.5. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

Os cogumelos colhidos foram contados e pesados para a avaliação de: dias para a primeira colheita (dias entre a inoculação até a primeira colheita), precocidade (rendimento na primeira metade do tempo total de colheita / rendimento no tempo total de colheita x 100, expresso em porcentagem), eficiência biológica (peso fresco de cogumelos/peso seco do substrato inicial x 100, expresso em porcentagem), taxa de produtividade (eficiência biológica / tempo em dias requeridos para a colheita), produtividade (massa fresca dos cogumelos (g)/peso do substrato inicial úmido (g) x 100, expresso em porcentagem), número de cogumelos (contagem manual, expresso em unidades) e massa de basidiomas (massa fresca dos cogumelos/número de cogumelos, expresso em gramas) (Oliveira et al., 2007; Pardo-Giménez et al., 2010; Zied et al., 2010).

2.6. ANÁLISE DE DADOS

Depois da obtenção dos dados, os mesmos foram submetidos à análise de variância com delineamento inteiramente casualizado. Posteriormente, foram comparadas as médias pelo teste de Scott-Knott a 5% (Scott and Knott, 1974; Snedecor and Cochran, 1972). Foi utilizado o software SISVAR 4.2, desenvolvido pelo

Departamento de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, BRASIL (Ferreira, 2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se que no primeiro cultivo as linhagens ABL 49, ABL 98/11 e ABL CS7 necessitaram de, em média, 40 dias após a inoculação para a primeira colheita, sendo estas as que apresentaram os menores valores para dias necessários para primeira colheita. A linhagem ABL 16/01 necessitou de, em média, 48 dias para a primeira colheita. Assim como uma colheita mais antecipada, as linhagens ABL 49 e ABL 98/11 foram classificadas como linhagens precoces, por apresentarem maior parte da produtividade na primeira parte do período total de colheita, sendo distintas das linhagens ABL CS7 e ABL 16/01 que tiveram a maior parte da colheita na segunda metade do período de colheita, assim sendo classificadas como tardias (Tabela 02).

Ao se analisar eficiência biológica, taxa de produtividade e produtividade, as linhagens ABL 49 e ABL 98/11 demonstraram maiores rendimentos, com uma média de produtividade de 12,16% e 11,49% respectivamente. As linhagens ABL CS7 e ABL 16/01 tiveram menores valores, sendo diferentes das demais linhagens, com uma produtividade de 8,78% e 7,86% respectivamente.

Em questão de números de cogumelos, a linhagem ABL 16/01 e ABL 04/49 foram as que apresentaram maiores valores, seguidas das demais que obtiveram as médias estatisticamente iguais. A linhagem ABL CS7 e ABL 98/11 foram as que obtiveram cogumelos com maior massa em comparação as outras linhagens, que tiveram médias estatisticamente iguais. As linhagens ABL 16/03 e ABL 03/44 não frutificaram no período de avaliação do cultivo, e por tanto não puderam ser avaliadas (Tabela 02).

No segundo cultivo as linhagens ABL 04/49, ABL 98/11 e ABL CS7 também demandaram em torno de 40 dias para a primeira colheita, a demais linhagens foram estatisticamente iguais, com exceção da linhagem ABL 16/01 que assim como o cultivo anterior, necessitou de mais dias para a primeira colheita em relação as

restantes. Ao se avaliar a precocidade, as linhagens ABL 04/49 e ABL 98/11 foram classificadas como precoces e as restantes como tardias, porém estatisticamente as linhagens não se diferenciam, com exceção da linhagem ABL 16/01, que teve a menor parte da produtividade na primeira metade do cultivo (Tabela 02).

A linhagem ABL 19/01 obteve o maior rendimento em comparações as demais, com uma produtividade de 21,69%. A linhagem ABL 16/01 apresentou o menor rendimento com produtividade de 2,24%. Essa ordem também se aplica as análises de eficiência biológica e taxa de produtividade, já que são variáveis dependentes da produtividade. Em questão de números de cogumelos, a linhagem ABL 19/01 apresentou a maior quantidade de basidiocarpos (54,66) e as linhagens ABL 16/01 e ABL 98/11 os menores valores, sendo 7,66 e 10,69 respectivamente. Assim, a linhagem ABL 98/11 apresentou cogumelos com maior massa em comparação as demais, e a linhagens ABL 19/01 e ABL 16/01 tiveram cogumelos com menor massa (Tabela 02).

Tabela 2: Desempenho agrônômico de linhagens de *Agaricus subrufescens* em cultivo protegido com alto nível tecnológico.

Linhagens	DPC						
	(dias)	PRC (%)	EFB (%)	TXP	PROD (%)	NC (u)	MMC (g)
Cultivo 01							
ABL 04/49	41 a (1,40) ^ε	68,12 a (22,40)	39,05 a (17,28)	0,51 a (17,28)	12,16 a (17,28)	19,16 a (11,03)	23,36 b (8,75)
ABL 98/11	39 a (1,48)	62,95 a (16,82)	36,90 a (21,40)	0,476 a (21,40)	11,49 a (21,40)	11,66 b (13,70)	36,22 a (13,67)
ABL CS7	40,83 a (1,68)	45,06 b (25,54)	28,19 b (16,32)	0,366 b (16,32)	8,78 b (16,32)	10,66 b (31,86)	32,87 a (25,93)
ABL 16/01	48,16 b (21,18)	43,22 b (41,47)	25,25 b (33,34)	0,326 b (33,34)	7,86 b (33,34)	15 a (33,33)	19,45 b (8,7)
CV(%)	13,3	28,23	23,95	24,12	23,95	25,6	19,99
Cultivo 2							
ABL 04/49	36,83 a (2,89)	58,92 a (27,71)	47,53 b (10,30)	0,617 b (10,30)	16,20 b (10,30)	23,00 b (17,92)	43,27 b (15,14)
ABL 98/11	35 a (2,33)	58,13 a (16,66)	31,34 c (21,34)	0,407 c (21,34)	10,69 c (21,34)	10,66 c (28,98)	66,62 a (41,06)
ABL CS7	40,50 a (12,81)	49,39 a (63,33)	33,02 c (26,98)	0,428 c (26,98)	11,26 c (26,98)	18,66 b (22,44)	36,31 b (14,02)
ABL 16/01	63,16 b (14,57)	11,92 b (223,6)	6,57 d (87,56)	0,085 d (87,56)	2,24 d (87,56)	7,66 c (75,93)	17,30 c (34,55)
ABL 18/01	38,50 a (2,90)	37,61 a (40,15)	50,82 b (21,95)	0,66 b (21,95)	17,33 b (21,95)	26,16 b (30,12)	41,21 b (16,40)
ABL 19/01	37,60 b (2,03)	44,55 a (10,86)	63,60 a (19,43)	0,82 a (19,43)	21,69 a (19,43)	54,66 a (10,38)	23,76 c (15,61)
CV (%)	11,46	49,41	24,67	24,67	24,66	25,01	35,48
Média geral	42,06	47,99	36,23	0,470	11,97	19,73	34,04

Médias com letras distintas entre linhas, dentro de cada cultivo, diferiram estatisticamente no teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ^εCoeficiente de variação relativo (%). DPC: dias para a primeira colheita (dias); PRC: precocidade (%); EFB: eficiência biológica (%); TXP: taxa de produtividade; Prod: Produtividade (%); NC: número de cogumelos (u); MMC: massa média de cogumelos(g).

Avaliando o comportamento das linhagens utilizadas, é possível observar que ABL 04/49, ABL 98/11 e ABL CS7 apresentam valores próximos nos dois cultivos em todos parâmetros avaliados. A linhagem ABL 16/01 demonstrou inconstância, com rendimento muito inferior no segundo cultivo em comparação ao primeiro, sendo que, apenas massa média de cogumelos permaneceu próximo aos valores observados no primeiro experimento. Sendo assim, assume-se que algum fator influenciou negativamente a linhagem, levando a uma alta variação entre os cultivos. A confiabilidade dos dados obtidos no segundo cultivo para essa linhagem é relativamente baixa (desvio padrão relativo e coeficiente de variação) não sendo fatores predominantes nas outras linhagens (Tabela 02).

Os dados aqui apresentados são similares aos encontrados na literatura para o cultivo de *A. subrufescens* em ambientes protegidos, que variam entre 10-20% ao longo de 120 dias de colheita (Colauto et al., 2010; Minhoni, 2005; Quan et al., 2010; Siqueira et al., 2009; Zied et al., 2010), porém tiveram em torno de 40 dias a menos, o que pode possibilitar até 4 cultivos ao ano. Essa otimização se deu devido ao maior controle dos fluxos, atingido pela utilização de câmaras com total controle dos fatores climáticos.

Os dois cultivos realizados nesse trabalho duraram 77 dias cada um, sendo esse período considerado da inoculação até o final do quarto fluxo de produção. Alguns autores relataram cultivos mais extensos, com média de 120 dias (Wang et al., 2013; Zied et al., 2010, 2011), porém o cultivo curto é defendido por alguns pesquisadores devido à queda de produtividade nos outros fluxos (além de 4 fluxos) e também pelo incremento no custo energético e de mão de obra com um baixo rendimento. Além do que, quanto mais antigo o cultivo, maiores são as chances de desenvolvimentos de doenças (Dias et al., 2013; Wang et al., 2008). Por outro lado, outros autores levam em consideração os custos necessários para implementação de um novo cultivo, como a formulação de um novo substrato, compostagem, mão de obra, matéria prima, eletricidade, descarte, camada de cobertura (Wang et al., 2013).

É possível observar que algumas linhagens possuem maior capacidade de produtividade do que as demais, além do que, podem ter uma variação na quantidade e massa de basidiocarpos (González Matute et al., 2011; Zied et al., 2014). A massa

média de cogumelos aqui encontradas foram, em sua maioria, próximas às encontradas por Andrade et al. (2007), variando entre 23,6 – 26,5g, sendo que, algumas linhagens ficaram mais próximas aos resultados encontrados por Cavalcante et al. (2008), onde os autores encontraram médias que variam de 57,1 a 72,3g. É do conhecimento científico que as linhagens se comportem de forma diferente em um determinado ambiente de cultivo devido ao fator da variabilidade genética (Neves et al., 2005). Essa variabilidade surgiu devido a condições de cultivos e por melhoramento por laboratórios ou produtores (Largeteau et al., 2011).

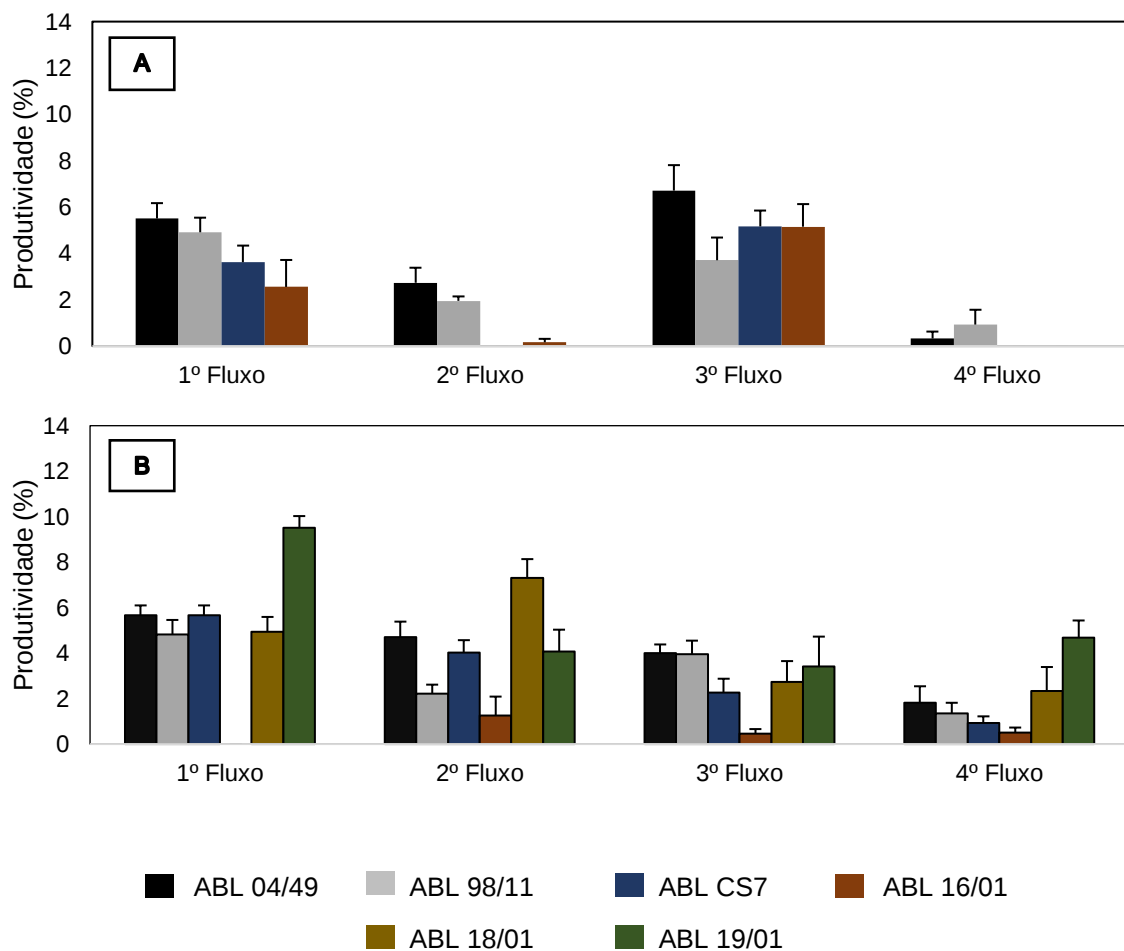


Figura 2: Produtividade de diferentes linhagens de *A. subrufescens* conforme fluxos de cultivo, sendo: A – cultivo 1 e B – cultivo 2.

Na precocidade é possível observar uma leve diferença entre os dois cultivos realizados, porém a maioria se mostrou constante quanto a essa variável (Tabela 2 e Figura 2). É possível que a precocidade seja afetada por vários fatores, dentre eles o ambiente de cultivo, pela camada de cobertura, formulação do substrato, as técnicas de cultivo utilizadas e o grau de tecnologia aplicado (Pardo et al., 2003; Stoller, 1952).

De modo geral, o rendimento das linhagens no último fluxo é inferior aos demais fluxos, sendo possível supor que cultivos com mais de 4 fluxos podem ser inviáveis. No primeiro cultivo, apenas a linhagem ABL 98/11 teve o maior rendimento no primeiro fluxo, as demais tiveram no terceiro fluxo. No segundo cultivo, a linhagem ABL 04/49, ABL CS7, ABL 98/11 e ABL 19/01 tiveram a maior produtividade no primeiro fluxo e as demais no segundo fluxo (Figura 2).

4. CONCLUSÃO

O cultivo em câmaras climáticas com total controle das condições climáticas favorece de forma positiva o rendimento e qualidade dos cogumelos, além disso, reduz o tempo de cultivo em até 40 dias, em comparações aos demais métodos. A escolha da linhagem é fundamental para altos rendimentos, as linhagens ABL 04/49, ABL 98/11 e ABL 19/01 foram consideradas promissoras para cultivo em ambiente totalmente controlado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade MCN, Kopytowski Filho J, Minhoni MTA, Coutinho LN, Figueiredo MB (2007) 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** 38:243–247.

Cavalcante JLR, Gomes VFF, Kopytowski Filho J, Minhoni MTA, Andrade MCN (2008) Cultivation of *Agaricus blazei* in the environmental protection area of the Baturité region under three types of casing soils. **Acta Scientiarum. Agronomy** 30:513–517.

Dias ES, Zied DC, Rinker DL (2013) Physiologic response of *Agaricus subrufescens* using different casing materials and practices applied in the cultivation of *Agaricus bisporus*. **Fungal Biology** 117:569–575.

Ferreira DF (2014) Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia** 38:109–112.

Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G (2008) The medicinal mushroom *Agaricus blazei* murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 5:3–15.

Girmay Z, Gorems W, Birhanu G, Zewdie S (2016) Growth and yield performance of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kumm (oyster mushroom) on different substrates. **Amb Express** 6:87.

Gobi VV, Rajasankar S, Ramkumar M, Dhanalakshmi C, Manivasagam T, Thenmozhi, AJ, Essa MM, Chidambaram R (2018) *Agaricus blazei* extract attenuates rotenone-induced apoptosis through its mitochondrial protective and antioxidant properties in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Nutritional Neuroscience** 21:97–107.

González Matute R, Figlas D, Curvetto N (2011) *Agaricus blazei* production on non-composted substrates based on sunflower seed hulls and spent oyster mushroom substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 27:1331–1339.

Kerrigan RW (2005) *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia** 97, 12–24.

Largeteau ML, Llerena-Hernández RC, Regnault-Roger C, Savoie JM (2011) The medicinal *Agaricus* mushroom cultivated in Brazil: biology, cultivation and non-medicinal valorisation. **Applied Microbiology and Biotechnology** 92:897–907.

Lee JS, Oka K, Watanabe O, Hara H, Ishizuka S (2011) Immunomodulatory effect of mushrooms on cytotoxic activity and cytokine production of intestinal lamina propria leukocytes does not necessarily depend on β -glucan contents. **Food Chemistry** 126:1521–1526.

Martos ET, Zied DC, Junqueira PPG, Rinker DL, Silva R, Toledo RCC, Dias ES (2017) Casing layer and effect of primordia induction in the production of *Agaricus subrufescens* mushroom. **Agriculture and Natural Resources** 51:231–234.

Moraes JCFB, Rolim LN, Sales-Campos C (2014) Produtividade e Avaliação Bioquímica de Cogumelos Comestíveis Desenvolvidos pela Técnica de Cultivo Jun-Cao. In III Congresso de Iniciação Científica do INPA-CONIC.

Neves MA, Kasuya MCM, Araujo EF, Leite CL, Camellini CM, Ribas LCC, Mendonca MM (2005) Physiological and Genetic Variability of Commercial Isolates of Culinary-Medicinal Mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (Agaricomycetideae) Cultivated in Brazil. **International Journal of Medicinal Mushrooms** 7:553-564.

Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T (2001) Antitumor β -glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 24:820–828.

Oliveira MA, Donega MA, Peralta RM, Souza CGM (2007) Produção de inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet - CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 27:84–87.

Papaspyridi LM, Katapodis P, Gonou-Zagou Z, Kapsanaki-Gotsi E, Christakopoulos P (2011) Growth and biomass production with enhanced β -glucan and dietary fibre contents of *Ganoderma australe* ATHUM 4345 in a batch-stirred tank bioreactor. **Engineering in Life Sciences** 11:65–74.

Pardo A, Juan JA, Pardo JE (2003) Performance of composted vine shoots as a peat alternative in casing materials for mushroom cultivation. **Journal of Food, Agriculture and Environment** 1:209–214.

Pardo-Giménez A, Pardo JE, Dias ES, Rinker DL, Caitano CEC, Zied DC (2020) Optimization of cultivation techniques improves the agronomic behavior of *Agaricus subrufescens*. **Scientific Reports** 10, 8154.

Pardo-Giménez A, Zied DC, Pardo-González JE (2010) Utilización de compost agotado de champiñón como capa de coberturas en nuevos ciclos de producción. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 45:1164–1171.

Sánchez EJ, Zied DC, Alberto E (2018) Edible mushroom production in the Americas, in 9th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. WSMBMP, Shanghai, China, pp. 2–11.

Scott AJ, Knott M (1974) A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics** 30:507–512.

Snedecor GW, Cochran WG (1972) Statistical method 6th. The Iowa State University Press, Ames., Iowa USA.

Stoller BB (1952) Studies on the function of the casing for mushroom beds. Part II. Some chemical and physical characteristics of the casing soil and their effect on fructification. **MGA Bull** 35:321–326.

Wang H, Fu Z, Han C (2013) The Medicinal Values of Culinary-Medicinal Royal Sun Mushroom (*Agaricus blazei* Murrill). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2013:ID842619.

Wang JC, Ho WJ, Wu CY (2008) Heavy Metal Contents of the Cultivated Culinary-Medicinal Royal Sun Agaricus (the Himematsutake Mushroom) *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (Agaricomycetideae) Using Different Casing Materials. **International Journal of Medicinal Mushrooms** 10:181-188.

Wang JT, Wang Q, Han JR (2013) Yield, polysaccharides content and antioxidant properties of the mushroom *Agaricus subrufescens* produced on different substrates based on selected agricultural wastes. **Scientia Horticulturae** 157:84–89.

Win TT, Ohga S, (2018) Study on the Cultivation of *Agaricus blazei* (Almond Mushroom) Grown on Compost Mixed with Selected Agro-Residues. **Advances in Microbiology** 8:778–789.

Wisitrassameewong K, Karunarathna SC, Thongklang N, Zhao R, Callac P, Moukha S, Férandon C, Chukeatirote E, Hyde KD (2012) *Agaricus subrufescens*: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences** 19:131–146.

Xiong S, Martín C, Eilertsen L, Wei M, Myronycheva O, Larsson SH, Jönsson LJ (2019) Energy-efficient substrate pasteurisation for combined production of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) and bioethanol. **Bioresource technology** 274:65-72.

Zied DC, González JEP, Dias ES, Pardo-Giménez A (2017a) Characteristics, Production, and Marketing of the Sun Mushroom: The New Medicinal Cultivated Mushroom, in: Edible and Medicinal Mushrooms. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 361–384.

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, Minhoni MTA, Kopytowski-filho J, Barbosa L, Andrade MCN (2011) Medicinal Mushroom Growth as Affected by Non-Axenic Casing Soil. **Pedosphere** 21:146–153.

Zied DC, Pardo Giménez A, Pardo González JE, Souza Dias E, Carvalho MA, Minhoni MTA (2014) Effect of Cultivation Practices on the β -Glucan Content of *Agaricus subrufescens* Basidiocarps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 62:41–49.

Zied DC, Pardo JE, Tomaz RS, Miasaki CT, Pardo-Giménez A (2017b) Mycochemical Characterization of *Agaricus subrufescens* considering Their Morphological and Physiological Stage of Maturity on the Traceability Process. **BioMed Research International** 2017:ID2713742.

Zou X (2006) Fed-batch fermentation for hyperproduction of polysaccharide and ergosterol by medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis*. **Process Biochemistry** 41:970–974.