**TAXONOMIA, VARIABILIDADE, PATOGENICIDADE E
CONTROLE DE *Verticillium* em *Agaricus bisporus* (Lange)Singer**

LEILA NAKATI COUTINHO
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz, da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia, área de concentração:
Microbiologia Agrícola.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo- Brasil
Setembro - 1994

Aos meus pais,
dedico

AGRADECIMENTOS

Nossos sinceros agradecimentos

À ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ", que possibilitou nossa participação no curso de Pós graduação e realização desta Dissertação.

Ao PROFESSOR DR. JOÃO LUCIO AZEVEDO, Diretor da Escola Superior "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, pela orientação, incentivo e confiança dispensados na realização deste trabalho.

Ao PESQUISADOR CIENTÍFICO DR. MARIO BARRETO FIGUEIREDO do Instituto Biológico cuja amizade e incentivo encaminharam-nos na pesquisa científica, pelas valiosas sugestões durante a execução deste trabalho e revisão dos originais.

Ao PESQUISADOR CIENTÍFICO M.Sc. PEDRO CARLOS KRUPPA do Instituto Biológico pela colaboração e orientação na parte de Controle Químico deste trabalho.

À PESQUISADORA CIENTÍFICA DRA. VERA LUCIA RAMOS BONONI do Instituto de Botânica da Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo, pelo auxílio na parte de preparo do composto e pela cessão das linhagens 006/2 e 024/1 de cogumelos comestíveis.

Ao SR. SÉRGIO VIANNA, Chefe da Seção de Fotomicrografia do Instituto Biológico pelo auxílio no preparo de parte da documentação fotográfica.

Ao SR. WALTER GRAEBER, Chefe da Seção de Biblioteca do Instituto Biológico na obtenção de diversas separatas da literatura consultada

Ao ASSISTENTE TÉCNICO DA PESQUISA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA M.Sc. RICARDO HARAKAWA do Instituto Biológico pelo auxílio no manuseio do computador para o preparo dos gráficos e tabelas.

À BIBLIOTECARIA SRA. MARIA DE LOURDES SILVEIRA na revisão de citação bibliográfica.

Aos demais colegas e funcionários da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo e a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS-----	iv
LISTA DE FIGURAS-----	x
LISTA DE TABELAS-----	xii
LISTA DE MICRORGANISMOS CITADOS-----	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS-----	xvii
RESUMO-----	xix
SUMMARY-----	xxi
 1- INTRODUÇÃO-----	 1
 2- REVISÃO DA LITERATURA-----	 6
2.1. Taxonomia de <i>Verticillium</i> -----	6
2.2. Preservação de culturas -----	18
2.3. Controle Profilático-----	21
2.4. Controle Químico -----	24
2.5. Controle Alternativo -----	35
 3- MATERIAL E MÉTODOS-----	 38
3.1. Obtenção dos isolados -----	38
3.2. Conservação das Culturas -----	39

3.2.1. Repicagens periódicas (Método Clássico)-----	39
3.2.2. Método de conservação em solo-----	40
3.2.3. Método de sílica-gel-----	43
3.2.4. Método da água destilada ou de Castellani-----	44
3.2.5. Liofilização-----	44
3.3. Estudos Micológicos-----	45
3.3.1. Meios de cultura utilizados-----	45
3.3.2. Preparo de micro culturas-----	47
3.3.3. Aspectos morfológicos-----	48
3.4. Estudos Fisiológicos-----	49
3.4.1. Determinação da curva de crescimento e do ótimo de temperatura-----	49
3.4.2. Determinação da capacidade de esporulação-----	50
3.4.3. Efeito da alternância de temperaturas-----	51
3.4.4. Determinação do ponto térmico letal dos conídios-----	52
3.4.5. Testes de patogenicidade-----	53
3.4.5.1. Cultivos do hospedeiro (<i>Agaricus bisporus</i>)-----	53
3.4.5.2. Preparo do "Spawn"-----	53
3.4.5.3. Distribuição da terra de cobertura ou "casing soil"-----	54
3.4.5.4. Preparo do inóculo de <i>Verticillium</i> e inoculações experimentais-----	55
3.5. Controle Químico-----	56
3.5.1. Fungicidas utilizados-----	56

3.5.2. Teste de sensibilidade-----	57
3.5.3. Teste de eficiência dos fungicidas-----	58
3.5.4. Teste de resistencia aos fungicidas-----	59
3.5.5.Delineamento experimental-----	59
4- RESULTADOS-----	61
4.1. Obtenção dos isolados-----	61
4.2. Conservação das Culturas de <i>Verticillium</i> -----	61
4.2.1 Repicagens periódicas-----	63
4.2.2. Método de preservação em solo-----	63
4.2.3. Método da sílica-gel-----	64
4.2.4. Método da água destilada ou de Castellani-----	64
4.2.5.Liofilização-----	65
4.3. Estudos Micológicos-----	65
4.3.1. Meios de cultura utilizados-----	65
4.3.2. Micro culturas e morfologia-----	66
4.3.3. Aspectos morfológicos-----	66
4.4. Estudos Fisiológicos-----	68
4.4.1. Determinação das curvas de crescimento e do ótimo de temperatura-----	70
4.4.2. Determinação da capacidade de esporulação-----	70
4.4.3. Efeito da alternância de temperatura-----	77
4.4.4. Determinação do ponto térmico letal dos conídios-----	77

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
1- Aspectos morfológicos de <i>Verticillium fungicola</i> e de <i>Gliocladium</i> sp-----	69
2- Curvas representativas do crescimento micelial em EMA dos isolados 280-H, 281-H e 290-H, 293-H de <i>V.fungicola</i> à diferentes temperaturas -----	71
3- Curvas representativas do crescimento micelial em EMA dos isolados 295-H, 297-H e 299-H, 300-H de <i>V.fungicola</i> à diferentes temperaturas-----	72
4- Curvas representativas do crescimento micelial em EMA dos isolados 301-H, 302-H e 304-H, 367-H de <i>V.fungicola</i> à diferentes temperaturas-----	73
5- Curva representativa do isolado 296-H de <i>Gliocladium</i> sp em EMA a diferentes temperaturas-----	74
6- Curva representativa da alternância de temperaturas do isolado 280-H de <i>V.fungicola</i> -----	78
7- Sintomas causados por <i>V.fungicola</i> em <i>A.bisporus</i> -----	80

- 8 Gráfico representativo da fungitoxicidade do beno-
mil, procloraz, TBZ e clorotalonil em meio de
BDA com 10, 100 e 500 µg/ml de ingrediente ativo
à *Agaricus bisporus* após 22 dias de crescimento
DE₅₀= 50% no crescimento micelial-----87
- 9- Gráfico representativo da fungitoxicidade do beno-
mil, procloraz, TBZ e clorotalonil em meio de
BDA com 10, 100 e 500 µg/ml de ingrediente ativo
à *Agaricus bitorquis*, após 22 dias de crescimento.
DE₅₀= 50% no crescimento micelial-----88
- 10- Gráfico representativo da fungitoxicidade do beno-
mil, procloraz e do TBZ em meio de BDA com 1; 10 e
100 µg/ml de ingrediente ativo à *Verticillium fungicola*
DE₅₀= 50% no crescimento micelial-----95

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
1- Proporções de substrato utilizado, capacidade de campo expressa em % de água e quantidade de suspensão utilizada por C.C.-----	42
2- Relação dos isolados obtidos no levantamento de doenças do cogumelo comestível (<i>A.bisporus</i>) de 1985 a 1989 na região de Moji das Cruzes-SP.-----	62
3- Esporulação de alguns isolados de <i>Verticillium fungicola</i> à diferentes temperaturas em BDA.-----	75
4- Esporulação de 9 isolados de <i>Verticillium fungicola</i> à diferentes temperaturas em EMA.-----	76
5- Sensibilidade do crescimento micelial em mm., das linhagens <i>A.bisporus</i> (006/2) e <i>A.bitorquis</i> (024/1) à diferentes doses de benomil, clorotalonil, procloraz e TBZ. (crescimento micelial em mm)-----	82
6- Sensibilidade das linhagens de <i>A.bisporus</i> (006/2) e <i>A.bitorquis</i> (024/1) à diferentes doses do TBZ (crescimento micelial em mm)-----	84

7- Sensibilidade das linhagens de <i>A.bisporus</i> (006/2) e <i>A.bitorquis</i> (024/1), na dose de 10 µg/ml, aos fungicidas benomil, procloraz e TBZ (crescimento micelial em mm)-----	85
8- Ação de diferentes fungicidas nas doses de 1, 10 e 100 µg/ml sobre o crescimento micelial, em mm., de 12 isolados de <i>V.fungicola</i> .-----	90
9- Ação do benomil e do TBZ nas doses de 1, 10 e 100 µg/ml sobre o crescimento micelial, em mm, de 12 isolados de <i>V.fungicola</i> . -----	91.
10- Ação do benomil, procloraz e TBZ, na dose de 1 µg/ml sobre o crescimento micelial, em mm., de <i>V.fungicola</i> .-----	93
11- Faixa de concentração de DE ₅₀ do benomil, procloraz e TBZ para <i>A.bisporus</i> , <i>A.bitorquis</i> e <i>V.fungicola</i> .-----	96
12- Desenvolvimento em mm, de dois isolados de <i>V.fungicola</i> em doses crescentes do fungicida benomil em meio de BDA.-----	98

12- Desenvolvimento em mm, de dois isolados de <i>V.fungicola</i> em doses crescentes do fungicida benomil em meio de BDA.-----	98
---	----

LISTA DE MICRORGANISMOS CITADOS

Acrostalagmus fungicola Preuss
Agaricus bisporus (Lange) Singer
Agaricus bitorquis (Quèlet) Saccardo
Aternaria sp.
Ascochyta phaseolorum Saccardo
Aspergillus sp.
Candida albicans (Robin) Berkhout
Cephalosporium costantini F.V.E. Smith
Cephalosporium lamellaecola F.V.E. Smith
Cephalosporium sp.
Colletotrichum graminicola (Cesati) G.W. Wils
Cladosporium dendroides Link : Fries
Dactylium dendroides Fries
Fusarium sp.
Gliocladium sp.
Gliocladium virens Miller, Giddens & Foster
Hormodendrum sp.
Hypomyces rosellus (Albertini & Schiweinitz) Tulasni
Lentinus edodes (Berkeley) Singer
Macrophomina phaseolina (Tassi) Goidanich
Microsporium audouinii Gruby
Mycogone perniciosa Magnus
Mycogone rosea Prillieux
Phoma sp.
Phyllosticta sp.
Pleurotus ostreatus Jacquin ex Fries
Pleurotus sp.

Psalliota edulis Vittadinion

Pseudomonas tolaasii Paine

Pseudomonas fluorescens (Trevisan) Migula

Rhizoctonia sp.

Trichoderma sp.

Verticillium agaricinum Stapf

Verticillium albo-atrum Reinking & Bethoud

Verticillium biguttatum W.Gams

Verticillium dahaliae Klebahar

Verticillium fungicola (Preuss) Hassebrauk

Verticillium fungicola (Preuss) Hassebrauk var. *aleophilum* W.Gams

Verticillium fungicola (Preuss) Hassebrauk var. *fungicola*

Verticillium fungicola (Preuss) Hassebrauk var. *flavidum* W. Gams

Verticillium malthousei Ware

Verticillium psalliotae Treschow

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

A.A.	Agar Água
<i>A.b.</i>	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>A.bt.</i>	<i>Agaricus bitorquis</i>
BDA	Batata Dextrose Agar
°C	Graus Centígrados
C.C.	Capacidade de Campo
CEPECC	Centro de Pesquisas dos Cogumelos Comestíveis
cm	Centímetros
EMA	Extrato de Malte Agar
DE ₅₀	Dose para inibir 50% do crescimento micelial
°F	Graus Fahrenheit
<i>F.sp</i>	"formae speciales"
g	gramas
i.a.	ingrediente ativo
MAA	Meio de Agar A veia
M.O.	Matéria Orgânica
µg	micro grama
ml	mililitro
mm	milímetro
µm	micrometro
P.A.	Pró Análise
p.a.	princípio ativo
P.M.	pó molhável
ppm	partes por milhão

TBZ	tiabendazol
var.	variedade
<i>V.b.</i>	<i>Verticillium biguttatum</i>
<i>V.f</i>	<i>Verticillium fungicola</i>
<i>V.f.a.</i>	<i>Verticillium fungicola</i> var. <i>aleophilum</i>
<i>V.f.f</i>	<i>Verticillium fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
<i>V.f.fl.</i>	<i>Verticillium fungicola</i> var. <i>flavidum</i>

**TAXONOMIA, VARIABILIDADE, PATOGENICIDADE E
CONTROLE DE *Verticillium* EM *Agaricus bisporus* (Lange) Singer**

Autor : LEILA NAKATI COUTINHO

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO AZEVEDO

RESUMO

O presente trabalho foi efetuado visando isolar *Verticillium* spp a partir de cultivos comerciais de cogumelos caracterizá-los taxonomicamente, morfológica e fisiologicamente, comparar os métodos de preservação dos isolados obtidos, e verificação de sua patogenicidade. Foi estudado também o efeito "in vitro" de fungicidas sobre *Agaricus bisporus*, *Agaricus bitorquis* e vários isolados de *Verticillium*. Verificou-se que a principal doença do cogumelo comestível (*Agaricus bisporus*) na região de Mogi das Cruzes, SP é causada por *Verticillium* cujo agente causal foi identificado como *V. fungicola*. Foram isoladas 12 linhagens do fungo. Os melhores métodos para preservação da viabilidade e estabilidade fisiológica dos isolados de *Verticillium* para a finalidade de pesquisa foram determinados como sendo os métodos da água destilada ou de Castellani, e da liofilização dos conídios. A temperatura ótima para o crescimento micelial e produção de conídios, dos 12 isolados de *V. fungicola* esteve entre 21-27°C, em meios de Batata Dextrose Ágar (BDA) e Meio de Aveia Ágar

(MAA). A melhor esporulação ocorreu em meio de BDA. O ponto térmico letal dos conídios esteve entre 39-40°C. Quando uma suspensão de conídios foi inoculada por aspersão na solo de cobertura todos os isolados foram patogênicos para o cogumelo comestível (*A.bisporus*), causando manchas rachaduras, depreciando o valor comercial do produto e resultando em sintomas típicos de "bolha seca" que consiste na produção de corpos de frutificação disformes. Estudos "in vitro" sobre a ação de fungicidas no crescimento micelial de *V.fungicola* e seu efeito sobre *A.bisporus* e *A.bitorquis* demonstraram que o procloraz+Mn foi o mais eficiente controlador do fungo, enquanto que o benomil, que já tem sido recomendado no Brasil para o controle da "bolha seca", embora tenha demonstrado uma eficiência semelhante ao procloraz+Mn, não foi eficiente para todos os isolados, pois dois deles foram resistentes ou tolerantes. Este é o primeiro relato de resistência à benomil em *Verticillium* atacando cogumelos comestíveis no Brasil.

**TAXONOMY, VARIABILITY, PATOGENICITY AND CONTROL OF
Verticillium ON *Agaricus bisporus* (Lange) Singer**

Author: Leila Nakati Coutinho

Adviser: Prof. Dr. João Lúcio Azevedo

SUMMARY

In the present dissertation *Verticillium* samples were obtained from diseased mushrooms collected in several producing properties in the region of Moji das Cruzes, SP with the purpose of developing taxonomic, morphological, physiological and pathological studies in order to characterize the involved species. Studies were also carried out to establish the best preservation method of the *Verticillium* isolates during the studies. "In vitro" tests on the effect of different fungicides on the growth of *Agaricus bisporus*, *A. bitorquis* and on the *Verticillium* control were made. Twelve *Verticillium* isolates were obtained. A species, of *Gliocladium*, probably a nematode trapping fungus, was also isolated. The best preservation method for maintenance viability and physiological stability of the *Verticillium* samples were the Castellani's and the lyophilization methods. The best micelial growth temperature for all the *Verticillium fungicola* isolates was determined to be around 21-27 °C, but most of them had the best growth at 24 °C. The best temperature for conidia production in Potato Dextrose Agar (PDA) and Oat Extract Agar was found to be between 21-27°C. The best sporulation

associated with the best temperature occurred in PDA. The conidia thermal death point is 39-40°C. *Verticillium* pathogenicity assays to *A.bisporus* showed that all the 12 isolates were pathogenic to *A.bisporus* causing cinnamon brown and irregular discolored spots on the surface of the cap. Many spots of a varying size and outline may occur. Under moist condition, the enlarging spots may coalesce to form a large blotch. Later the spot may become depressed and sunken. These mushrooms are edible, but are of reduced quality and commercial value. The parasite can also invade the tissue of the stem thus causing a splitting and splitting, often producing a tilted and deformed cap. When such mushrooms are cut open, a hollow cavity is frequently seen, the walls of which are covered with a whitish growth. The mushroom becomes dry, shrunken, distorted and unfit for sale. Finally the "bubble" formation is indicative of heavy contamination of the casing soil and it was more present in the end of the cultures. In this case the newly forming buttons are infected at a very early stage. The invading hyphae of the parasite arrest development leading to pileo malformations. The stem becomes swollen into a puffball-like structure which do not decay but remain dry and leathery. In this disease stage the mushroom production is completely spoiled and damaged. "In vitro" studies fungicides action of fungicides of the mycelial growth on *V.fungicola*, *A.bisporus* and *A.bitorquis* showed that prochloraz+Mn was the most efficient. In Brazil benomyl have been recommended for dry bubble control. Although benomyl is as efficient as prochloraz+Mn for dry bubble control. Two benomyl resistant or tolerant isolates were detected in Moji das Cruzes and surrounding areas.

1. INTRODUÇÃO

Os cogumelos comestíveis, apreciados em muitas dietas européias e orientais, vêm crescendo de importância nos últimos anos, já que o cultivo dos mesmos possibilita reciclar economicamente certos resíduos agrícolas e agroindustriais. Sob o ponto de vista nutricional, considerando o elevado conteúdo proteico dos cogumelos comestíveis, seu cultivo tem sido apontado como uma alternativa para incrementar a oferta de proteínas às populações de países em desenvolvimento e com alto índice de desnutrição.

A cultura é considerada uma atividade de meio ambiente protegido e tem mostrado um notável incremento em diversos países. Em 1950 a produção mundial era estimada em 50.000 toneladas, enquanto que em 1979 foi de 500.000 toneladas, ou seja, dez vezes maior. Os maiores países produtores foram EUA e França com cerca de 110.000 toneladas anuais, Taiwan com 80.000 toneladas e Holanda com 40.000 toneladas. Na Inglaterra a produção foi, nessa época, de 60.000 toneladas com um valor comercial de 26 milhões de libras esterlinas, quase igual ao do tomate com 26,1 milhões por ano (SPENCER 1979).

No Brasil, no Estado de São Paulo, conforme informações de (BONONI¹ 1992), os dados sobre a produção de cogumelos não são precisos porque não existe um controle permanente e nem estatísticas da quantidade diária dos cogumelos que entram para a comercialização na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo (CEAGESP). Estima-se, entretanto, que esteja ao redor de 6.000 toneladas/ano. No Estado de São Paulo, alguns municípios não muito distantes da capital como Itú, Atibaia, Mairinque, São Bernardo do Campo, Jaguariúna, Jarinú, Cabreúva, Itupeva e, principalmente Mogi das Cruzes possuem as áreas produtoras mais importantes de cogumelos comestíveis.

O cultivo de cogumelos é, portanto, um processo biotecnológico que utiliza materiais residuários da agricultura, pecuária e agroindústria tais como, estêrco bovino, equino, de aves, porcos e outros animais domésticos, palhas e outros incluindo os resíduos de trigo, arroz, milho, algodão, madeira e bagaço de cana para produzir alimentos saborosos e de alto valor nutritivo. O gênero *Agaricus* representa 70% da produção mundial e *Lentinus* cerca de 14%.

De acordo com os dados na escassa literatura nacional, o início do cultivo em escala comercial, parece datar dos anos 50. Não existe uma documentação segura que permita localizar, no tempo, o início do cultivo dessa espécie no Brasil, sendo certo, no entanto, que a popularização de seu hábito alimentar na região Centro Sul data de uns 40 anos.

1- BONONI, V.L.R. (Instituto de Botânica, São Paulo - SP. Comunicação Pessoal).

Ao que tudo indica, quem primeiro deu início a estudos sobre o assunto no âmbito da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, tratando principalmente de adaptar a tecnologia estrangeira às nossas condições foi Julio Franco do Amaral que trabalhou no Instituto Biológico (AMARAL 1954, 1964). Entretanto, algumas informações sobre o cultivo de cogumelos já haviam sido publicadas pelo padre francês Camille Torrend que veio para o Brasil em 1914 e foi professor de Botânica na Bahia (TORREND 1951). Embora recentemente a farta divulgação tenha despertado grande interesse pelo cogumelo comestível e já existam cultivos altamente especializados nos quais são empregados equipamento sofisticados, no Estado de São Paulo, a maior parte dos cultivos é ainda hoje, conduzida por famílias provenientes de Formosa. Os métodos de plantio mais frequentemente utilizados são resultado de uma experiência herdada por muitas gerações, porém destituídas de aprimoramento técnico em decorrência da falta de conhecimentos científicos mais aprofundados.

Relativamente às tecnologias de cultivo comercial, de fungos comestíveis no Brasil, pode-se afirmar que as mesmas restringem-se ao *Agaricus bisporus*, e mais recentemente ao *Pleurotus* spp e ao *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, popularmente conhecido como "Shiitake". Mais recentemente, foi também introduzido em nosso meio a espécie *Agaricus bitorquis* (Quel) Sacc. cuja tecnologia de cultivo é, praticamente a mesma empregada para *A. bisporus*.

Adicionalmente também são raros os relatos de pesquisas brasileiras no assunto. Dessa forma, os produtores brasileiros tem-se limitado à importação e adaptação empírica de técnicas desenvolvidas na Europa, Ásia e América

do Norte, principalmente pelo cultivo de linhagens importadas, e pouco aclimatadas às condições brasileiras.

Em um levantamento realizado de 1981 a 1986 na Região de Moji das Cruzes, SP MUCCI & FIGUEIREDO (1981), FIGUEIREDO & MUCCI (1985) e COUTINHO *et alii* (1987) verificaram que a mais importante doença que afeta a cultura de *A.bisporus* é causada por *Verticillium* sp. Esta doença foi constatada em praticamente todas as propriedades visitadas e é a responsável pela queda da produção e qualidade do produto. Na realidade o patógeno apresenta uma ampla distribuição geográfica sendo encontrado onde quer que o cogumelo seja cultivado.

Segundo SPENCER (1979) a espécie *V.fungicola* é ainda hoje considerada como o mais importante patógeno de *A.bisporus* desenvolvendo-se onde quer que se cultive o cogumelo. Em se tratando dos mais importantes patógenos para o cogumelo comestível os fungos do gênero *Verticillium* que ocorrem sobre essa cultura necessitam de um estudo mais aprofundado. Há ainda necessidade de pesquisas sobre as diferentes espécies que possam ocorrer e melhores estudos sobre a sintomatologia, fisiologia e finalmente sobre a variabilidade genética que é o fator determinante do grau de patogenicidade bem como do desenvolvimento de resistência à fungicidas, das diferentes populações existentes em nosso meio. São ainda necessários estudos sobre possíveis métodos para controlar a doença quer sejam referentes aos tratos culturais, manejo ou métodos químicos.

Com referência ao controle químico, o fator complicador é que ambos os organismos envolvidos, cogumelo e patógeno, são fungos e portanto, sensíveis

à fungicidas o que torna o problema mais difícil de ser solucionado. Diante do exposto, o propósito dos estudos desenvolvidos neste trabalho foram os seguintes: 1) Efetuar o levantamento das populações de *Verticillium* existentes nos cultivos de *Agaricus bisporus*, por meio de coletas periódicas. 2) Isolamento de *Verticillium* spp. a partir de cogumelos coletados em diferentes propriedades de cultivo comercial. 3) Comparação dos métodos de preservação dos isolados obtidos para a manutenção das culturas em estudo. 4) Caracterização taxonômica dos isolados comparando-se suas características morfológicas e fisiológicas. 5) Verificação da patogenicidade e dos sintomas produzidos pelos isolados representativos de cada grupo morfológico. 6) Desenvolvimento de estudos "in vitro" sobre o efeito de diferentes concentrações de fungicidas previamente selecionados sobre o micélio do *Agaricus bisporus* e *A.bitorquis* com a finalidade de selecionar produtos adequados para o controle da doença. 7) Realização de ensaios "in vitro" sobre a eficiência dos mesmos produtos selecionados, sobre os diferentes isolados de *Verticillium* e 8) Detecção da presença ou não de populações do patógeno resistentes aos fungicidas selecionados.

2. REVISÃO DA LITERATURA.

2.1.TAXONOMIA DE *Verticillium*

Segundo SMITH (1924), a mais importante doença que afeta a cultura do cogumelo comestível *Agaricus bisporus* conhecida atualmente por "bolha seca" (dry bubble), tem sido relatada cientificamente desde o final do século passado por pesquisadores como Costantin & Dufour na França em 1892 e posteriormente por Veihmeyer em 1914 na América. A doença foi também denominada de "La mole" pelos franceses e havia, na ocasião, uma certa confusão sobre a real identidade do agente etiológico causador das anormalidades presentes nos cultivos de cogumelos. Os diversos estudos realizados por Costantin & Dufour e por Veihmeyer sobre a doença, procurando um maior esclarecimento sobre a mesma, chegaram a conclusão errônea de tratar-se de *Mycogone perniciosa* Magnus. Neste caso eram observados dois tipos de esporos isolados a partir de um mesmo material doente. Os primeiros que apareciam, eram esporos semelhantes aos de *Verticillium*, os quais eram seguidos pela manifestação de clamidospóros ou *Mycogone* "stage". Em estudos posteriores realizados por esses mesmos autores, foi verificado que não se tratava de *Mycogone*, mas de algum outro fungo que possuía esporos bem diminutos. Isto foi descrito como "*Verticillium à petite*

spores" mas não era descartada a hipótese de que pudesse constituir-se em um estágio de um outro fungo. Diversos estudos revelaram que, dependendo da fonte nutricional adicionada em meios sintéticos, poderiam ser originados ora um ora outro tipo de esporo, ou seja, tipo *Verticillium* ou tipo *Mycogone*. Ainda segundo SMITH (1924), outros trabalhos semelhantes sobre o mesmo problema, publicados por Stapf e Prillieux, respectivamente em 1889 e 1892, criaram uma confusão ainda maior, atribuindo a doença a *Verticillium agaricinum* Stapf e *Mycogone rosea* Prillieux. Entretanto, foi SMITH (1924) o primeiro autor que conseguiu elucidar o problema da identidade etiológica, tão conflitante no passado. Ele conseguiu esclarecer que, embora as doenças apresentassem sintomatologia muito semelhantes, não poderiam ser atribuídas a apenas um agente etiológico como se pensava no início. No começo deste século, tendo em vista problemas crescentes em muitos cultivos, cujos cogumelos apresentavam deformações que foram observadas em propriedades na Inglaterra, o autor deu início a uma detalhada investigação sobre o verdadeiro agente causal da doença. Suspeitava-se que poderiam estar envolvidos mais de um agente etiológico. Este autor dedicou-se intensamente ao problema e, através de estudos comparativos e baseado em dados obtidos por outros autores, chegou a conclusão de que o problema envolvia três agentes etiológicos distintos: *Mycogone perniciosa* Magnus, *Cephalosporium costantini* Smith e *Cephalosporium lamellaecola* Smith. Estas duas últimas espécies, foram minuciosamente descritas pelo autor.

WARE (1933) trabalhou com a mesma doença a partir de materiais de alguns focos encontrados em propriedades produtoras de cogumelos na Inglaterra apresentando a mesma sintomatologia descrita por outros pesquisadores. O autor fez um intensivo estudo sobre a doença, empregando vários métodos de inoculação

em diferentes formas de cultivo do cogumelo. Contudo, discordou de SMITH (1924) em muitos aspectos da etiologia da doença. Através de estudos morfológicos, estabeleceu um novo agente etiológico a que denominou *Verticillium malthousei* Ware, em alusão ao pesquisador G.T.Malthouse que teria descrito o agente causal da doença de forma incompleta em 1901. Nesse aspecto, conforme já referido, WARE (1933) discordou radicalmente de SMITH (1924) que atribuiu a doença a uma espécie de *Cephalosporium*. O autor também não concordou com as afirmações de que *Cephalosporium costantini* constituir-se-ia no organismo denominado "*Verticillium à petite spores*" referido por Costantin e Dufour em 1892. WARE (1933) foi o segundo autor a associar o gênero *Verticillium* a esta doença. O primeiro trabalho foi o publicado por Stapf em 1889, no qual ele citou a espécie *V.agaricinum* como o agente etiológico

HASSEBRAUK (1936), realizando estudos sobre fungos hiperparasitas de várias ferrugens dos cereais, identificou *Acrostalagmus fungicola* Preuss que havia sido descrito em 1851. O mesmo autor considerando que várias espécies do gênero *Acrostalagmus*, por possuírem características comuns, tinham sido transpostas para o gênero *Verticillium*, entre os quais se incluía *Acrostalagmus fungicola*, sugeriu a combinação *V.fungicola* (Preuss) Hassebrauk que é o nome hoje válido para a espécie do patógeno do cogumelo comestível .

TRESCHOW (1941), na Dinamarca, estudando uma doença observada em propriedades de produtores de cogumelos, realizou estudos comparativos com as espécies estabelecidas por SMITH (1924) e por WARE (1933) e também com *Mycogone perniciosa*, chegando a conclusão através de estudos dos caracteres morfológicos, tratar-se de uma outra espécie de *Verticillium* a que denominou

Verticillium psalliotae Treschow. A diferença mais marcante seria de caráter ontogênico no mecanismo de formação dos conídios que resultam na forma característica côncavo-convexa do esporo.

FASSATIÒVA (1965) estudou 10 isolados de *Verticillium* provenientes da Holanda, da Inglaterra, da Rússia e um isolado identificado como *Cephalosporium costantini* Smith proveniente de Budapeste (Hungria). Segundo a autora todas as espécies estudadas pertenceriam a uma mesma espécie *V.malthousei*, concluindo que *V.psalliotae* e *C.costantini* seriam sinônimos da espécie descrita por WARE (1933). Todavia, vários isolados foram obtidos de materiais outros que cogumelos doentes, e na descrição dos conídios das espécies estudadas ela referiu-se apenas a esporos lunatos ou fusiformes com extremidades ponteagudas em ambos os lados.

Segundo FEKETE (1967), *Verticillium malthousei* Ware (= *V.fungicola*) é encontrado em praticamente todas as culturas do cogumelo comestível (*A.bisporus*) da Suíça e os sintomas foram sempre idênticos aos relatados por WARE (1933). Segundo este autor medições dos conídios de isolados de diferentes procedências, mostraram diferenças pouco significativas e não foi possível a separação em raças fisiológicas ou variedades.

STOREY (1974) referiu-se a uma espécie de *Cephalosporium* atacando cogumelos na Inglaterra, que ocorria com certa raridade. Todavia, pela descrição apresentada, a doença é diferente da causada pelas outras duas espécies descritas por SMITH em 1924. Também o micólogo C.Booth do CMI (Commonwealth Mycological

Institute), tendo examinado o material, verificou que a espécie era distinta de *C.costantini*, hoje considerada sinônimo de *V.fungicola* (STOREY 1974).

Segundo os conceitos do Commonwealth Mycological Institute, Kew, Inglaterra, citados por BRADY & WALLER (1976) e BRADY & GIBSON (1976), duas espécies distintas de *Verticillium* são consideradas serem parasitas de *A.bisporus* ou seja, *V.fungicola* e *V.psalliotae*. Segundo esses autores, elas são diferentes entre si em características morfológicas e fisiológicas. Entre as principais diferenças morfológicas referidas poderiam ser citadas: 1) O maior número de fiálides por nódulo ou verticílio (3-9) para *V.fungicola* do que para *V.psalliotae* (2-3). 2) Em *V.fungicola* as fiálides formam-se em hifas eretas, são curtas e espessas ($13,0-25,0 \times 2,0-25,0 \mu\text{m}$), enquanto em *V.psalliotae* as fiálides formam-se em hifas decumbentes ou prostradas e são longas e estreitas ($17,0-35,0 \times 1,0-1,5 \mu\text{m}$). 3) Em *V.fungicola* os conídios aparecem em vesículas globosas e viscosas que coalecem facilmente. São elipsoidais longas ou cilíndricas tornando-se mais finas nas extremidades, raramente e suavemente encurvadas, predominando formas cilíndricas ($3,0-8,5 \times 1,0-1,5 \mu\text{m}$). 4) Em *V.psalliotae* os conídios formam-se em ângulo reto ao longo do eixo da fiálide, reúnem-se em pequenos grupos e são de duas naturezas: os que se formam inicialmente são em forma de meia lua e ponteados nas duas extremidades, ocasionalmente bicelulares; os que se formam mais tarde são menores, cilíndricos e elipsoidais ($2,5-9,5 \times 1,0-2,0 \mu\text{m}$). 5) Quanto às diferenças fisiológicas à 25°C em Ágar Aveia as culturas de *V.fungicola* são brancas ou creme e atingem 25,0 a 30,0 mm de diâmetro em 14 dias, enquanto *V.psalliotae* nas mesmas condições apresentam culturas brancas, com micélio flocooso e são amarelas, vermelho-claras, vermelho-vinho, marrom-escuras ou mais caracteristicamente púrpura com uma zona de difusão pigmentar no meio de cultura nos

bordos da colônia. Atingem de 35,0 a 50,0 mm de diâmetro. Segundo os autores acima citados também foram notadas diferenças nos sintomas causados por essas duas espécies sobre o cogumelo comestível.

UPSTONE & CARTER (1979), verificaram que a primeira constatação de *Verticillium psalliotae* na Inglaterra foi feita por F.C. Atkins em 1947 e F.C. Wood, em 1958, denominou a doença que passou a ser popularmente denominada por "doença da mancha marrom" (brown spot disease). Segundo os autores em um levantamento sobre as doenças do cogumelo realizado em 1975 por Gaze & Fletcher, *V. psalliotae* não foi detectado enquanto *V. fungicola* estava disseminado e prevalente particularmente onde ocorriam populações tolerantes ao fungicida benomil. Foi observado também que embora presente no local, nos cultivos visitados *V. fungicola* não foi observado sobre *A. bitorquis* bem como *V. psalliotae* não foi observado sobre *A. bisporus*. Em inoculações experimentais no solo de cobertura verificaram que *A. bitorquis* é suscetível as duas espécies de *Verticillium* e que os sintomas de *V. fungicola* são mais severos. Em relação ao fungicida benomil, observaram que *V. psalliotae* foi suscetível e *V. fungicola* altamente tolerante.

ZAAYEN (1981) inoculou duas variedades comerciais de *A. bitorquis* identificadas como Horst K26 e Horst K32, 10 dias após inoculação do solo de cobertura, com suspensões de esporos de *Verticillium* sp. em concentrações de 10^6 a 10^7 conídios por ml^{-1} . Verificou que as inoculações resultaram em infecções e conseqüentemente perdas na produção. Os sintomas descritos eram: manchas marrons e deprimidas nos píleos e algumas vezes nos estipes, muitas manchas eram circulares com até 1,50 cm de diâmetro nos píleos maduros de até 5,0 cm de diâmetro. Depois as

manchas se disseminaram pelos pileos alterando totalmente a coloração dos mesmos podendo causar a ruptura em decorrência de grandes manchas profundamente sulcadas. Frequentemente, as manchas marrons eram recobertas com um filme de micélio acinzentado, especialmente no centro das manchas. O benomil quando aplicado no solo de cobertura não preveniu a infecção mas o clorotalonil foi eficiente. Popee (1972), citado por ZAAZEN (1981), relatou que *Agaricus bitorquis* seria mais tolerante a *Verticillium fungicola* que *A.bisporus*. Ainda, segundo a autora, a "bolha seca" causada por *V.fungicola*, tão comum sobre *A.bisporus*, raramente infectaria *A.bitorquis*. A espécie relatada seria, portanto, mais adaptada as temperaturas mais elevadas requeridas por esta espécie.

A mais recente revisão sobre a taxonomia e patogenicidade de fungos do gênero *Verticillium* foi feita respectivamente por GAMS & ZAAZEN (1982) e ZAAZEN & GAMS (1982). Com referência aos aspectos taxonômicos eles sugeriram a divisão do gênero em 4 Secções e um grupo com características comuns pouco definidas a que denominaram Grupo Residual. Analisaram para isso os aspectos morfológicos e fisiológicos de culturas puras dos diferentes isolados crescidos em meio padronizado de Extrato de Malte Agar à 2% (EMA) à temperatura de 20° C. Com essa metodologia estabeleceram uma chave dicotômica baseada nos parâmetros: a) características do micélio somático, b) presença ou ausência de clamidospóros e microesclerócios, c) hábitos e morfologia dos conidióforos, d) fiálides, e) coloração das colônias e liberação de pigmentos em meio de cultura, f) velocidade de crescimento do talo somático, etc. e estabeleceram as seguintes secções: 1) Secção *Verticillium* (hábitos variados); 2) Secção *Nigrenscentia* (patógenos vegetais causadores de murchas com estruturas negras de resistência; 3) Secção *Prostrata* (hiperparasitas fungícolas e

nematófagos com conidióforos decumbentes; 4) Secção Albo-erecta (espécies principalmente fungícolas, com conidióforos eretos e 5) Grupo Residual (hábitos e características comuns pouco definidas). Os fungos parasitos dos cogumelos comestíveis foram colocados nas Secções Prostrata (*V.psalliotae*) e Albo-erecta (*V.fungicola*, etc.) . Com relação a estes grupos de fungos fungícolas foram estudadas as relações de temperatura, velocidade e limites termiais de crescimento somático de diversos isolados, aspectos morfológicos e determinaram as características de 3 espécies e 3 variedades de *Verticillium*, ou seja, *V.fungicola* var. *fungicola* (*V.f.f.*); *V.fungicola* var. *aleophilum* W. Gams & Van Zaayen (*V.f.a.*); *V.fungicola* var. *flavidum* (*V.f.fl.*) W. Gams & Van Zaayen; *V.biguttatum* W. Gams & Van Zaayen (*V.b.*) e *V.psalliotae* (*V.p.*). Os dados por eles obtidos referentes ao crescimento, limites de temperatura e ponto térmico letal para as diferentes espécies e variedades podem ser resumidos no quadro abaixo por nós organizado. GAMS & ZAAYEN 1982 utilizaram também o critério de sensibilidade à fungicidas como o benomil para a caracterização de isolados e estabeleceram uma chave dicotômica para a separação das diferentes espécies e variedades de *Verticillium* parasitos de fungos.

Quadro : Requerimentos de temperaturas (°C) para diferentes espécies e variedades fungícolas de *Verticillium* .

Espécie ou variedade	Ótimo	Ausência de	Ponto térmico
		crescimento	letal*
<i>V.f.a.</i>	24-27	33	42
<i>V.p.</i>	24	33	—
<i>V.f.f.</i>	24	27	38-39
<i>V.f.fl.</i>	19-20	27	—
<i>V.b.</i>	24-27	27	—

V.f.f. - *Verticillium fungicola* var. *fungicola*

V.f.a. - *V.fungicola* var. *aleophilum*

V.f.fl. - *V.fungicola* var. *flavidum*

V.b. - *V.biguttatum*

V.p. - *V.psalliotae*

* - temperatura letal sobre uma suspensão de conídios por 30 minutos.

Com respeito a patogenicidade das espécies de *Verticillium* que atacam o cogumelo, ZAAZEN & GAMS (1982) realizaram diversos estudos e

verificaram que *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, o agente causal da “bolha seca”, é responsável por prejuízos consideráveis nas colheitas de *A.bisporus* mas dificilmente prejudica culturas de *A.bitorquis* (= *Psalliotia edulis* Vitt.). Esta espécie que se desenvolve à temperaturas mais elevadas e é imune a viroses vem sendo cultivado na Holanda a partir da década de 1970. Entretanto, *A.bitorquis* pode ser afetado por *V.fungicola* var. *aleophilum* que causa manchas marrons no pileo e nos estipes resultando em produto de qualidade inferior. Em menor intensidade esta variedade (*V.f.a.*) causa manchas marrons em *A.bisporus*, e em cultivares suscetíveis, também pode induzir deformações dos corpos de frutificações de uma maneira diversa da bolha seca. Um dos cultivos suscetíveis é aquele denominado, na Europa, como “Les Miz 60”. Esses mesmos autores verificaram ainda que *V.psalliotae* isolado de *A.bitorquis* na Inglaterra induz manchas marrons mais confluentes nesta espécie de cogumelo. Na Holanda, onde *A.bitorquis* é mais cultivado que em outros países, *V.psalliotae* ainda não havia sido detectado em 1982. Outra observação foi que *V.psalliotae*, o qual apresenta um ótimo de temperatura mais elevado para o crescimento micelial, da mesma forma que *V.fungicola* var. *aleophilum* e *A.bitorquis* não infectaram *A.bisporus* nos experimentos de inoculação por eles realizados. *V.fungicola* var. *flavidum* e *V.biguttatum* de forma usual, isolados respectivamente de espécies selvagens de cogumelos ou hiperparasitas de fungos de solo como *Rhizoctonia*, não infectaram *A.bisporus* ou *A.bitorquis*.

MARLOWE & ROMAINE (1982) relataram que *Verticillium fungicola* var. *fungicola* foi identificada em plantações comerciais de *Pleurotus ostreatus* Jaqç :. Fr. na Califórnia em 1981. Um isolado de *V.f.f.* foi isolado e inoculado artificialmente juntamente com outro isolado proveniente de *Agaricus bisporus* (*A.b.*) sobre cultivos de *P.ostreatus* (*P.o.*) e *A.bisporus*, respectivamente 14 dias após a

semeadura (*P.o.*) e imediatamente após a colocação do solo de cobertura (*A.b.*). O *Pleurotus*, foi inoculado após a formação dos corpos de frutificação e foram verificados dois tipos de sintomas que variaram de acordo com o estágio de desenvolvimento em que a inoculação foi realizada. Quando a inoculação foi feita no estágio de formação dos "botões", resultou no aparecimento de mal formações típicas de "bolha seca" juntamente com o aparecimento de massas amórficas de tecidos do esporóforo. Em contraste, quando esporóforos desenvolvidos foram inoculados, houve o aparecimento de fissuras, rachaduras, áreas necróticas marrons e enrolamento dos esporóforos. Em estágios avançados da doenças uma trama de micélio acinzentada e conídios freqüentemente cobria a superfície dos esporóforos infectados. Desses tecidos, *V.fungicola* era rapidamente reisolado. Não foram notadas diferenças entre os isolados provenientes das duas espécies quando inoculadas de forma cruzada e ambos os casos resultaram em danos de produção ao redor de 30 e 40% quando comparados com o controle não inoculado e sadio. Ficou assim demonstrado que *V.fungicola* também é patogênico para *P.ostreatus*.

Na Índia, DADWAL & JAMALUDDIN (1984) relataram pela primeira vez uma doença causada por *Gliocladium virens* Miller, Giddens & Foster cujos sintomas característicos são: formação de uma lesão marrom necrótica nas margens do pileo que depois migra profundamente até o ponto de intersecção do estipe, no qual também causa necrose e fendilamentos. Não há produção de qualquer odor diferente mas a aparência dos esporóforos é péssima. A doença foi reproduzida por inoculações artificiais.

SOHI (1988) relatou que *A.bisporus* tornou-se popular apenas recentemente em várias regiões da Índia e que *V. fungicola* e suas variedades, cujo habitat seria o solo de cobertura e os corpos de frutificação, é um dos mais importantes patógenos do cogumelo, causando os mesmos sintomas já descritos pelos autores citados anteriormente. Entretanto, referindo-se às variedades de *V.fungicola* cita *V.fungicola* var. *aleophilum* e confunde-se tratando a espécie *V.psalliotae* como sendo uma variedade de *V.fungicola*.

COUTINHO (1988) referindo-se a importância dos fungos do gênero *Verticillium* para o cogumelo comestível na região de Moji das Cruzes, SP estudou a suscetibilidade de *Agaricus* em três fases do seu desenvolvimento. Verificou que os efeitos foram mais danosos, como deformações nos pileos, quando as inoculações de uma suspensão de esporos foi feita no solo de cobertura, antes do aparecimento dos corpos de frutificação. Quando as inoculações foram feitas na época da manifestação dos primeiros botões, as deformações foram menores e depois das frutificações desenvolvidas houve o aparecimento de manchas marrons nos pileos e rachaduras no estípe.

COUTINHO & AZEVEDO (1991) estudaram 12 isolados de *Verticillium* provenientes da região de Moji das Cruzes, SP verificando que todos pertenciam a mesma espécie.

2.2. PRESERVAÇÃO DAS CULTURAS FÚNGICAS.

Uma vez que o desenvolvimento das pesquisas propostas no presente estudo demandaria a manutenção de vários isolados de diferentes propriedades de cultivo comercial e que pelo processo de preservação por repicagens constantes sempre há o risco de modificações morfológicas e fisiológicas, a utilização de processos adequados, seria importante para a preservação de culturas de *Verticillium*. Em uma breve revisão sobre o assunto, BARKESPIGEL (1953) manteve por um ano 17 espécies de Deuteromicetos em tubos com argila. Duas das espécies puderam ser preservadas por até 4 anos e todos os fungos preservados no solo permaneceram em seu estado selvagem ou original, enquanto que as espécies mantidas por repicagens constantes em ágar, tanto os dermatófitos como *Phoma* sp, *Phyllosticta* sp. e *Fusarium* sp, tornaram-se pleomórficos. No mesmo tipo de solo, o micélio de fungos do gênero *Phoma*, *Fusarium*, *Phyllosticta* e *Hormodendrum* aumentou. BARKESPIGEL (1954) concluiu que a preservação de fungos no solo poderia ser empregada em laboratório, diminuindo os trabalhos de repicagens periódicas necessárias em meios de ágar. Outra vantagem seria a de prevenir as modificações pleomórficas que ocorrem nos preservados através de repicagens constantes e sucessivas. A mesma autora (1954), entusiasmada com o trabalho realizado anteriormente, ensaiou 94 culturas onde os fungos foram armazenados em argila com controles preservados em ágar. Depois os dois grupos foram analisados quanto a viabilidade e estabilidade. Com exceção de dois isolados (*Candida albicans* (Robin) Berkhout e *Microsporium audouini* Gruby.) entre vários Ficomicetos, Ascomicetos e Deuteromicetos, todos os demais estavam viáveis em seu estado selvagem enquanto que

no controle em ágar apenas 64 mantinham-se viáveis, mas com modificações pleomórficas. Ele concluiu que a argila calcárea é um meio útil para manutenção da viabilidade e estabilidade de vários fungos.

No Brasil, FIGUEIREDO, (1967, 1971) tem demonstrado a eficiência do uso do método da água destilada, também denominado método de Castellani (CASTELLANI 1939), na preservação de várias culturas de fungos fitopatogênicos por longos períodos de tempo. Também FIGUEIREDO & PIMENTEL (1977) relataram que o método da água destilada tem sido utilizado para preservação de 563 culturas de fungos fitopatogênicos na Micoteca do Instituto Biológico de São Paulo e que muitas espécies tem sido mantidas por mais de 20 anos sem necessidade de repicagens. Nas culturas assim mantidas não houve a ocorrência de modificações morfológicas ou fisiológicas que alterassem as características principais das espécies preservadas. FIGUEIREDO & PIMENTEL (1989) em trabalho de divulgação científica sobre métodos de preservação de fungos em cultura fizeram uma análise sobre o problema das dificuldades da manutenção de culturas de fungos por repicagens periódicas como: contaminações, perda de viabilidade, mudanças fisiológicas de aspecto e coloração; decréscimo ou perda da capacidade de esporulação e declínio ou perda da patogenicidade, etc. Trataram especificamente dos métodos que tem sido empregados para manutenção de fungos fitopatogênicos, ou seja: 1) repicagens periódicas e constantes; 2) óleo mineral; 3) solo e/ou areia; 4) sílica gel; 5) tecidos secos do hospedeiro; 6) água destilada; 7) baixas temperaturas; 8) nitrogênio líquido; 9) liofilização. Entre os diversos comentários sobre os diferentes métodos empregados enfatizam o emprego dos métodos de solo e/ou areia, sílica-gel, água destilada e liofilização. Entre os diversos comentários sobre os diferentes métodos empregados

ênfatisam o emprego dos métodos de solo e/ou areia, sílica-gel , água destilada e liofilização, principalmente os dois últimos, para os quais o laboratório em que trabalham já possui uma infra estrutura organizada. Nos comentários finais sobre o assunto revisado os autores concluíram que os diversos grupos e espécies de fungos variam sua respostas à diferentes técnicas de preservação tanto quanto a viabilidade quanto a estabilidade genética. Relataram também que nenhum dos métodos é abrangente o suficiente para ser aplicado, com sucesso, para todas as espécies fúngicas, porém, aqueles que reduzem e ou paralisam as atividades biológicas do organismo preservado tendem a manter melhor as características originais da cultura selvagem. Estas são as características desejáveis para o patologista.

URDANETA & LACAZ (1965), GARCIA-JOVER & PEREZ (1967) e ELLIS (1979) utilizaram com grande sucesso o método da preservação em água destilada.

Mais recentemente PIMENTEL *et alii* (1980) e MALAVOLTA (1985) também utilizaram este método de fitopatógenos com sucesso.

DE KOMAID, (1988) trabalhando com 290 fungos patógenos humanos ou isolados do solo manteve a viabilidade de 76% dos isolados pelo período de 10 anos sem a ocorrência de processos pleomórficos. Concluiu que o método da água destilada, além de econômico e simples, tem a capacidade de preservar as características originais das culturas preservadas que ficam livres da ação de vapores tóxicos, outros agentes químicos, ácaros ou contaminações.

PICCINI & PASCHOLATI (1993) utilizaram este método com sucesso na preservação de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils por 14 anos.

TUTTE (1969) traz um resumo dos principais métodos utilizados para preservação de fungos fitopatogênicos, e este trabalho foi utilizado para orientar parte dos métodos utilizados no presente estudo.

2.3- CONTROLE PROFILÁTICO

Os melhores profissionais que cultivam cogumelos são invariavelmente aqueles que aprenderam como prevenir e controlar doenças, principalmente as causadas por fungos que vivem diretamente como parasitas dos tecidos dos cogumelos causando mudanças de coloração e deformidades como é o caso de *Verticillium* e de *Mycogone*. Portanto, ainda hoje os grandes conhecedores de técnicas de cultivo de cogumelos são unânimes na ideia de que a melhor maneira de se conter as doenças é a prevenção das mesmas.

Segundo GUILLAUMES & OLIVIER (1981) a profilaxia é a medida mais importante para prevenir a ocorrência de doenças nos cultivos de cogumelos, sem a qual é impossível resolver totalmente o problema micosanitário. Segundo esses autores as medidas gerais a serem aplicadas são frequentemente referidas nas obras especializadas destinadas a informação dos produtores (ATKINS 1952, CHANG & HAYES 1978).

De acordo com os dados publicados por FIGUEIREDO & MUCCI (1985) nos Anais do I Encontro Nacional sobre Cogumelos Comestíveis realizado em Moji das Cruzes, SP em 1981, as recomendações gerais e defesa sanitária preventiva para a cultura de cogumelos incluíam: a) Higiene do local de cultivo; b) Cuidados com a terra de cobertura; c) Cuidados com a fermentação e esterilização do composto; d) Controle das condições de ambiente incluindo temperatura, umidade e ventilação; e) Controle de pragas que disseminem doenças como o caso dos ácaros e das moscas das famílias Sciaridae e Phoridae que vivem no composto e finalmente f) Cuidados com os utensílios e restos de colheita que podem contaminar o ambiente.

WUEST *et alii* (1970) considerando que o solo de cobertura tem sua qualidade afetada por temperaturas muito elevadas (100°C) determinaram o ponto térmico letal de quatro patógenos do cogumelo comestível em solos previamente inoculados e depois tratados com vapor aerado. Variaram as temperaturas entre 43,5° e 82,2° C (110-180°F) com a finalidade de verificar qual o tempo mínimo necessário para esterilizar o solo de cobertura. Trataram os solos por 15 e 30 minutos e verificaram que *Verticillium malthousei* (= *V. fungicola*) entre outros não pode ser reisolado de solos tratados a 54,5°C por 30 minutos.

WUEST & MOORE (1972) demonstraram que o solo de cobertura pode ser esterilizado pela passagem de vapor de água aerado a 54-55°C por um período de apenas 15 minutos em relação a 5 fungos patogênicos a *Agaricus*, inclusive *V. fungicola*. Recomendaram para um tratamento consistente, passagem de vapor a 60°C por 30 minutos. Os mesmos autores (MOORE & WUEST 1973) desenvolveram vários

estudos sobre técnicas de esterilização do solo de cobertura concluindo que a colonização do solo por *Verticillium* era mais dificultada em solos tratados a 60° e 82° C do que a temperaturas mais elevadas como por exemplo à 98°C. A doença era mais insidiosa e a colheita de cogumelos sadios foi menor em solos tratados à 98°C. A ocorrência de doença e a colheita (peso e número de cogumelos) variaram inversamente com as temperaturas utilizadas no tratamento do solo a 60°, 82° e 98°C.

GANDY (1972) fez a importante descoberta de que as regas por aspersão de uma cultura infectada com *Verticillium* realizados com o emprego de uma mangueira produz um aerosol de esporos extremamente infectivos e que a dispersão por ferramentas e luvas dos apanhadores é pouco significativa.

OLIVIER (1987) notou uma clara evolução na situação da sanidade das culturas desenvolvidas em cavernas em várias regiões da França a partir de 1975. Atribuiu a melhora ao grande progresso havido na tecnologia empregada na preparação do composto através de mecanização, uso de pátios de compostagem cimentados que dificulta a contaminação do composto por parasitos e ainda emprego de solo de cobertura de melhor qualidade. Também a introdução de novas práticas na mistura do inoculo (spawn) resultaram no desenvolvimento mais rápido do micélio e conseqüentemente menor oportunidade para contaminação. O autor enfatizou que os cuidados com a sanidade da cultura nunca podem ser relegadas a plano secundário quando se deseja garantir sucesso na produção.

Pretendendo obter dados sobre a epidemiologia e controle da "bolha seca" WONG & PREECE (1987) durante 3 anos (1979-1981) estudaram amostras

de turfa, solo calcário e suprimento de água solo ou composto semeado utilizado por uma propriedade produtora de cogumelos na Inglaterra. O patógeno foi detectado principalmente na turfa e no calcáreo que eram as fontes primárias de infecção. As fontes secundárias foram numerosas tais como cogumelos doentes ou assintomáticos, operadores de colheita, principais pragas como insetos e ácaros. Também detectaram esporos viáveis no ar utilizando um aparelho caça-esporos colocado em diversas posições do espaço interno dos galpões de cultivo em todas as fases da cultura. A carga de esporos no ar aumentava com a idade da cultura.

Para NAIR & MACAULEY (1987), na Nova Zelândia, a maior fonte de *V.fungicola* var. *fungicola* é o solo de cobertura e o estágio da cultura em que a infecção ocorre é o fator mais importante. Uma alta incidência foi notada quando a infecção ocorreu na semeadura e menor quando após o segundo fluxo de produção. Fatores de ambiente também influenciaram na evolução da doença. Assim quando a temperatura do ar foi reduzida de 20 para 14°C e a umidade do ar de 90 para 80% pelo período de 5 dias houve uma notável redução na severidade da doença quando comparada com o controle onde as condições foram mantidas inalteradas. Mesmo quando temperatura de 20°C foi retomada, a severidade permaneceu baixa até o final da cultura.

2.4. CONTROLE QUÍMICO

Até o final dos anos 40, praticamente o único produto químico utilizado para o controle químico da "bolha seca" era o formaldeído. Era empregado na desinfecção de ferramentas, sapatos, luvas e cestas para colheita com o propósito de

evitar a dispersão de esporos ou para desinfecção, do solo de cobertura que é considerado, até hoje, como a principal fonte de infecção (RETTEW & THOMPSON, 1948).

O primeiro fungicida recomendado para o controle de *Verticillium* foi o ditiocarbamato, quimicamente conhecido como etileno bis-ditiocarbamato de zinco (zineb). Por tratar-se de substância insolúvel em água era utilizados na forma de suspensões ou polvilhamento. Os produtos comerciais mais empregados foram o Parzate (Du Pont) e o Manzate-Z 78 (Rohom & Haas). Eram aplicados nas dosagens de 0,05 a 0,1% a cada novo fluxo de produção e mostravam-se promissores, nos anos de 1950, porque tinham alguma eficiência contra a doença, eram pouco tóxicos ao homem e considerados seletivos, dada sua inocuidade ao cogumelo comestível (KLINGMAN, 1950; ATKINS, 1952).

Posteriormente, FEKETE (1967), demonstrou que entre as possibilidades de disseminação da doença causada por *Verticillium*, de frutificações doentes para sadias eram mais importantes as manipulações nas operações de cultivo e os ácaros. Demonstrou ainda que, para reduzir essa dispersão, uma combinação de etileno-bis-ditiocarbamato de manganês (maneb) e etileno-bis-ditiocarbamato de manganês-zinco (mancozeb) poderia ser bastante eficiente e superior a cada um deles quando utilizados separadamente.

WUEST & COLE JUNIOR. (1970) empregando o zineb como fungicida padrão para o controle comercial de *Verticillium*, estudaram o comportamento de dois fungicidas possíveis de serem utilizados para a substituição ao primeiro, o maneb

e o benomil. O patógeno foi desenvolvido em meio de BDA acrescido dos fungicidas a serem ensaiados nos níveis de 1 a 500 µg/g. Não houve evidências sobre a existência de forte resistência ao zineb por qualquer dos isolados experimentados sendo que, apenas ligeiras diferenças foram notadas. O mesmo aconteceu com o maneb. Entretanto, com o benomil (metil 1 (butilcarbamoil)-2-benzimidazole carbamato) a 100 ppm, foram notadas grandes diferenças entre os diversos isolados. O *Agaricus* foi tolerante a todos os fungicidas utilizados.

O espectro fungitóxico dos compostos do benzimidazol, inclusive o benomil foi estudado "in vitro" por EDGINGTON *et alii* (1971) tendo sido verificado que sua toxicidade era variável de acordo com os grupos taxonômicos. No caso dos grupos taxonômicos envolvidos nos objetivos do presente trabalho foi verificado, por exemplo, que *Verticillium albo-atrum* Reink & Bert foi extremamente suscetível a esse fungicida, enquanto o *Agaricus bisporus* foi relativamente pouco sensível com o DE₅₀ respectivamente entre 0,2 a 0,05 ppm e menor que 30 ppm. Foi ainda feita uma comparação do benomil como o tiabendazol (2-(4-tiazolil)-benzimidazol e o furil benzimidazol (2-(2-furil) benzimidazol) os quais revelaram as mesmas características. Os autores concluíram que a toxicidade seletiva dos três compostos fungicidas dependeriam da porção benzimidazol da molécula.

SNEL & FLETCHER (1971) pesquisaram os compostos benomil e tiabendazol para o controle das doenças do cogumelo comestível, inclusive para o controle da "bolha seca". Basearam-se principalmente nos trabalhos de EDGINGTON *et alii* (1971) que haviam demonstrado a ação seletiva desses fungicidas para certos grupos de fungos parasitas enquanto a maioria dos basidiomicetos eram pouco sensíveis.

Foi verificado que o benomil foi duas vezes mais tóxico para os fungos parasitas do cogumelo: *Dactilium dendroides*, *Mycogone perniciosa* e *V.malthousei* (= *V.fungicola*) enquanto era pouco ativo para a maioria dos basidiomicetos. A margem seletiva do tiabendazol foi maior e, finalmente, que nenhum dos dois fungicidas atrasou ou diminuiu a produção de esporóforos (pileos) em testes "in vivo". Nos experimentos realizados, 80% dos cogumelos das parcelas testemunha estavam doentes. O controle pelo benomil foi estimado entre 35 e 40% quando o tratamento foi feito a razão de 5 ppm e completo na razão de 10 ppm. Em um bioensaio com cogumelos desenvolvidos em vasos tratados com benomil, estes não revelaram traços do fungicida e tampouco seu produto de decomposição o MBC (carbendazim), demonstrando que o *Agaricus* não absorve o fungicida. Concluíram então que o produto poderia ser utilizado para o controle das doenças do cogumelo.

HOLMES *et alii* (1971) demonstraram que o benomil era capaz de controlar a doença causada no cogumelo comestível por *Verticillium malthousei*. Os ensaios foram realizados em cultivos comerciais com infecção natural e em cultivos experimentais artificialmente inoculados. O fungicida foi utilizado na forma de pulverização de suspensões aquosas imediatamente após a distribuição do solo de cobertura variando os intervalos de tempo. Em experimentos comerciais, uma simples aplicação do fungicida a 0,25 libras/100 galões após a colocação do solo de cobertura foi suficiente. Em testes piloto, o controle quase completo, foi obtido com a dosagem de 5,76 gramas/galão em 4 aplicações, mesmo quando os níveis de inoculo foram bastante altos.

WUEST *et alii* (1972) estudaram a influência do benomil na formação dos basidiocarpos e na produção de várias linhagens comerciais do cogumelo

comestível em cultivos livres da doença. O substrato de crescimento foi o esterco de cavalo e o benomil foi aplicado na forma de pó molhável contendo 50% do princípio ativo nas dosagens e intervalos regularmente utilizada para o controle de doenças. Em nenhuma das combinações ensaiadas a produção sofreu redução para qualquer das linhagens utilizadas. Em uma delas a tendência foi para o aumento de produção. Somente em dosagens muito elevadas houve decréscimo de produção ($\pm 0,84$ g/l).

O primeiro relato sobre a resistência de *Verticillium* ao benomil foi feito por WUEST *et alii* (1974) que estudaram três isolados de *V.malthousei* identificados como ML2, ML4 e BC 69 em relação a tolerância a esse fungicida. As respostas dos isolados foram avaliadas pelo crescimento linear das colônias desenvolvidas em meio de BDA contendo o fungicida. Os resultados foram consistentes. O isolado ML2 foi benomil-tolerante enquanto que os outros dois ML4 e BC69 foram sensíveis. Quando esporóforos de *A.bisporus* foram mergulhados no benomil e depois inoculados com os isolados os resultados coincidiram com os testes "in vitro". Entretanto, o isolado ML2 não foi um patógeno agressivo ou virulento sugerindo-se que esse isolado benomil-tolerante tenha pouca significância epidemiológica. Os autores também referiram-se ao fato de que o isolado ML2, resistente, foi obtido anteriormente a introdução do uso do benomil. Portanto, uma vez que o isolado ML2, proveniente da população natural de *V.malthousei* pode ser tolerante, esses isolados tolerantes poderiam-se constituir em uma ameaça para culturas nos locais onde *Verticillium* fosse controlado pelo benomil.

GANDY & SPENCER (1974) revelaram que nessa ocasião, o maior problema da sanidade dos cultivos era a ocorrência da tolerância ao benomil revelada por *Verticillium malthousei* (= *V.fungicola*), que estava causando consideráveis

prejuízos. Segundo esses autores, que fizeram um retrospecto do que vinha ocorrendo, o benomil tinha tido um sucesso tão grande que havia levado os produtores a negligenciar os cuidados de profilaxia. Esse fato já havia sido alertado por GANDY em 1972. Depois da primeira constatação da tolerância de *Verticillium* ao benomil feita por WUEST *et alii* (1974), que encontraram linhagens naturalmente tolerantes em populações do patógeno, foi notado que cada vez que o fungicida era usado, os indivíduos suscetíveis eram eliminados e os tolerantes sobreviviam. A pressão de seleção exercida pelo fungicida pelas sucessivas aplicações do benomil modificou a reação entre linhagens tolerantes e suscetíveis. Assim as populações tolerantes tornaram-se maioria. Por outro lado, segundo SEILER (1972) o benomil é um produto mutagênico para fungos e as aplicações repetidas não somente selecionam linhagem para resistência como também desenvolvem novas linhagens resistentes por mutação. Segundo GANDY & SPENCER (1974) não há dúvidas de que o sucesso dos fungicidas benzimidazois teria levado a uma redução geral nos padrões de higiene em muitas propriedades. No entender desses mesmos autores onde ocorre o fenômeno da tolerância, as velhas noções de higiene deveriam ser cuidadosamente retomadas e reaprendidas como a única forma de controlar a doença até que novos produtos fossem recomendados.

De acordo com trabalhos de LAMBERT & WUEST (1975) contídios de quatro isolados de *V.malthousei* tolerantes ao benomil foram mais sensíveis a solução de zineb com cerca de 20 µg/ml (i.a.) do que quatro isolados sensíveis ao mesmo produto. Uma redução equivalente da germinação dos esporos ocorreu com a metade da concentração de zineb do que aquelas requeridas pelas linhagens sensíveis de benomil. No entender dos autores os fatos se interrelacionam, ou seja, tolerância ao benomil leva a sensibilidade ao zineb.

De acordo com GAZE & FLETCHER (1975) um levantamento nacional sobre doenças do cogumelo foi realizado na Inglaterra pela "ADA" (Plant Pathologists and Mushroom Advisers) durante o outono e inverno de 1974-1975. A principal finalidade foi estabelecer uma avaliação dos problemas de doenças e da incidência de linhagens de *Verticillium*, *Mycogone* e *Dactylium* resistentes ao benomil. O levantamento foi realizado através do envio de um questionário a ser preenchido pelos produtores, da coleta de material e realização de testes de tolerância em particular ao Benlate (benomil). *V.fungicola* produzindo a bolha seca ou manchas nos pileos foi registrado em 50% das propriedades e em 33% a incidência foi considerada severa com perdas ao redor de 10%. A falha no controle foi sempre atribuída a tolerância ao tiabendazol e ao tiofanato metílico que era o mesmo fenômeno que ocorria em relação ao benomil. De 229 isolados estudados e coletados em todo o país 85 tinham o DE₅₀ entre 0,5 ppm; 20 de 5 a 50 ppm e 124 de 50 a 500 ppm.

Conforme referido por JALALI & ANDERSON (1976), corpos de frutificação de *A.bisporus* desenvolvidos em condições de cultivo comercial em substratos tratados com 10 µg/g de benomil em diferentes estágios de cultivo mostraram conter de 0,67 a 3,7 µg de resíduos de benomil. Cogumelos de substratos tratados por encharcamento contiveram as maiores concentrações (3,7 µg) de resíduos enquanto que aqueles tratados pela mistura do benomil como material de semeadura contiveram o mínimo (0,67 µg). Embora, a translocação do micélio vegetativo para os corpos de frutificação tenha ocorrido, não houve indicação de que houvessem resíduos nos cogumelos colhidos.

Em um estudo realizado por FLETCHER & YARHAN (1976), de 299 isolados de *V.fungicola* examinados, 63% mostraram alguma tolerância ao benomil e 53% foram muito tolerantes tendo o ED₅₀ acima de 50 ppm. Houve uma tendência para que os isolados tolerantes tivessem a razão de crescimento menor do que a das linhagens sensíveis em BDA livres de fungicida e 19% mostraram-se estimulados por benomil a 5 ppm. Não houve diferenças significativas em 10 isolados de *V.fungicola* ensaiados com benomil a 5 ppm. Não houve diferenças significativas em 10 isolados de *V.fungicola* ensaiados com benomil, TBZ e tiofanato metílico em ágar ou de 12 isolados comparados entre si crescidos em benomil e hidrocloreto de carbendazim (MBC). Linhagens tolerantes a *V.fungicola* estão relacionados com níveis altos de perdas na região leste e norte da Inglaterra. No levantamento, benomil era empregado em 89% dos cultivos, 55% em pulverização e 34% no solo de cobertura ou 10 % em ambos.

GANDY & SPENCER (1976) demonstraram que o Daconil (clorotalonil) a 75% de p.a. era capaz de reduzir a incidência de *V. fungicola* tolerantes aos benzimidazois em cogumelos. O controle obtido foi superior àquele conseguido com o zineb pois além de requerer apenas uma aplicação não houve alteração da cor dos esporóforos. Entretanto, quando incorporado ao solo de cobertura, foi tóxico para a cultura e reprimiu a produção. Em locais onde a tolerância não é problemática o benomil proporcionou um controle superior ao clorotalonil.

GANDY & SPENCER (1978) compararam cinco fungicidas entre os quais o clorotalonil, o oxicarboxin, benodanil e o piracarbolid para o controle de *V. fungicola* em 6 linhagens do cogumelo comestível. As linhagens mostraram grandes diferenças em relação a sensibilidade aos fungicidas e também na sensibilidade à

infecção. Esses são fatores complicadores quando se deseja comparar fungicidas. Entretanto, o benodanil foi menos efetivo do que o clorotalonil contra *V.fungicola*.

SAMUELS & JOHNSTON (1980), na Nova Zelândia isolaram *V.fungicola* e *V.psalliotae* de cultivos comerciais de cogumelos (*A.bisporus*) onde o benomil foi usado como principal método de controle. Em testes "in vitro" os isolados mostraram baixos valores para o ED₅₀ (0,8-2,1 µg/ml) quando feito pela determinação do crescimento radial das culturas em agar malte, altos valores ED₅₀ (maior que 500 µg/ml). Em um experimento em escala piloto, isolados de *V.fungicola* e *V.psalliotae* obtidos de cogumelos doentes depois da introdução do benomil foram patogênicos e não controlados pelo benomil. O fungicida Delsene MX (carbendazim) proporcionou um controle melhor mas não deve ser recomendado para o controle da bolha seca porque deprime demasiadamente o desenvolvimento dos cogumelos.

Segundo, ZAAYEN & ADRICHEN (1982) em experimentos realizados em bandejas com espécies de *Agaricus* inoculados verificaram que o complexo manganês-procloraz pó molhável com 50% de p.a. controla satisfatoriamente os quatro patógenos mais importantes de *A.bisporus* e *A.bitorquis* que são : *V.fungicola* var. *fungicola* causador da bolha seca, *Mycogone perniciosa*, da bolha úmida, *Cladosporium dendroides* Link ex. Fries, do mal da teia e *V.fungicola* var. *aleophilum* agente da mancha marrom. O produto não foi tóxico para qualquer das duas espécies de *Agaricus* nas dosagens recomendadas e o sabor dos cogumelos também não foi alterado pelo procloraz. Aplicações de 1,5 g de principio ativo por m², nove dias depois do solo de cobertura ser distribuído foi a dosagem preferida devido aos níveis de resíduos. Com

concentrado emulsionável a 45% do produto sem manganês foi ligeiramente tóxico aos cogumelos em uma dosagem menor do que o pó molhável.

FLETCHER *et alii* (1983) compararam a ação de diversos fungicidas no controle da bolha seca, da bolha úmida (*M.perniciosa*) e do mal da teia (*Hypomyces rosellus* (Albertini & Schwein.) Tul.) teleomórfo de *Dactylium dendroides*. O procloraz+ Mn proporcionou significativa e consistentemente um melhor controle de linhagens resistentes ao benomil de *V.fungicola*. O captafol mostrou algum efeito na redução da doença. O benomil, o tiabendazol e o procloraz, todos demonstraram-se eficientes no controle da bolha úmida e do mal da teia. Os resíduos de procloraz foram estimados por processo de cromatografia à gás após extração com acetona e purificação através do processo de separação por solventes. Esse processo recupera de 77 a 98% do procloraz adicionado puro sobre os esporóforos de *Agaricus*. Os resíduos nos esporóforos foram pouco significativos. Concluíram que o procloraz era um fungicida efetivo para o controle das principais doenças fúngicas do cogumelo, particularmente para o problema de linhagens de *V.fungicola* resistentes ao benomil.

CHALLEN & ELLIOTT (1985) trabalharam com 16 diferentes fungicidas na interação *A.bisporus* x *V.fungicola* verificando que quatro compostos: benodanil, carboxin, imazilil, e tridermorf respectivamente, pó molhável, pó molhável, emulsão concentrada e emulsão concentrada, eram capazes de inibir o crescimento de ambos organismos. Esses fungicidas já haviam, previamente, demonstrado ter a capacidade de reduzir a doença "in vivo". Concluíram que esses fungicidas poderiam ser utilizados em programas de melhoramento de cogumelos baseado em resistência induzida à fungicidas.

EICKER (1987), do departamento de Botânica da Universidade de Pretória na África do Sul, publicou um trabalho completo sobre o controle das doenças fúngicas do cogumelo comestível naquele país. Segundo esse autor o uso do procloraz-complexo-manganês, pó molhável com 50% de p.a. foi satisfatório no controle dos dois mais importantes patógenos do cogumelo na África Sul : *V. fungicola* var. *fungicola* e *Mycogone perniciosa*. Esses resultados foram obtidos em cultivos comerciais e também em experimentos piloto com inoculações artificiais das camas de produção realizadas na Universidade de Pretória. Duas aplicações de fungicidas foram feitas para cada cultivo: 1,5 g de princípio ativo (p.a.) por m² nove dias após a colocação do solo de cobertura e uma aplicação similar no fim da colheita do primeiro fluxo de produção. A atividade do fungicida foi determinada "in vitro" para os dois patógenos. Para *V. fungicola* o valor do DE₅₀ foi cerca de 2 mg/dm³ e para *Mycogone* foi menor que 0,01 mg/dm³. O fungicida foi considerado não tóxico para *A. bisporus* e quando utilizado adequadamente proporciona um valor de resíduos baixos e bastante aceitável.

Experimentos de laboratório realizados por NAIR & MACAULEY (1987) demonstraram que vários isolados de *V.f.f.* e *V.f.a.* foram resistentes ao Benlate (benomil) e ao Tecto 90 (TBZ). Entretanto, todos os isolados patogênicos desses fungos tiveram baixos valores de DE₅₀ quando tratados pelo procloraz (menor do que 2 ppm). Esses autores obtiveram uma DE₅₀ para *A. bisporus* entre 20 a 30 µg/ml. A bolha seca de *A. bisporus* e *A. bitorquis* foram controlados pela aplicação de procloraz-complexo de manganês (50% de p.a.) pó molhável no solo de cobertura na razão de 1,5 g/ (i.a.) × m⁻². Nessa concentração os níveis dos resíduos de procloraz nos esporóforos estiveram abaixo do limite máximo (MRL) estabelecido para cogumelos na Austrália.

SOHI (1985) relata que os benzimidazóis são efetivos, a princípio, mas que o patógeno rapidamente desenvolve resistência e que o procloraz-Mn quando utilizados em pulverizações produz um controle efetivo da doença.

Embora não seja de nosso conhecimento a existência de qualquer experimento oficial com fungicidas, que tenha dado origem a trabalhos publicados na literatura nacional, o único produto registrado no Ministério da Agricultura para o controle de doenças do cogumelo comestível de acordo com GELMINI & NOVO (1987) é o benomil. Este fungicida é classificado nesse Ministério como produto moderadamente tóxico, ou seja, classe III.

2.5. CONTROLE ALTERNATIVO.

A partir do final da década dos 70, com o desenvolvimento e ampliação dos movimentos ecológicos e de defesa do ambiente, aumentaram as preocupações com o emprego de defensivos agrícolas, principalmente praguicidas e fungicidas. A atividade dos produtores de cogumelos, cujas colheitas são realizadas praticamente todos os dias, não ficaram livres dessas pressões. Despertou-se então o interesse pelo desenvolvimento de métodos de alternativos de controle e que estivessem em maior harmonia com o ecossistema do cogumelo comestível.

Dessa forma, OLIVIER *et alii* (1978) estudaram a evolução microbiológica dos solos de cobertura utilizados na França em relação ao

desenvolvimento de *V.fungicola* e de algumas bactérias, verificando que nas condições usuais do cultivo em cavernas havia um aumento no número de bactérias gram negativas, especialmente *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula. Nessas condições, o nível de populações de diferentes espécies de fungos parasitos ou competidores se mantém baixos até o terceiro fluxo de esporóforos. Dois fatores de inibição de *Verticillium* foram determinados e estudados: A fungistase microbiológica e a ação de produtos voláteis do composto colonizado. De acordo com os resultados obtidos duas idéias foram discutidas e analisadas : a capacidade de certas bactérias do composto se transferirem para o solo de cobertura com o micélio do cogumelo e o valor dos métodos biológicos no controle de parasitos do cogumelo.

OLIVIER (1987) referiu-se ao fato de que existem possibilidades de controlar biologicamente *V.fungicola* pelo emprego de espécies não patogênicas de *Trichoderma*, aplicado por pulverização de suspensão de esporos. O problema encontrado foi que essas pulverizações, devido, provavelmente, a elevação da umidade, causou um aumento da mancha marrom de *Pseudomonas tolaasii* Paine, o que impediu sua utilização em maior escala.

Segundo KALBERER (1984), *V.fungicola* é o patógeno mais importante do cogumelo cultivado e, nos Estados Unidos, as perdas são estimadas em pelo menos 10% da produção total do país. Fungicidas como o procloraz e o clorotalonil são usados para o controle de *V.fungicola* mas segundo esse autor, é muito difícil encontrar fungicidas seletivos que destruam ou inibam os fungos patogênicos mas que não afetem o cogumelo cultivado, sendo necessário uma busca de novas fórmulas de combate. Os novos métodos poderiam ser baseados na biologia e bioquímica do patógeno e mais

particularmente no mecanismo de ataque do patógeno. Para ele as primeiras ações do *Verticillium* em sua interação de parasitismo com o *Agaricus* são de grande interesse porque este se torna uma fonte de nutrientes para o patógeno. Por esse motivo o autor interessou-se pelas enzimas e toxinas extracelulares produzidas pelos esporos em germinação e pelo micélio em crescimento de *V.fungicola*. Determinou pelo menos uma enzima proteolítica de alta estabilidade térmica que poderia ser uma resinase protease. Essa enzima "abre" as células do hospedeiro para permitir a invasão do patógeno. O autor acha que esse tipo de estudo poderia auxiliar muito a seleção de linhagens melhoradas geneticamente resistentes a *Verticillium*.

Como se verifica, o número de trabalhos sobre o controle biológico dos parasitas do cogumelo cultivado é ainda muito pequeno e supõe-se que mais trabalhos deverão ser desenvolvidos, nessa área, em um futuro próximo.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos isolados.

Os isolados foram obtidos a partir de levantamento efetuado na Região de Moji das Cruzes - SP, durante 3 anos, compreendendo o período de meados de 1985, até meados de 1987. Amostras de cogumelos comestíveis do tipo "champignon" (*Agaricus bisporus*), provenientes de várias pequenas propriedades produtoras daquela região, apresentando manchas no píleo, fendilamentos no estipe ou suspeita de "bolha seca" foram coletados em sacos plásticos. Os materiais, por serem bastante perecíveis, foram trazidos no mesmo dia aos laboratórios da Seção de Micologia do Instituto Biológico na cidade de São Paulo e submetidos a exames sob estereomicroscópio. Os cogumelos que apresentavam manchas, rachaduras, fendilamentos, que são características da doença, foram colocados em condições de câmara úmida por 24 horas dentro de cristalizadores de 20 cm de diâmetro por 4,0 cm de altura para promover o desenvolvimento das estruturas do patógeno. Os que apresentavam rachaduras na região do estipe foram partidos ao meio para verificar a presença de estruturas do patógeno em seu interior (conidióforos). Ainda sob o estereomicroscópio foram feitas transferências de pequenas partes de material infectado ou das estruturas desenvolvidas em câmara

unida para placas de Petri contendo meio de ágar-água (AA) . Após verificação de crescimento micelial as estruturas eram transferidas para meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), contidos em placas de Petri. Após purificação das culturas e constatação através de exames à nível de microscopia ótica, de estruturas características de fungos pertencentes ao gênero *Verticillium*, essas culturas foram transferidas para tubos de ensaio contendo BDA. As culturas purificadas foram armazenadas para utilização posterior e para isso submetidas a diversos tipos de preservação .

3.2. Preservação das Culturas de *Verticillium*.

Vários métodos de preservação de fungos foram empregados, visando a manutenção da viabilidade e das características originais dos isolados durante todo o período de desenvolvimento dos estudos. Esses métodos foram os seguintes: a) repicagens periódicas, b) conservação em solo, c) sílica-gel, d) água destilada e e) liofilização.

3.2.1. Repicagens periódicas (Método Clássico)

A manutenção dos isolados foi feita pelo método tradicional mediante repicagens sucessivas em meio de BDA , contido em tubos de ensaio de 18 cm de comprimento × 1,8 cm de diâmetro, tamponados com algodão hidrófilo e mantidos a temperatura ambiente 20 ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). O intervalo de tempo entre repicagens foi de 3 meses. Após cada repicagem as culturas eram examinadas quanto a suas características morfológicas e comparadas com a cultura original.

3.2.2. Método de Conservação em Solo.

Para este método foi utilizado solo rico em M.O. (turfo) e areia em diferentes proporções resultando em cinco diferentes tratamentos ou misturas adotando-se o seguinte procedimento: Uma porção de solo rico em M.O. parcialmente peneirado foi submetido a tratamento térmico por três horas à 80 °C. A areia, previamente lavada para retirada de impurezas foi submetida à secagem em forno Pasteur por três horas à 180 °C. Para cada tratamento/isolado foram realizadas 4 repetições. Feitas as misturas de acordo com as proporções constantes da **Tabela 1** foi calculada a capacidade de campo (C.C.) de cada mistura, com a finalidade de se conhecer a quantidade de suspensão de inóculo a ser adicionada às mesmas conforme referido por TUTTE (1969). Após a secagem das amostras foi colocada uma quantidade conhecida de cada mistura em funil de vidro contendo papel de filtro pré umedecido. Para cálculo da capacidade de campo uma quantidade de água era então adicionada lentamente com o auxílio de uma pipeta graduada, até atingir o ponto de saturação, que é indicado pelo gotejamento de água pelo vértice do funil. A capacidade de campo (C.C.) ou ponto de saturação é aproximadamente igual a quantidade de água retida pelo volume de solo da amostra.

Para o preparo das culturas em solo foram utilizadas 7 gramas de cada mistura por tubo de ensaio e 4 repetições para cada isolado a ser preservado. Os tubos foram autoclavados a 120°C a 1 atm. por 30 minutos. As inoculações foram feitas preparando-se suspensões aquosas de conídios de cada um dos isolados a ser preservado

a partir de culturas puras cultivadas em placas de Petri. A concentração aproximada das suspensões foi de 10^5 esporos $\times$ ml⁻¹ e a cada tubo foi adicionada uma quantidade de suspensão equivalente a 25% da capacidade de campo da mistura, conforme recomendado por TUTTE (1969). A Tabela 1 contém a capacidade de campo obtida para cada amostra e a quantidade de suspensão utilizada por tubo. Os tubos de ensaio assim preparados foram fechados com tampos de algodão hidrófilo e mantidos a temperatura ambiente. Para este experimento foram escolhidos 7 isolados: 280-H, 290-H, 295-H, 296-H, 297-H, 300-H e 301-H. A viabilidade dos isolados foi verificada a cada 30 dias retirando-se assepticamente uma pequena quantidade de solo dos tubos e semeando-se em placas de Petri contendo meio de BDA. Quando o fungo se desenvolvia na placa, a cultura era examinada quanto a suas características gerais comparadas com as do isolado original. Por esse método cada tubo pode ser utilizado várias vezes para obtenção de sub-culturas uma vez que a quantidade de solo semeada é diminuta.

Tabela 1- : Proporções do substrato utilizado, capacidade de campo expressa em % de água e quantidade de suspensão utilizada por C.C.

Tratamentos	Capacidade de campo (C.C.)	Suspensão de inóculo adicionada em cada tubo
100% Solo	71,42 %	1,25 ml
75% Solo + 25% Areia	63,28%	1,10 ml
50% Solo + 50% Areia	55,28%	0,96 ml
75% Areia + 25% Solo	47,28%	0,82 ml
100% Areia	39,20%	0,68 ml

3.2.3.Método de Silica-Gel

Utilizou-se a metodologia recomendada por PERKINS (1962) e citada por TUTTE (1969). Foram empregados frascos de 6 cc. do tipo utilizado para embalagem de vacinas ou antibióticos. Cada frasco foi preenchido com cerca de 3 g de silica gel com grânulos de 6-12 meshes, previamente desidratados e esterilizados a 180°C por 3 horas em forno tipo Pasteur. Foram preparadas 4 amostras para cada isolado. A inoculação dos frascos foi feita com suspensões de esporos com concentrações aproximadas de 10^5 esporos $\text{ml} \times^{-1}$ misturadas com 5% de leite desnatado tipo "longa vida". Para esterilização do leite, este foi autoclavado por 10 minutos à 130°C, tempo suficiente para esterilização e curto o bastante para evitar a caramelização. Foram escolhidos para esses experimentos 8 isolados: 281-H, 293-H, 296-H, 297-H, 299-H, 300-H, 301-H e 304-H. As suspensões foram adicionadas na quantidade necessária para umedecer 3/4 da silica-gel dos frascos. Como o umedecimento, da silica-gel desidratada produz uma reação exotérmica com grande desprendimento de calor. Para evitar comprometimento da viabilidade dos conídios, nessa operação, os frascos foram submetidos à banho frio através da utilização de um recipiente contendo água e pedras de gelo. Depois da adição das suspensão os tubos foram testados, quanto a viabilidade, devido ao desprendimento de calor e, se viáveis, guardados no laboratório a temperatura ambiente. As leituras com relação a viabilidade e outras características foram feitas periodicamente abrindo-se os vidros e semeando-se os grânulos de silica da mesma forma como foi feito para o método do solo.

3.2.4. Métodos da Água Destilada ou de Castellani.

Para este método foram utilizados os procedimentos recomendados por CASTELLANI (1939) e FIGUEIREDO (1967). Os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio de BDA a 2%. Quando as culturas tinham cerca de 10 dias, fase de grande atividade metabólica, pedaços de cerca de 1 cm de diâmetro contendo meio de cultura e o fungo a ser preservado foram retirados, da zona mais jovem da colônia em crescimento com o auxílio de um vazador circular e transferidos para frascos de vidro do tipo normalmente utilizados para vacinas, com 6 ml de capacidade contendo cerca de 4 ml de água destilada esterilizada. Depois os frascos foram fechados com tampos de borracha previamente esterilizados e depois lacrados com tampas de alumínio, para evitar qualquer tipo de contaminação ou evaporação de água. Os exames para viabilidade e características gerais dos isolados foram feitos a cada mês retirando-se uma porção do material fúngico contido nos recipientes e semeando-os em placas de Petri com meio de BDA. Os treze isolados obtidos no levantamento foram utilizados neste experimento.

3.2.5. Liofilização.

A associação dos métodos de desidratação e congelamento sob condições de vácuo denomina-se liofilização. Foram liofilizadas 8 ampolas de cada isolado, mediante o seguinte procedimento: os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio de BDA e quando as colônias apresentavam cerca de 15 dias de idade, foram preparadas suspensões de esporos em solução de sacarose a 7% e solução de peptona a 7%, na proporção de 4:1. A seguir, aliquotas de 0,3 ml das suspensões, foram

distribuídas em ampolas de vidro com capacidade para 0,5 ml contendo cada, uma pequena tira de papel absorvente de 4 × 30 mm esterilizado que absorvem parte da suspensão durante o processo de desidratação, e submetidas à vácuo (pressão final 10^{-3} Torr.) durante 6 horas em liofilizador Virtis. Após o processo as ampolas foram seladas a vácuo com o auxílio de um maçarico. Após a liofilização, uma ampola de cada um dos isolados foi aberta, e feita a semeadura do material em BDA para verificar se os esporos haviam sobrevivido ao processo de liofilização. Em caso positivo, as ampolas restantes de cada isolado foram estocadas à temperatura ambiente. Em caso negativo houve necessidade de se repetir o processo. Para a verificação da eficiência do processo de liofilização, a cada 12 meses era aberta uma ampola e a pequena tira de papel contendo conídios liofilizados era colocada em placas de Petri contendo meio de BDA. Após o crescimento as culturas foram examinadas quanto as suas características gerais. Exceto o isolado 367-H, obtido mais recentemente, todos os demais foram submetidos ao processo de liofilização. Alguns dos isolados já haviam sido previamente liofilizados e anexados ao acervo de Coleção de Culturas da Seção Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico desde 1985.

3.3. Estudos Micológicos

3.3.1. Meios de Cultura

Foram os seguintes os meios de cultura utilizados para os estudos micológicos e fisiológicos.

Batata dextrose ágar (BDA)

Batatas descascadas (infusão)	250 g
Ágar	1,5g
Dextrose	20g
Água Destilada	1 l

Extrato de Malte Ágar (EMA)

Extrato de Malte Ágar	25g
Ágar	20g
Água Destilada	1 l

Meio de Ágar Água (AA)

Ágar	20g
Água Destilada	1 l

Meio de Aveia Ágar (MAA)

Aveia	60g
Ágar	20g
Água Destilada	1 l

3.3.2. Preparo de micro culturas

Considerando que as estruturas reprodutivas de fungos do gênero *Verticillium* apresentam-se livres, ou seja, não estão inseridas dentro de corpos de frutificação e também, por se tratarem de estruturas muito delicadas e fáceis de serem destruídas pelo simples manuseio no preparo de lâminas comuns para microscopia, houve a necessidade do preparo de micro culturas. Esse método permite que os espécimens possam ser estudados "in situ" com uma melhor visualização das diferentes estruturas possibilitando estudos morfológicas mais detalhados como: disposição e inserção dos conidióforos, maneira como os esporos são produzidos (ontogenia) contagem dos verticilios, dimensionamento das fiálides, etc.

As micro culturas foram preparadas conforme preconizado por HAWKSWORTH (1974) com pequenas modificações, adotando-se a seguinte metodologia: Placas de Petri contendo meios de AA, BDA, EMA e MAA foram inoculados ao centro com os isolados a serem estudados. Quando as culturas

apresentavam cerca de 2 a 3 cm de diâmetro, o que ocorre com cerca de 7 a 10 dias, dos bordos da cultura foram recortados pequenos pedaços quadrados com cerca de 5×5 mm e 2 mm de altura com o auxílio de uma agulha lanceolada esterilizada. Esse pequeno pedaço foi transferido para o centro de uma lâmina para microscopia previamente limpa e esterilizada e o conjunto colocado dentro de uma placa de Petri forrada com papel de filtro também esterilizado e umedecido. Sobre o pedaço de ágar foi então assentada uma laminula esterilizada para microscopia de 2×2 cm, e a placa tapada, colocada em câmara de temperatura controlada para $21 (\pm 1^\circ\text{C})$ por 48 horas. Nessas condições, o fungo se desenvolve e as hifas e conidióforos ficam aderidos à laminula que pode ser removida levando consigo as estruturas a serem examinadas. Após essa operação a laminula é então colocada sobre uma nova lâmina, contendo uma gota do corante apropriado (lactofenol com azul de algodão). O corante pode também ser adicionado sob a laminula após o assentamento do mesmo sobre a lâmina com o auxílio de um capilar de vidro. Depois as lâminas foram examinadas ao microscópio ótico ($400\times$). As medições foram feitas com o auxílio de uma ocular micrométrica.

3.3.3. Aspectos morfológicos

As características morfológicas das linhagens ou isolados de *Verticillium* spp foram estudadas e os dados obtidos comparados com as descrições relatadas na literatura internacional pertinente (WARE 1933, BRADY & GIBSON 1976, BRADY & WALLER 1976, GAMS & ZAAYEN 1982) com o propósito de identifica-

los a nível de espécie. Com esta finalidade foram preparadas micro culturas de todos os isolados. Detalhes do preparo de micro culturas são apresentadas no item 3.3.2 .

Para os estudos acima referidos foram feitas observações sobre a disposição e hábito dos conidióforos, número de verticílios ("whorls"), medições das fíalides (comprimento e largura) da base e do topo e observação sobre o hábito (maneira como ficam agrupados) dos conídios, sua morfologia e dimensões (comprimento e largura) .Assim, foram tomadas amostras de 20 (vinte) exemplares de cada tipo de estrutura para cada isolado, visando obtenção dos dados morfológicos e cálculo médio das medidas efetuadas. As lâminas foram preparadas em lactofenol e coradas com azul de algodão. As observações e medições foram feitas a nível de microscopia ótica em magnitude de 100 e 400 $\times$.

A documentação científica foi realizada com o auxílio de uma câmara Nikon modelo M 35-S adaptada a um microscópio Standard da Zeiss por um adaptador Nikon AFM. O filme empregado foi o Ektachrome 64 T, EPY 135-36 da Kodak para diapositivos. Os diapositivos foram depois utilizados para o desenvolvimento de fotos coloridas ou em branco e preto pelo processo direto.

3.4. Estudos Fisiológicos

3.4.1. Determinação da curva de crescimento e do ótimo de temperatura.

Para determinação da temperatura ótima para o desenvolvimento vegetativo dos isolados de *Verticillium*, discos de meio de cultura (BDA) contendo micélio, de 7 mm de diâmetro, foram recortados dos bordos de colonias com cerca de 15 dias de idade com o auxílio de um furador de rolhas e transferidos para o centro de placas de Petri de 90 × 20 mm contendo 20 ml de meio de cultura. Foram utilizados 3 meios de cultura (BDA, MAA e EMA), 12 isolados, 8 temperaturas e 4 repetições por tratamento num total de 384 placas para cada meio de cultura. As temperaturas utilizadas foram 12°, 15°, 18°, 21°, 24°, 27°, 30° e 33°C com precisão de $\pm 1^\circ\text{C}$. As culturas foram mantidas nas câmaras de temperatura controlada até que aquelas mantidas à temperatura de melhor crescimento atingissem desenvolvimento equivalente ao diâmetro da placa de Petri o que ocorreu depois de 10 dias quando procedeu-se a leitura do diâmetro médio das culturas. Com os dados obtidos foram construídos os gráficos e determinadas as curvas de crescimento e os ótimos de temperatura para o crescimento micelial. O meio de Extrato de Malte (EMA) foi empregado com a finalidade de utilizar a técnica e os parâmetros usados por ZAAZEN & GAMS (1982) na separação de espécies e variedades de fungos do gênero *Verticillium* patógenos de cogumelos cultivados, através do ótimo de temperatura.

3.4.2. Determinação da capacidade de esporulação.

A capacidade de esporulação de 9 isolados em meios de BDA e MAA, foi comparada em 8 diferentes temperaturas. As temperaturas utilizadas foram 12°, 15°, 18°, 21°, 24°, 27° 30° e 33°C em regime de ausência de luz. Para isso

procedeu-se da mesma maneira que para os ensaios de crescimento quanto a inoculação das placas (vide item 3.4.1) transferindo-se discos de 7 mm de diâmetro de meio de cultura contendo o fungo retirados dos bordos de colônias contidos em placas de Petri com 12 dias de idade. Para cada isolado/temperatura foram utilizadas 4 repetições. As leituras foram feitas depois de 15 dias, adicionando-se às placas 10 ml de água destilada contendo 0,01% de solução de Tween 20 para favorecer a liberação dos conídios. A liberação dos conídios foi ainda facilitada raspando-se suavemente a superfície das colônias com a auxílio de uma alça de Drigalsky. O cálculo da concentração das suspensões obtidas foi feito ao microscópio ($\times 400$) com o auxílio de uma câmara de Neubauer e os resultados obtidos consistiram na média aritmética de 4 repetições.

3.4.3. Efeito da Alternância de Temperaturas

Este ensaio teve por finalidade estudar o efeito de oscilações de temperaturas altas e baixas sobre *Verticillium* e, cujo manejo, poderia ser utilizado para controlar a doença por ele causada. Para isso foi montado um experimento da maneira como segue, conforme sugerido por FIGUEIREDO (1972): O isolado 281-H, considerado como representativo da maior parte da população dos 12 obtidos, foi repicado para 28 placas de Petri contendo meio de BDA. A técnica de repicagem empregada foi a mesma utilizada para os ensaios de crescimento a diferentes temperaturas. Após a repicagem todas as placas foram colocadas na câmara de temperatura regulada para 24°C que é considerado o ótimo para crescimento vegetativo, aí permanecendo por 48 horas. Depois desse período 4 placas foram mantidas permanentemente nessa temperatura considerada como temperatura base (controle), enquanto que as outras também em grupos de 4 repetições foram transferidas diariamente, por 8 horas, para temperaturas mais baixas, ou

mais altas ou seja, para 12°, 15°, 18° 21° e para 27°, 30° e 33°C. Após 8 horas as placas retornavam para a temperatura base permanecendo até o dia seguinte quando a operação era repetida e assim sucessivamente até o final do experimento. Portanto, exceto as placas controle que ficavam permanentemente a 24°C, cada grupo de placas ficava, por um período de 8 horas, sob temperaturas mais baixas ou mais altas e 16 horas na temperatura base (24°C). O experimento foi desenvolvido por 15 dias e a avaliação foi feita em 2 ocasiões pela medição do diâmetro médio das colônias.

3.4.4. Determinação do ponto térmico letal dos conídios.

Para determinação do ponto letal térmico dos conídios foram preparadas suspensões de esporos de diversos isolados na concentração aproximada de 10^5 conídios. ml⁻¹. Depois 0,5 ml de cada uma delas foram pipetadas para tubos de ensaio de 15 × 1,5 cm com tampa rosqueada. Utilizando-se um aparelho de banho-maria FANEN, 110 V. e 2000 Kw. modelo 120 E. Os tubos de ensaio contendo as suspensões foram imersos em banho-maria com temperaturas reguladas para 36-37°C, 38-39°C, 40-41°C e 41-42°C por um período aproximado, de 30 minutos. Foram acrescentados 5 minutos a esse tempo, que é o período necessário para equilibrar a temperatura inicial da aliquota da suspensão contida nos tubos com a temperatura do banho maria. Depois dos 30 minutos os tubos foram retirados do banho-maria e uma gota de cada uma das suspensões foi colocada sobre discos de Ágar-Água de 2 cm de diâmetro dispostos sobre lâminas para microscópio. As lâminas contendo os discos foram colocadas no interior de um cristalizador de vidro de 20 cm de diâmetro por 4 cm de altura e incubadas a 24°C por 12

horas. As leituras foram feitas sob o microscópio ótico ($\times 400$) avaliando-se a germinação.

3.4.5. Testes de Patogenicidade

3.4.5.1. Cultivo do hospedeiro (*A.bisporus*).

Para ensaiar a patogenicidade dos diversos isolados de *Verticillium* foi providenciado o cultivo de *Agaricus bisporus*. O substrato para desenvolvimento foi o composto a base de bagaço de cana-de-açúcar + esterco de cavalo + H₂O (75% umidade) , segundo BONONI & TRUFEN (1986). O composto preparado foi distribuído em sacos plásticos de polietileno com capacidade para 2,5 Kg e "semeado" com a linhagem 006/2 de *Agaricus bisporus* que nos foi gentilmente cedida pela Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica da Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

3.4.5.2. Preparo do "Spawn"

O preparo do inóculo de *Agaricus bisporus* (Spawn) ou "sementes" foi feito da maneira como segue: sementes de sorgo foram embebidas em água destilada

dentro de frascos de vidro tipo Erlenmeyer e deixadas de um dia para o outro para embebibimento até ficarem bem túrgidas. Após 24 horas o excesso de água foi eliminado e os frascos contendo as sementes foram fechados com tampos de algodão hidrófilo e autoclavados por cerca de 20 minutos à 120°C à 1 atm. Após resfriamento, foi transferido, para cada frascos, um pedaço de meio de cultura contendo o micélio do fungo. Os frascos foram então incubados à temperatura de 20°C. Quando as sementes ficaram totalmente tomadas pelo micélio do fungo, o que em geral leva um tempo ao redor de 20 dias, o "spawn" foi distribuído no composto contido nos sacos plásticos a razão de 20 gramas/saco.

3.4.5.3. Distribuição do solo de cobertura ou "casing soil".

Os sacos plásticos contendo o composto semeado com *A.bisporus* foram mantidos à temperatura ambiente (cerca de 24° C) para o desenvolvimento micelial. Após um período de 30 dias, quando o composto foi totalmente tomado pelo micélio, os sacos foram transferidos para uma câmara climatizada à uma temperatura de 18°C, onde foi feita a distribuição do solo de cobertura. O solo de cobertura ou "casing soil", como é conhecido nos países de língua inglesa, trata-se de uma camada de 2-3 cm de espessura de solo leve, geralmente terra de textura arenosa que é colocada sobre o composto semeado. O solo foi previamente submetido à pasteurização. Esta prática é fundamental na fase de pré frutificação de *A.bisporus* sem a qual não há formação dos basidiocarpos.

3.4.5.4. Preparo do inoculo de *Verticillium* e inoculações experimentais.

Para os testes de patogenicidade foram preparadas suspensões aquosas dos diferentes isolados a partir de culturas puras desenvolvidas em placas de Petri contendo meio de BDA. A idade aproximada das culturas utilizadas foi de 12-15 dias e a concentração das suspensões ajustadas para 10^5 conídios. ml⁻¹

As inoculações foram efetuadas 7 dias após a colocação do solo de cobertura borrifando-se sobre ela 10 ml das suspensões de conídios por saco de cultivo, empregando-se para isso, um aspersor de plástico acionado manualmente. Todos os isolados foram ensaiados inoculando-se 4 sacos por isolado, sendo que 4 sacos serviram como testemunha não inoculada num total de 56 sacos. No caso dos sacos controle o solo de cobertura foi aspergida com a mesma quantidade de água esterilizada. Nesta fase os experimentos foram totalmente conduzidos no interior de câmaras climatizadas, nas dependências do Instituto Biológico, sob regime de ausência de luz e temperatura controlada para 18 °C. O piso da câmara climatizada, sob as bancadas, recebeu uma camada de serragem de madeira encharcada com água para manutenção de um nível de umidade ambiental elevado. A avaliação da patogenicidade e da manifestação da "bolha seca" foi feita diariamente a partir do dia em que começaram a aparecer os primeiros cogumelos, pela observação das manchas no pileo, rachaduras nos estípes e deformações das frutificações.

3.5. Controle Químico

Os ensaios sobre controle químico, foram feitos "in vitro" selecionando-se para os testes alguns produtos que tem sido, com maior sucesso, utilizados no exterior, para o controle da "bolha seca". Tiveram como metas principais: 1) Avaliar a interferência dos fungicidas no desenvolvimento das espécies cultivadas, *A.bisporus* e *A.bitorquis* (Teste de Sensibilidade); 2) Avaliar a eficiência dos fungicidas sobre os isolados de *Verticillium* (Teste de Eficiência) e 3) Avaliar a possível existência de isolados de *Verticillium* e de *Agaricus spp.* tolerantes ou resistentes aos fungicidas selecionados (Teste de Resistência) .

3.5.1. Fungicidas utilizados e diluições.

Os experimentos sobre controle químico consistiram basicamente na avaliação "in vitro" do efeito de fungicidas em diferentes concentrações no crescimento micelial dos isolados de *Agaricus* e de *Verticillium*. A técnica utilizada foi aquela descrita anteriormente por EDGINGTON *et alii* (1971) e modificada por MENTEN *et alii* (1976). Estes últimos autores realizaram estudos "in vitro" sobre o efeito de fungicidas no fungo *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid.

Foram utilizados os seguintes fungicidas: benomil (Benlate 50% P.M.- Du Pont) , tiabendazol (Tecto 600 P.M. - Merck Sharp) , clorotalonil (Daconil 50% P.M. - Ihara-bras) e procloraz complexo manganês (Prelude 10% P.M.- Hoechst)

que, de acordo com a literatura internacional, têm sido referidos, a partir de 1970, como mais eficientes, para o controle de *Verticillium*. De acordo com as recomendações técnicas de solubilidade os fungicidas : benomil, tiabendazol (TBZ) e clorotalonil foram diluídos em acetona P.A., em etanol P.A. e em água destilada respectivamente. Após, a diluição em série, os fungicidas foram adicionados ao meio de cultura (BDA) antes da autoclavagem. O procloraz+Mn, foi suspenso em água destilada estéril e depois adicionado ao meio de cultura (BDA) fundente entre 45-50°C após o processo de autoclavagem. As dosagens utilizadas para os diversos fungicidas estão especificadas nos testes constantes dos itens 3.5.2, 3.5.3. e 3.5.4.

3.5.2. Teste de Sensibilidade.

Utilizando a técnica descrita por MENTEN *et alii* (1976), foram retirados discos de micélio de 7 mm de diâmetro dos bordos das colônias de *Agaricus* spp crescidos em BDA com cerca de 20 dias de idade e transferidos para o centro de placas de Petri contendo também o meio de BDA ao qual foi adicionado os fungicidas em diferentes dosagens. Foram utilizadas 4 repetições para cada isolado/dosagem/fungicida. Os fungicidas utilizados foram benomil, tiabendazol, clorotalonil e procloraz+Mn diluídos e ajustados para as concentrações de 10 µg/ml, 100 µg/ml e 500 µg/ml do princípio ativo (p.a.). As linhagens utilizadas foram 006/2 (*A.bisporus*) e 024/1 (*A.bitorquis*). Neste ensaio foi também avaliada a possível ação dos solventes utilizados na diluição do benomil e do TBZ, ou seja, da acetona e do etanol respectivamente, nas dosagens de 50, 500 e 2500 µg/ml. As placas controle não receberam fungicidas ou solventes. O teste foi conduzido em câmaras com temperatura controlada para 24°C em

ausência de luz e as avaliações foram feitas após 22 dias quando o isolado 024//1 atingiu o diâmetro da placa pela leitura do diâmetro médio das colônias.

Para determinar a sensibilidade dos fungos aos fungicidas, empregou-se a classificação dada por EDGINGTON *et alii* (1971):

a) Fungos que apresentam DE₅₀ (dose efetiva para inibir 50% do crescimento do fungo) menos do que 1 µg/ml são considerados altamente sensíveis ao fungicida.

b) Fungos que apresentam DE₅₀ entre 1 e 10 µg/ml são considerados moderadamente sensíveis.

c) Fungos que apresentam DE₅₀ igual ou superior a 50 µg/ml são considerados insensíveis ao fungicida.

Para se conhecer em quais faixas está localizado o ED₅₀, MENTEN *et alii* (1976) e FORCELINI & REIS (1988) empregaram a porcentagem de inibição do crescimento (P.I.C.), dada pela seguinte fórmula:

$$\text{P.I.C.} = \frac{\text{crescimento da testemunha} - \text{crescimento do tratado}}{\text{crescimento da testemunha}} \times 100 =$$

3.5.3. Teste de Eficiência dos Fungicidas.

Nestes testes foram utilizados 3 fungicidas: benomil, tiabendazol e procloraz-Mn, diluídos e preparados da maneira citada anteriormente e ajustadas para concentrações finais de 1µg/ml, 10µg/ml e 100 µg/ml do princípio ativo. Foram utilizadas 4 repetições para cada tratamento e as placas controle não receberam os

fungicidas. Os testes envolveram os 12 isolados patogênicos de *Verticillium*. O experimento foi conduzido nas mesmas condições que o teste de sensibilidade e as leituras realizadas 15 dias depois quando, no tratamento controle o crescimento dos fungos atingiu os limites das placas de Petri

3.5.4. Teste de Resistência aos Fungicidas.

O fenômeno de manifestação de tolerância aos fungicidas por *Verticillium* tem sido constatado na maioria dos países produtores de cogumelos. Nos testes aqui realizados foram utilizadas apenas os isolados de *Verticillium* que tiveram crescimento significativo na dose de 100 ppm constatado pelo teste de eficiência . Os fungicidas ensaiados foram preparados da maneira citada anteriormente e ajustados para concentrações finais de 100 ppm, 500 ppm e 1000 ppm. As leituras foram feitas quando o controle da testemunha atingiu o diâmetro da placa no 15º dia após o início do experimento, como descrito no item 3.5.3. .

3.5.5. Delineamento Experimental.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso, com 4 repetições, em esquema fatorial fungicida $\times$ doses. Adicionou-se à estas combinações, um tratamento controle, com 4 repetições, sendo que o esquema da análise da variância foi o seguinte:

<u>Causas da Variação</u>	<u>GL¹</u>	<u>GL²</u>	<u>GL³</u>	<u>GL⁴</u>	<u>GL⁵</u>
Controle × Tratados	1	1	1	1	1
Fungicidas (F)	—	2	1	2	—
Isolados (I)	1	1	11	11	1
Doses (D)	2	—	2	—	2
F × I	—	2	11	22	—
F × D	—	—	2	—	—
I × D	2	—	22	—	2
F × I × D	—	—	22	—	—
Resíduo	25	25	219	155	21
Total	31	31	291	191	27

1- Teste de Sensibilidade: para o fungicida tiabendazol (TBZ)

2- Teste de Sensibilidade: na dose 10 µg/ml, para os fungicidas TBZ, benomil e procloraz.

3- Teste de Eficiência: para os fungicidas TBZ e benomil.

4- Teste de Eficiência: na dose 1 µg/ml para os fungicidas TBZ, benomil e procloraz.

5- Teste de Resistência dos isolados Nos. 302-H e 299-H. à benomil.

Os graus de liberdade referentes aos logaritmos das doses foram decompostos em polinômios ortogonais para obtenção da equação de ajuste dos dados (SOKAL & ROHLF 1969). As comparações entre médias dos isolados e fungicidas foram feitas através do teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção dos Isolados.

Os isolados obtidos foram registrados na série H do Livro de Registros de Isolamentos da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo as páginas 47 e 49 sob os números : 280-H, 281-H, 290-H, 293-H, 295-H, 296-H, 297-H, 299-H, 300-H, 301-H, 302-H, 304-H e 367-H. Os dados referentes a esses isolados encontram-se discriminados na Tabela 2.

4.2. Preservação das culturas de *Verticillium*.

Os resultados dos vários métodos empregados na manutenção da viabilidade e das características originais das culturas de *Verticillium* isoladas a partir dos cultivos de cogumelos da região de Moji das Cruzes-SP, constam dos itens 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4 e 4.2.5.

TABELA 2: Relação dos isolados obtidos no levantamento de doenças do cogumelo comestível (*A.bisporus*) de 1985 a 1989 na região de Moji das Cruzes-SP

Número de isolados	Data de coleta	Local	Nome da Propriedade e/ou do proprietário
280-H	28/06/85		CEPECC*
281-H	17/07/85	Bairro: Botujurù	Ind. Lucca Ltda.
290-H	12/08/85		CEPECC*
293-H	12/08/85	Bairro: Botujurù	Prop. Sr. Lee
295-H	12/08/85	Bairro: Botujurù	Prop. Sr. Lee
296-H	12/08/85	Bairro: Botujurù	Prop. Sr. Lee
297-H	12/08/85	Bairro: Botujurù	Prop. Sr. Lee
299-H	06/09/85	Estrada Municipal Km 10	Ind. Lucca Ltda.
300-H	06/09/85	Estrada Municipal Km 10	Ind. Lucca Ltda.
301-H	16/09/85	Bairro: Botujurù	Lin Chuan Chen
302-H	20/09/85	Moji das Cruzes	Prop. Sousa Lesos
304-H	18/10/85	Estrada Moji Guararema	Prop. Sr. Hashiro
367-H	31/08/89	Estrada Moji Guararema	Prop. Sr. Nakashima

* CEPECC: Centro de Pesquisas de Cogumelos Comestíveis.

4.2.1. Repicagens Periódicas.

Embora, para a totalidade dos isolados, a viabilidade tenha sido mantida durante todo o período de desenvolvimento do plano de trabalho (1985-1993) frequentemente foram observadas alterações ou mutações setoriais em vários isolados e que eram facilmente observadas quando os mesmos eram transferidos para placas de Petri (Figura 1-A).

Outra alteração frequentemente observada foi a redução da capacidade de esporulação. Por esse motivo, para a realização dos diversos experimentos, foi dada preferência, como fonte inicial de inóculo, repicagens provenientes dos isolados mantidos pelos métodos de Castellani e/ou liofilização. Apenas o isolado 367-H obtido, posteriormente aos demais não foi, submetido ao processo de liofilização.

4.2.2. Método de preservação em solo.

Os resultados do ensaio de preservação em solo, iniciado à 15/06/92, foram uniformes para todos os isolados ensaiados. A viabilidade foi o fator limitante, sendo reduzida para as misturas em que predominava areia. Os isolados que puderam ser preservados por mais tempo em areia e nas misturas em que esta predominava foram : 280-H e 301-H viáveis, até 3 meses de preservação (15/06/92 a 18/09/92). Em solo rico em matéria orgânica, nas relações 100% solo e 75% solo + 25% areia a preservação foi possível por período mais dilatado sendo que os isolados 290-H, 295-H, 296-H e 300-H puderam ser preservados por cerca de 6 meses . Na 6ª e última leitura realizada depois de 1 ano todos os isolados preservados em solo, areia e nas

diferentes misturas estavam inviáveis. Este método foi considerado pouco eficiente para preservação da viabilidade de fungos do gênero *Verticillium* isolados do cogumelo comestível e conseqüentemente não mais utilizado.

4.2.3 Método da Sílica-gel

Para este método , o fator limitante também foi a viabilidade, pois na primeira leitura realizada 7 dias depois, do preparo os isolados 297-H e 304-H já deixaram de crescer. Na segunda leitura realizada apenas 11 dias após a instalação do experimento, apenas à 11 dias após à instalação do experimento, apenas os isolados 299-H e 281-H estavam viáveis originando culturas quando os grânulos de sílica foram semeados em placas de Petri contendo meio de BDA. O teste foi repetido 15 dias depois tornando a dar resultados insatisfatórios com perda total da viabilidade. Este método também foi descartado por mostrar-se ineficiente para preservação da viabilidade de fungos do gênero *Verticillium* isolados de *A.bisporus*.

4.2.4. Método da água destilada ou de Castellani

Quando transferidos da água destilada para placas de Petri contendo meio de BDA após 1 mês, todos os isolados desenvolveram-se normalmente dando origem a culturas idênticas às originais . Não houveram diferenças notáveis na capacidade de esporulação de qualquer dos isolados. Fazendo algumas modificações na metodologia original as transferências foram sendo realizadas de forma mais espaçada em consequência dos resultados sempre positivos e consistentes. A última transferência registrada foi realizada à 01/05/94 resultando um total de 3 anos e 8 meses de

preservação sem que houvesse perda da viabilidade ou alterações morfológicas e fisiológicas em quaisquer dos isolados ensaiados. Por essa razão este foi um dos métodos escolhidos para ser utilizado no decorrer do desenvolvimento do presente trabalho

4.2.5. Liofilização

Quando feita a "semeadura" das pequenas tiras de papel em placas de Petri contendo meio de BDA, houve a germinação dos conídios liofilizados dando como resultado culturas idênticas às culturas originais e que também apresentaram excelente esporulação. Juntamente com o método de Castellani o processo de liofilização foi considerado como excelente para preservação de fungos do gênero *Verticillium* isolados do cogumelo comestível. A mais recente "semeadura" foi realizada com total sucesso também em 01/05/94 estando portanto, viáveis após um período aproximado entre 8 a 9 anos de preservação.

4. 3. Estudos Micológicos

4.3.1. Meios de Cultura

O crescimento e as características morfológicas e fisiológicas dos fungos foram estudadas em 3 meios de cultura, ou seja: Batata-Dextrose-Ágar (BDA), Extrato de Malte Ágar (EMA) e Meio de Aveia Ágar (MAA) e os resultados são apresentados nos itens subsequentes: 4.3.2, 4.3.3, 4.4.1, 4.4.2 e 4.4.3.. O meio de EMA foi aquele utilizado para o cultivo das culturas de *Verticillium* para fins de identificação,

descrição da espécie e estudos fisiológicos com o propósito de empregar a mesma metodologia e parâmetros utilizados por GAMS & ZAAYEN (1982).

4.3.2 Micro culturas e morfologia.

Os estudos foram inicialmente feitos em placas de Petri com os meios de cultura específicos utilizados, porém o preparo de micro culturas foi bastante útil para os estudos morfológicos permitindo uma perfeita visualização de todos os isolados estudados. Possibilitou também, uma ideia bastante clara da ontogenia das estruturas, isto é, a forma, a maneira, e a seqüência de eventos que originam as diversas estruturas morfológicas e de reprodução, ou seja, conidióforos e conídios.

4.3.3 Aspectos morfológicos

Os resultados obtidos nos estudos morfológicos e as medições das diversas estruturas de reprodução e posterior comparação com a literatura recente (BRADY & GIBSON 1976, BRADY & WALLER 1976, GAMS & ZAAYEN, 1982) permitiram a identificação dos isolados : IB 280-H, IB 281-H, IB 290-H, IB 293-H, IB-295-H, IB 297-H, IB 299-H, IB 300-H, IB 301-H, IB 302-H, IB 302-H, IB 304-H e IB 367-H. obtidos na Região de Moji das Cruzes-SP, como sendo *Verticillium fungicola* incluído na Secção Albo-erecta erigida por Gams em 1982 (GAMS & ZAAYEN, 1982) e cuja sinonímia, descrição baseada nos espécimens estudados é apresentada a seguir.

VERTICILLIUM FUNGICOLA (Preuss) Hassebrauk Phytopath. Z.(9):

514, 1936.

= *Acrostalagmus fungicola* Preuss, Linnaea 24: 926, 1851.

= *Cephalosporium costantini* F.E.V. Smith, Trans. Br. Mycol. Soc.

10: 98, 1924.

= *Verticillium malthousei* Ware, Ann. Bot. 47: 781, 1933.

Colônias em placas de Petri com meio de Extrato de Malte-Ágar à 2%(EMA) brancas a creme-claras, de aspecto pulverulento, cotonosas ou aveludadas. Incolores ou pálido-amareladas quando observadas pelo verso da placa. Odor indistinto. Hifas vegetativas variando de 0,7 a 2,5 µm de espessura. Esporulação abundante e variável para muito abundante conforme o isolado. *Conidióforos* erguendo-se tipicamente de hifas imersas no meio de cultura, eretos e depois também decumbentes medindo de 130 a 442 µm de comprimento, contendo de 1 a 12 verticilios ("whorls") mas predominantemente de 6-7 e que formam um ângulo obtuso com o eixo do conidióforo. *Fialides* medindo de 16 a 36 µm de comprimento e 1,8 a 2,0 µm de largura na base, afinando nas extremidades distais (topo) para 1,2 a 0,6 µm. *Conídios* agrupados e imersos em substância viscosa formando estruturas globosas nas extremidades das fialides. São longamente elipsoidais a quase cilíndricos, frequentemente afinando mas arredondados na extremidades distal. Lado da base indistintamente truncado e algumas vezes encurvados ao longo do eixo longitudinal; assimetricamente biconvexos a côncavo-convexos, paredes lisas mostrando frequentemente 1-2 ou mais gútulas inconspícuas; dimensões: (2,4) 4-6 (-12,0) × 1,5-1,8 (2,5) µm. *Clamidospóros* ausentes. Forma teleomórfica desconhecida. Temperatura ótima de crescimento 21-24° C e ausência de crescimento à 33°C. Temperatura letal para os conídios de 39-40°C.

Trata-se, portanto, do organismo conhecido como o agente causal da "bolha-seca" e presente em praticamente todos os países onde o cogumelo comestível, *Agaricus bisporus*, é economicamente cultivado. A cultura e as estruturas características de *V.fungicola* foram documentadas e são apresentadas na Figura 1-B,C,D,E,F e G.

O meio utilizado para a descrição foi o EMA. Observações realizadas em micro culturas empregando os meios de EMA, BDA e AA demonstraram que em meios mais ricos há uma nítida tendência ao aumento do número de verticílios ("whorls") que também reflete no comprimento dos conidióforos. Também há um aumento na quantidade de conidióforos produzidos e do número de fiáides por verticílio

O isolado 296-H, embora semelhante, apresentou algumas diferenças em relação aos demais em várias características quanto ao aspecto da cultura em EMA e estruturas de reprodução (Figura 1-H e I). Nos testes de inoculação mostrou-se não patogênico a *Agaricus bisporus* (Vide item 4.5.3.). O isolado apresentou várias características de espécies nematófagas sendo identificado através de suas estruturas morfológicas como uma espécie do gênero *Gliocladium* COUTINHO & CARVALHO JUNIOR (1990).

4.4. Estudos Fisiológicos

FIGURA 1- Aspectos morfológicos de *V.fungicola* e *Gliocladium* sp

V.fungicola: A- Cultura mostrando alteração setorial; B- Cultura creme-clara desenvolvida em meio de Extrato de Malte Agar; C- Conidióforos eretos originados de hifas submersas no meio de cultura. Observe-se os verticílios formando ângulo obtuso com o eixo principal (foto de micro cultura $\times 100$); D- Conidióforo decumbente, fiálides e conídios ($\times 150$); E- Verticílios e fiálides. ($\times 450$). F- Conídios agrupados formando estruturas globosas. ($\times 400$); G- Fiálides isoladas e conídios característicos. ($\times 450$). *Gliocladium* sp: H- Conidióforos iniciando a formação de conídios ($\times 450$); I- Conidióforos e conídios. Observe-se a morfologia diferente daquela de *V. fungicola* ($\times 640$).

4.4.1. Determinação da curva de crescimento e do ótimo de temperatura

Os resultados dos ensaios para a determinação das curvas de crescimento encontram-se expressas nas Figuras 2, 3, 4, e, 5. Essas figuras representam as curvas de crescimento dos isolados em meio de EMA tomadas duas a duas. Nessas curvas pode ser verificado que o ótimo de crescimento vegetativo ocorre em temperaturas ao redor de 24°C. À 33°C não houve qualquer crescimento vegetativo para a maioria dos isolados. O isolado 367-H não cresceu à 30°C (Figura 4). Apenas o isolado 296-H, que foi identificado taxonomicamente como *Gliocladium*, apresentou crescimento totalmente diferente, com desenvolvimento vegetativo ainda bastante apreciável (30 mm) à 33°C (Figura 5). Ensaios similares realizados em meio de BDA e MAA não mostraram diferenças significativas em relação aos realizados em meio de MEA e por isso os resultados obtidos deixaram de ser apresentados para evitar redundância.

4.5.2. Determinação da capacidade de esporulação.

Os resultados da capacidade de esporulação de 9 isolados em 2 diferentes meios de cultura BDA e MAA são apresentados nas Tabelas 3 e 4, onde se observa que as melhores temperaturas para a produção de esporos estão entre 21-27°C e que o melhor meio de cultura foi o BDA.

Figura 2- Curvas representativas do crescimento micelial em EMA dos isolados 280-H, 281-H e 290-H, 293-H de *Verticillium fungicola* à diferentes temperaturas.

Figura 3- Curvas representativas do crescimento micelial em EMA dos isolados 295-H, 297-H e 299-H, 300-H de *Verticillium fungicola* à diferentes temperaturas.

Figura 4 - Curvas representativas do crescimento micelial em EMA dos isolados 301-H, 302-H e 304-H, 367-H de *Verticillium fungicola* à diferentes temperaturas

Figura 5 - Curva representativa do isolado 296-H de *Gliocladium* sp em EMA à diferentes temperaturas.

TABELA-3 Esporulação de 9 isolados de *Verticillium fungicola* à diferentes temperaturas em BDA.

Isolados	TEMPERATURAS EM °C									
	12	15	18	21	24	27	30	33		
280-H	1,4.10 ⁵	3,5.10 ⁵	7,5.10 ⁵	1,8.10 ⁶	2,0.10 ⁶	5,9.10 ⁶ *	8,9.10 ⁵	—		
281-H	5,5.10 ⁵	1,2.10 ⁶	1,5.10 ⁶	1,7.10 ⁶	3,0.10 ⁶ *	2,3.10 ⁶	3,5.10 ⁵	—		
290-H	9,2.10 ⁵	2,8.10 ⁶	2,4.10 ⁶	3,7.10 ⁶	3,8.10 ⁶	5,2.10 ⁶ *	4,3.10 ⁵	—		
293-H	1,1.10 ⁶	1,9.10 ⁶	3,6.10 ⁶	5,0.10 ⁶	4,7.10 ⁶	5,1.10 ⁶ *	1,3.10 ⁶	—		
297-H	7,0.10 ⁵	1,3.10 ⁶	2,9.10 ⁶	4,4.10 ⁶	6,3.10 ⁶ *	3,1.10 ⁶	1,1.10 ⁶	—		
300-H	1,0.10 ⁶	2,9.10 ⁶	5,0.10 ⁶	5,5.10 ⁶ *	3,5.10 ⁶	2,2.10 ⁶	4,9.10 ⁵	—		
301-H	2,2.10 ⁵	4,3.10 ⁵	7,3.10 ⁵	1,0.10 ⁶	1,4.10 ⁶	2,5.10 ⁶ *	3,0.10 ⁵	—		
302-H	2,8.10 ⁵	6,7.10 ⁵	9,7.10 ⁵	1,1.10 ⁶	4,4.10 ⁶ *	2,4.10 ⁶	6,2.10 ⁵	—		
367-H	1,2.10 ⁵	2,0.10 ⁵	3,0.10 ⁵	5,6.10 ⁵	1,1.10 ⁶ *	4,9.10 ⁵	—	—		

* máxima esporulação

— = ausência de crescimento .

Tabela 4- Esporulação de 9 isolados de *Verticillium fungicola* à diferentes temperaturas em MAA

Isolados	TEMPERATURAS EM °C									
	12	15	18	21	24	27	30	33		
280-H	2,8.10 ⁵	5,6. 10 ⁵	1,0.10 ⁶	1,2.10 ⁶	1,4.10 ⁶ *	8,5.10 ⁵	7,8.10 ⁵	—		
281-H	6,0. 10 ⁵	1,0.10 ⁶	1,2.10 ⁶	1,7.10 ⁶	2,1.10 ⁶ *	9,4.10 ⁵	5,5.10 ⁵	—		
290-H	4,0.10 ⁵	1,1.10 ⁶	1,8.10 ⁶	2,9.10 ⁶ *	2,5.10 ⁶	1,8.10 ⁶	3,8.10 ⁵	—		
293-H	6,9.10 ⁵	1,1.10 ⁶	9,7.10 ⁵	5,0.10 ⁶ *	1,7.10 ⁶	5,6.10 ⁵	3,1.10 ⁵	—		
297-H	1,2. 10 ⁵	2,7. 10 ⁵	4,4. 10 ⁵	5,2.10 ⁵	6,2.10 ⁵ *	4,5.10 ⁵	3,0.10 ⁵	—		
300-H	7,3.10 ⁵	1,2.10 ⁶	8,5.10 ⁵	7,1.10 ⁵	2,6.10 ⁶ *	1,1.10 ⁶	8,2.10 ⁵	—		
301-H	1,2.10 ⁵	2,7.10 ⁵	3,0.10 ⁵	4,7.10 ⁵	6,8.10 ⁵	5,9.10 ⁵	3,1.10 ⁵	—		
302-H	8,0.10 ⁴	2,3.10 ⁵	3,1.10 ⁵	8,1.10 ⁵	2,3.10 ⁶ *	2,1.10 ⁶	6,4.10 ⁵	—		
367-H	0,2.10 ⁵	1,2. 10 ⁵	1,2.10 ⁵	4,8.10 ⁵	6,25.10 ⁵ *	6,7.10 ⁴	—	—		

* = Maxima esporulação

— = Ausência de crescimento

4.4.3. Efeito da alternância de temperaturas.

Os resultados dos ensaios sobre o efeito da alternância de temperatura sobre *Verticillium fungicola* encontram-se expressas na Figura.6, onde se verifica que a curva de crescimento ficou alterada em relação a curva normal (Figura 2). As placas que foram transferidas para 33°C foram as únicas que tiveram uma redução apreciável de crescimento em relação as demais.

4.4.4. Determinação do ponto térmico letal dos conídios.

O ponto térmico letal dos conídios para todas as linhagens de *V.fungicola* isoladas no levantamento realizado na região de Moji das Cruzes esteve entre 39-40°C. Para grande maioria dos isolados a temperatura de 39°C foi letal para a maioria dos conídios, exceto para as linhagens 299-H e 302-H que, surpreendentemente apresentaram germinação de 21 e 8%.

4.4.5. Testes de Patogenicidade.

Após 7 dias da data da inoculação começaram a surgir os primeiros cogumelos que apresentavam manchas características no pileo. Depois de 14 dias manifestaram-se cogumelos com amplas manchas no pileo e que apresentavam rachaduras no estipe. A partir do 22º dia da inoculação dos conídios, começaram a aparecer cogumelos estiolados e/ou deformados que são os sintomas mais característicos da "bolha seca". Esse tipo de manifestação manteve-se até o final do ciclo da cultura

Figura 6 - Curva representativa do efeito da alternância de temperaturas do isolado 280-H de *Verticillium fungicola*.

prejudicando de forma intensa a qualidade comercial e a produtividade de cogumelos. O fungo pode ser recuperado de material colhido a partir de todos os sacos inoculados. Todos os isolados foram patogênicos exceto o 296-H.

É dada a seguir uma descrição detalhada dos diversos aspectos da sintomatologia decorrente da infecção de *V.fungicola* em *A.bisporus* a partir do cultivo inoculado artificialmente na época da distribuição do solo de cobertura e também da experiência adquirida em visitas a propriedades comerciais da região de Moji das Cruzes onde o problema se manifestava: Os sintomas variam de acordo com a fase de desenvolvimento em que o cogumelo é infectado. Quanto a infecção é tardia, ou seja, aparece quando os cogumelos apresentam-se desenvolvidos ou em fase de colheita, ocorre o aparecimento de manchas escuras de tonalidade castanha, bordos irregulares e não definidos na superfície do pileo. Essas manchas são comumente pouco profundas e os tecidos situados logo abaixo da camada superficial são em aparência sadios (Figura.7-A e B) . Podem ocorrer também rachaduras, fendilhamentos e conseqüente descascamento do estipe; sintoma indicativo de que houve invasão dos tecidos do mesmo. Quando tais cogumelos são cortados longitudinalmente é freqüente observar-se uma cavidade interna também escurecida. Em virtude disto os cogumelos tornam-se secos, enrugados e inadequados para o consumo (Figura 7-C). Um segundo tipo de sintoma ocorre em uma fase intermediária do cultivo, quando em fase de botão, ou seja, quando começam a frutificar. Nesse caso observa-se uma espécie de estiolamento, isto é, o corpo de frutificação não mais se desenvolve e adquire uma coloração amarelada (Figura 7-C). Finalmente, o terceiro tipo de sintoma é indicativo de infecções precoces e mais severas e que significa uma pesada contaminação do composto ou do solo de cobertura. A sintomatologia é característica e bem mais marcante. Neste caso, como o

FIGURA 7 - Sintomas causados por *Verticillium fungicola* em *Agaricus bisporus*.

A- À esquerda pileos mostrando sintomas brandos e superficiais. No centro e à direita manchas marrons e deprimidas. B- Cogumelo em fase de colheita mostrando manchas marrons que depreciam o valor comercial. C- Cogumelos com rachaduras, fendilhamentos, enrigecimento e descascamento do estipe. Observe-se à direita, frutificações amareladas e não desenvolvidas. D- À esquerda cogumelo sadio. No centro e à direita cogumelos com deformações características da "bolha seca"

micélio do *Agaricus* está se desenvolvendo no composto e o parasita apresentando a sua fase vegetativa bem desenvolvida, ambos os micélios se entrelaçam. Quando o *Agaricus* frutifica, dá origem a corpos de frutificação bastante ou totalmente deformados. Comumente não há diferenciação entre o estipe e o píleo formando uma massa disforme e de contornos arredondados que mais se assemelha a frutificação de um *Gasteromiceto*. As vezes aparecem cogumelos com estipe e píleo diferenciados mas apresentando tamanho reduzido. Outras vezes o estipe mostra-se entumecido e disforme dando origem a cogumelos enrigecidos e com textura coriácea. O produto obtido é totalmente impróprio para comercialização (Figura 7-D).

4.5. Controle Químico.

Os resultados dos testes de Sensibilidade, Eficiência e de Resistência são apresentados respectivamente nos itens 4.5.1., 4.5.2 e 4.5.3.

4.5.1 Teste de Sensibilidade

Ensaio realizado preliminarmente com a acetona e o etanol, empregados na diluição dos fungicidas benomil e TBZ, respectivamente, demonstraram que esses solventes não interferem no crescimento micelial de *A.bisporus* e *A.bitorquis*

Os resultados da sensibilidade "in vitro" do crescimento micelial de *A.bisporus* e *A.bitorquis* aos fungicidas benomil, clorotalonil, procloraz e TBZ, quando incorporados ao meio de BDA, são apresentados na Tabela 5. Esses valores referem-se ao diâmetro médio do crescimento radial das colônias após 22 dias, quando a

Tabela 5- Sensibilidade das linhagens de *A.bisporus* (006/2) e *A.bitorquis* (024/1) à diferentes doses de benomil, clorotalonil procloraz e TBZ (crescimento micelial em mm.).

		LINHAGENS							
FUNGICIDAS		006/2				024/1			
		DOSES (µg/ml)							
		0	10	100	500	0	10	100	500
TBZ		68	59	30	17	79	70	38	19
benomil		68	14	0	0	79	31	15	0
procloraz		68	19	0	0	79	30	0	0
chlorotalomil		66	0	0	0	80	0	0	0

linhagem 024/1 (*A.bitorquis*), empregada como testemunha no ensaio, atingiu o diâmetro da placa de Petri.

Os resultados mostraram que o clorotalonil inibiu totalmente o crescimento micelial das duas espécies de *Agaricus*, nas doses de 10, 100 e 500 µg/ml de princípio ativo, enquanto que, o benomil inibiu a linhagem 006/2 (*A.bisporus*) nas doses de 100 e 500 µg/ml e a linhagem 024/1 (*A.bitorquis*) na dose de 500 µg/ml. O procloraz inibiu totalmente o crescimento micelial das duas linhagens nas doses de 100 e 500 µg/ml. Por outro lado, o TBZ foi o único fungicida ensaiado que permitiu o crescimento micelial das duas linhagens nas três doses estudadas.

A análise de variância para o TBZ mostrou efeito significativo ao nível de 5% para as linhagens de *Agaricus* e para as doses do fungicida, enquanto, que a interação linhagem × dose não foi significativa. Pelos valores apresentados na Tabela 6, verifica-se que a linhagem 024/1 apresentou em média, um crescimento micelial significativamente superior à linhagem 006/2, na presença do TBZ. Para as médias do crescimento micelial das linhagens, nas doses de 10, 100 e 500 µg/ml de TBZ, verifica-se que houve uma redução linear ($b = -27,7016^{**}$, $R^2 = 0,99^{**}$) do crescimento em função das doses estudadas. A análise de variância para o benomil, procloraz e o TBZ, na dose de 10 µg/ml, mostrou efeito significativo ao nível de 5% para os fungicidas e isolados, enquanto que a interação fungicida × isolados não foi significativa. Pelos valores apresentados na Tabela 7, verifica-se que o TBZ interferiu menos no crescimento micelial de *A.bisporus* e *A.bitorquis*, mostrando uma média de crescimento significativamente superior ao benomil e procloraz. Esses dois últimos fungicidas provocaram uma inibição semelhante entre si no crescimento micelial das linhagens. As

Tabela 6- Sensibilidade das linhagens de *A.bisporus* (006/2) e *A.bitorquis* (0241/1) à diferentes doses do TBZ
(crescimento micelial em mm.)

Isolados	DOSES (µg/ml)			Médias
	10	100	500	
006/2	59	30	17	36,0 b ¹
024/1	70	38	19	42 a
Médias	65	34	18	

C.V. = 10,22%

1- Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7- Sensibilidade das linhagens de *Agaricus bisporus* (006/2) e *Agaricus bitorquis* (024/1) à dose de 10 µg/ml dos fungicidas benomil, procloraz e TBZ (crescimento micelial em mm.).

Fungicidas	ISOLADOS		Médias
	006/2	024/1	
benomil	14	31	22 b ¹
procloraz	19	30	25 b
TBZ	59	70	65 a
médias	31 B	43 A	

C.V. = 9,02%

1- Médias seguidas de mesma letra minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si, pelos Teste de Tukey e F, respectivamente, ao nível de 5% de probabilidade.

linhagens também apresentaram, em média uma sensibilidade diferente com relação aos fungicidas ensaiados, sendo que, a 024/1 apresentou um crescimento micelial significativamente superior a linhagem 006/2.

O fungicida que se mostrou mais tóxico para ambas as espécies de *Agaricus* foi o clorotalonil que inibiu completamente o crescimento micelial em todas as doses estudadas. Em seguida, como mostram as Figuras 8 e 9 apareceu o benomil que reduziu em 79% o crescimento de *A.bisporus* e em 62% o de *A.bitorquis*, na dose de 10 µg/ml, quando comparado ao crescimento da testemunha sem fungicida. De forma semelhante, o procloraz inibiu em 72% o crescimento de *A.bisporus* e em 62% o de *A.bitorquis*.

Dos fungicidas ensaiados, o TBZ foi o que apresentou a menor fungitoxicidade, inibindo o crescimento micelial de *A.bisporus* em 13% e de *A.bitorquis* em 11%.

A partir desses resultados, verifica-se que as doses efetivas para inibir 50% do crescimento micelial das duas espécies de *Agaricus* (DE₅₀) para o benomil e procloraz situam-se abaixo de 10 µg/ml, enquanto que para o TBZ está entre 10 e 100 µg/ml (Figuras 8 e 9).

4.5.2. Teste de Eficiência dos Fungicidas

Os resultados do efeito "in vitro" dos fungicidas benomil, procloraz e TBZ sobre o crescimento micelial de 12 isolados de *V. fungicola*, quando

Figura 8- Gráfico representativo da fungitoxicidade do benomil, procloraz, TBZ e clorotalonil em meio de BDA com 10, 100 e 500 µg/ml de ingrediente ativo à *Agaricus bisporus* após 22 dias de crescimento. DE₅₀=50% no crescimento micelial

Figura 9- Gráfico representativo da fungitoxicidade do benomil, procloraz, TBZ e clorotalonil em meio de BDA com 10, 100 e 500 µg/ml de ingrediente ativo à *Agaricus bitorquis*, após 22 dias de crescimento. DE₅₀= 50% no crescimento micelial.

incorporados ao meio de BDA, estão na **Tabela 8**. Esses valores referem-se ao diâmetro médio do crescimento radial das colônias, quando o desenvolvimento do tratamento testemunha atingiu o diâmetro da placa de Petri.

A inibição total do crescimento micelial dos 12 isolados de *V. fungicola* só foi conseguida com o procloraz na dose de 100 µg/ml e, de 8 isolados, na dose de 10 µg/ml de p.a. A inibição parcial do crescimento foi obtida com o benomil nas doses de 1, 10 e 100 µg/ml, excetuando-se os isolados 299-H e 302-H; com o TBZ a 10 e 100 µg/ml e com o procloraz a 1 e 10 µg/ml. O TBZ a 1 µg/ml foi o que menos inibiu o crescimento micelial de *V. fungicola*.

Observou-se diferenças na sensibilidade dos isolados em relação aos fungicidas utilizados, tanto é assim que as linhagens 299-H e 302-H praticamente não foram inibidas pelo benomil na dose de 100 µg/ml e pelo TBZ na dose de 10 µg/ml. Por outro lado, esses isolados apresentaram-se sensíveis ao procloraz a partir da dose de 1 µg/ml (**Tabela 8**).

A análise de variância das médias obtidas do efeito do benomil e TBZ, nas doses de 1, 10, e 100 µg/ml de p.a., sobre o crescimento micelial de *V. fungicola* mostrou ser significativa ao nível de 5% para os fungicidas, doses e isolados e a sua interação. Pelas médias apresentadas na **Tabela 9**, verifica-se que nas doses de 1 e 10 µg/ml, o benomil foi mais eficiente em inibir o crescimento micelial dos 12 isolados de *V. fungicola*, enquanto que, na dose de 100 µg/ml, o TBZ foi mais eficiente do que aquele. Para essas médias, nas doses de 1, 10 e 100 µg/ml, tanto para benomil ($y = 33,47 - 7,3652x + 1,2979x^2$; $R^2 = 1,00^{**}$) como para o TBZ ($y = 65,80 - 42,1927x + 6,8900$

Tabela 8- Ação de diferentes fungicidas nas doses de 1; 10 e 100µg/ml sobre o crescimento micelial, em mm, de 12 isolados de *Verticillium fungicola*.

LINHAGENS	TESTEMUNHA	BENOMIL			TIABENDAZOL			PROCLORAZ		
		DOSES (µg/ml)								
		1	10	100	1	10	100	1	10	100
302-H	80	80	79	70	80	78	19	22	0	0
299-H	80	79	78	68	80	76	16	19	0	0
297-H	80	22	17	14	79	18	10	22	0	0
293-H	80	20	19	15	77	23	8	27	11	0
280-H	80	27	19	16	72	20	10	30	10	0
295-H	80	35	13	12	63	17	10	30	6	0
367-H	80	34	24	20	60	35	9	29	0	0
304-H	80	22	15	12	60	24	7	21	12	0
290-H	80	23	20	16	59	21	1	33	0	0
300-H	80	19	13	11	56	16	8	24	0	0
301-H	80	22	15	15	53	18	7	23	0	0
291-H	80	18	17	15	49	19	1	24	0	0
Médias	80	33	27	24	66	30	9	25	3	0

Tabela 9- Ação do benomil e do TBZ nas doses de 1; 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ sobre o crescimento micelial, em mm, de 12 isolados de *Verticillium fungicola*.

Fungicidas	Doses ($\mu\text{g/ml}$)		
	1	10	100
benomil	33 b ¹	27 b	24 a
TBZ	66 a	30 a	9 b

C.V. = 7,99%

1- Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo Teste F ao nível de 5% de probabilidade.

x^2 ; $R^2= 1,00$), houve uma redução quadrática no crescimento em função das doses estudadas.

A análise de variância da ação do benomil, procloraz e TBZ na dose de 1 µg/ml de p.a., sobre o crescimento micelial de 12 isolados de *V. fungicola* revelou efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade dos fungicidas, dos isolados e da interação fungicida × isolados. Pelos dados obtidos e apresentados na Tabela 10, constatou-se que os isolados 281-H, 290-H, 293-H, 297-H, 300-H, 301-H e 304-H foram os mais sensíveis ao benomil, não mostrando diferenças significativas entre si, enquanto que, os isolados 299-H e 302-H foram insensíveis a esse fungicida. Para o procloraz, constatou-se que os isolados 281-H, 297-H, 299-H, 300-H, 301-H, 302-H e 304-H foram os mais sensíveis. No caso do TBZ, os isolados 281-H e 301-H foram os mais sensíveis, embora a inibição do crescimento micelial tenha sido muito pequena quando comparado ao tratamento testemunha.

Comparando-se o efeito do benomil e do procloraz sobre o crescimento micelial desses isolados, verifica-se que os isolados 281-H, 290-H, 293-H e 300-H foram significativamente mais inibidos pelo benomil do que pelo procloraz, enquanto que, os isolados 295-H, 299-H, 302-H e 367-H foram mais inibidos pelo procloraz do que pelo benomil. Os isolados 280-H, 297-H, 301-H e 304-H foram igualmente inibidos pelos dois fungicidas.

No conjunto dos dados, verifica-se que os isolados 281-H, 300-H, 301-H e 304-H foram os mais inibidos pelos três fungicidas, enquanto, que os isolados 299-H e 302-H praticamente não foram inibidos pelo benomil e TBZ.

Tabela10- Ação do benomil, procloraz e TBZ, na dose de 1 µg/ml sobre o crescimento micelial, em mm, de *Verticillium fungicola*.

Isolados	benomil	procloraz	TBZ	médias
301-H	22 B cd ¹	23 B cde	53 A de	33 d
281-H	18 C d	24 B bcde	49 A e	30 d
304-H	22 B cd	21 B de	60 A cd	34 d
300-H	19 C d	24 B bcde	56A cd	33 d
290-H	23 C cd	33 B a	59 A cd	38 c
367-H	34 B b	29 C abc	60 A c	41 bc
295-H	35 B b	30 C ab	63 A c	43 b
293-H	20 C d	27 B abcd	77 A ab	41 bc
280-H	27 B c	30 B ab	72 A b	43 b
302-H	80 A a	22 B de	80 A a	61 a
299-H	79 A a	19 B e	80 A a	59 a
297-H	22 B cd	22 B cde	79 A a	41 bc
Médias	33 B	25 C	66 A	

C.V. = 6,99 %

1- Médias seguidas de mesma letra minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

O efeito fungitóxico do benomil, procloraz e TBZ sobre o crescimento micelial de *V.fungicola* é apresentado na **Figura 10**. Na dose de 1 µg/ml, o procloraz inibiu em 69% o crescimento micelial de *V.fungicola*; o benomil inibiu em 57%, enquanto que o TBZ inibiu em apenas 17%. Na dose de 10 µg/ml, o procloraz inibiu em 96%, enquanto que o benomil e o TBZ inibiram em 66 e 62%, respectivamente. Na dose de 100 µg/ml, o procloraz inibiu completamente o crescimento micelial de *V.fungicola*, enquanto que, o TBZ e benomil inibiram em 89 e 70%, respectivamente. Desse modo, no ensaio de eficiência, o procloraz foi, entre os fungicidas testados, o que apresentou maior fungitoxicidade ao *V.fungicola* nas doses de 1, 10 e 100 µg/ml de p.a.

A partir desses resultados, verifica-se que a faixa da DE₅₀ do procloraz e benomil para o *V.fungicola* situa-se abaixo de 1 µg/ml, enquanto que, para o TBZ está entre 1 e 10 µg/ml (**Figura 10**).

A comparação da sensibilidade do crescimento micelial das duas espécies de *Agaricus* ao benomil, procloraz e TBZ com a eficiência desses fungicidas em inibir o crescimento de *V.fungicola* está na **Tabela 11**. Conforme EDGINGTON *et alii* (1971) os fungos que apresentam DE₅₀ igual ou superior a 50 µg/ml são considerados insensíveis ao fungicida; os que apresentam DE₅₀ entre 1 a 10 µg/ml são considerados moderadamente sensíveis e os que apresentam DE₅₀ menor do que 1 µg/ml são considerados sensíveis ao fungicida.

Por essa classificação, as duas espécies de *Agaricus* são consideradas moderadamente sensíveis ao benomil e procloraz e moderadamente

Figura10 -Gráfico representativo da fungitoxicidade do benomil, procloraz e do TBZ em meio de BDA com 1; 10 e 100 µg/ml de ingrediente ativo à *Verticillium fungicola* DE₅₀ = 50 % no crescimento micelial.

TABELA 11 - Faixa de concentração da DE₅₀ do benomil, procloraz e TBZ para *Agaricus bisporus*, *Agaricus bitorquis* e *Verticillium fungicola*.

FUNGICIDAS	DE ₅₀ (µg/ml)	
	<i>A.bisporus</i> e <i>A.bitorquis</i>	<i>V.fungicola</i>
benomil	<10	<1
procloraz	<10	<1
TBZ	10 a 100	1 a 10

insensíveis ao TBZ. Enquanto que, o *V.fungicola* é considerado sensível ao benomil e procloraz e, moderadamente sensível ao TBZ.

4.5.3. Teste de resistência ao benomil

Nesse trabalho foi detectada a ocorrência de dois isolados de *V.fungicola* que não tiveram o seu crescimento micelial inibido à 100 µg/ml de p.a. , quando o benomil foi incorporado ao meio de BDA (Tabela 8).

A análise de variância dos dados da resistência dos isolados 299-H e 302-H de *V.fungicola* à diferentes doses de benomil, revelou efeito significativo ao nível de 5% de doses e da interação isolados × doses.

O efeito do benomil sobre o crescimento micelial desses dois isolados é apresentado na Tabela 12, onde se constata que ainda houve crescimento nas doses de 500 e 1000 µg/ml. Comparando-se o crescimento dos isolados dentro do fator doses, verifica-se que na dose de 500 µg/ml o isolado 299-H apresentou um crescimento significativamente superior ao isolado 302-H, nas demais doses esse crescimento foi semelhante. Também foi constatado que em função das doses empregadas, houve uma redução linear média ($b = - 28,2617^{**}$) no crescimento micelial dos isolados resistentes.

Tabela 12- Crescimento, em mm de dois isolados de *Verticillium fungicola* em doses crescentes do fungicida benomil em meio de BDA.

ISOLADOS	DOSES (µg/ml)		
	100	500	1000
299-H	76 a ¹	54 ² a	47 a
302-H	76 a	50 b	51 a
Médias	76	52	49

C.V. = 3,35%

1- Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo Teste F à nível de 5% de probabilidade.

5. DISCUSSÃO

O isolamento de *Verticillium* nas diversas propriedades visitadas demonstra que esse patógeno do cogumelo comestível está largamente disseminado em toda a região produtora de cogumelos de Moji das Cruzes. Embora não hajam dados estatísticos oficiais, trata-se, provavelmente, do patógeno que mais prejuízos causa aos produtores. Pelo que foi observado durante o período de coleta de amostras, salvo poucas exceções, a doença por ele causada está presente na grande maioria dos cultivos, especialmente nos fluxos de produção do terço final da cultura. Estes dados concordam com aqueles obtidos por FIGUEIREDO & MUCCI (1985) em levantamento realizado nos municípios de Atibaia e Moji das Cruzes, SP no ano de 1981.

O método clássico de repicagens periódicas, que é amplamente utilizado nos laboratórios de patologia, foi mantido durante todo o período que duraram os experimentos para ser utilizado como parâmetro de comparação com os outros métodos. Esse método, embora adequado para a manutenção da viabilidade das culturas, foi extremamente trabalhoso e não garantiu a estabilidade das características morfológicas e fisiológicas originais das linhagens. Os isolados de *Verticillium* nos pareceram bastante instáveis tendo sido frequente a observação de alterações setoriais de aspecto e coloração. Estas alterações são mais facilmente notadas quando os fungos são cultivados em placas de Petri do que em tubos de ensaio.

Os métodos de preservação em solo e em sílica-gel foram descartados por se mostrarem impróprios para a preservação de viabilidade dos *Verticillium* isolados do cogumelo. Esses resultados negativos já eram esperados porque esses métodos são sabidamente eficientes para fungos produtores de estruturas de resistência com *Alternaria* spp, *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp, *Rhizoctonia* spp, *Fusarium* spp, *Verticillium dahliae* Kleb. *V. albo-atrum* Reink. & Berth., *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. etc. que produzem esporos resistentes, clamidospóros, hifas de resistência ou microesclerócios, mas falham na preservação de fungos que não os produzem (BARKESPIGEL 1953, FIGUEIREDO & PIMENTEL 1989). Este é o caso dos isolados do cogumelo comestível, que não produzem qualquer tipo de estrutura de resistência.

Entre os métodos utilizados para a preservação dos isolados durante o desenvolvimento dos ensaios de laboratório destacaram-se o Método de Castellani (CASTELLANI 1939) e liofilização. Isolados preservados por esses métodos foram recuperados toda vez que, por algum motivo, foi necessário empregá-los para algum teste específico. O método mais frequentemente empregado foi o da água destilada, dada a simplicidade do mesmo e a facilidade com que os frascos eram reconstituídos para novo período de preservação.

Um dos fatores que historicamente dificultam os estudos taxonômicos mais acurados das espécies de *Verticillium* fungícolas é o fato de não existirem amostras dos isolados obtidos pelos autores mais antigos (Costantin & Dufour, Veihmeyer, Smith, etc) nas coleções dos centros de referências depositários de

cultura fúngicas (CBS, ATCC, CMI, etc.)². Isto impossibilita estudos micológicos comparativos.

Nos estudos realizados por FASSATIÒVA (1965) com o propósito de estudar as espécies de *Verticillium* que ocorrem sobre o cogumelo comestível, entre os isolados estudados, autora incluiu a linhagem 90.861 identificada como *V.psalliotae* no CMI deixando de utilizar a linhagem 96.000, de mesma procedência, que havia sido isolada de *A.bisporus* por Manson em 1962 conforme catálogo de culturas do CMI em 1975 (CMI 1975). Embora, entre os 11 isolados, ela tenha empregado um isolado identificado como *V.malthousei* (= *V.fungicola*) proveniente do CBS que teria sido isolado por Ware de acordo com o catálogo do CBS publicado em 1936, (CBS 1936) as descrições apresentadas pela autora o encaixam-se perfeitamente, e somente nas descrições de *V. psalliotae*. Também a ontogenia ou morfogenese das descrições de FASSATIÒVA (1965) coincidem com àquelas de *V.psalliotae* parecendo que a autora trabalhou somente com isolados desta ultima espécie e não com *V.malthousei*.

O emprego da técnica de micro culturas foi bastante útil para os estudos micológicos. Facilitou sobremaneira o exame, as medições, os estudos de ontogenia e a documentação fotomicrográfica dos achados. Nas preparações habituais, onde uma pequena parcela do meio de cultura contendo o fungo é transferida para uma lâmina com corante e coberta com laminula, o arranjo dos conidióforos, das fiálides, e a disposição dos conídios são perturbados, impossibilitando o exame e a documentação

2- CBS- Centraal Bureau Vor Schimmelcultures - Baarn - Holanda ; ATCC American Type Culture Collection - Rockville, Ma, USA; CMI- Commonwealth Micogical Institute - Kew - Inglaterra

fotomicrográfica. Também a elevada capacidade de esporulação e a delicadeza das estruturas dos espécimes estudados são fatores que dificultam uma boa visualização, tornando impraticável os estudos micológicos. O método das micro culturas resolveu este problema. Permitiu os estudos dos espécimes virtualmente "in situ", sem qualquer perturbação das estruturas desenvolvidas sobre a pequena peça de ágar nutritivo.

As comparações dos dados morfológicos de treze culturas obtidas de *A.bisporus* mostraram que as mesmas eram diferentes das espécies fungícolas *V.psalliotae* (TRESCHOW 1941, BRADY & WALLER 1976), *V.biguttatum* W. Gams e também da variedade *V.fungicola* var. *flavidum* Gams & Van Zaayen (GAMS & ZAAYEN 1982). Esta ultima variedade produz escleródios, o que não aconteceu com qualquer dos isolados estudados no presente trabalho. Os doze isolados foram identificados como pertencentes a espécie *V.fungicola* (Preuss) Hassebrauk e uma IB-296-H como *Gliocladium* sp. que apresenta algumas características morfológicas semelhantes a *Verticillium*. Estes estudos confirmaram os resultados preliminares obtidos por COUTINHO & AZEVEDO (1991) que identificaram o fungo causador de doença em cogumelo comestível na região de Moji das Cruzes em São Paulo, como provavelmente, *V.fungicola*.

As medições realizadas nas estruturas somáticas e reprodutivas dos diferentes isolados de *Verticillium* mostraram uma certa variação, mas essa, sempre esteve dentro dos limites de variabilidade esperada para diferentes populações de uma mesma espécie. Quanto a aspectos fisiológicos, oscilações similares puderam ser observadas na curva de crescimento à diversas temperaturas dos diferentes isolados. Entretanto, todos os isolados tiveram o ótimo de crescimento consistentemente ao redor

de 21-27 °C principalmente, 24°C e o crescimento interrompido à 33°C exceto o isolado 367-H que não cresceu à 30°C.

O ponto térmico letal dos conídios de todos os isolados esteve entre 39-40°C que é também o ponto térmico letal referido na literatura para *V.fungicola*.

O isolado identificado como *Gliocladium* sp teve uma curva de crescimento diferente dos demais com o ótimo de crescimento à 27°C e desenvolvimento ainda apreciável mesmo à 33°C.

GAMS & ZAAYEN (1982) e ZAAYEN & GAMS (1982) criaram duas variedades de *Verticillium fungicola*: *V.fungicola* var. *aleophilum* Gams & Van Zaayen e *V.fungicola* var. *flavidum* Gams & Van Zaayen e que deram origem a variedade *V.fungicola* var. *fungicola* automaticamente estabelecida de acordo com o artigo 26 do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (HAWKSWORTH 1974, p. 149). Por várias razões preferimos não entrar no mérito dessa questão nos limitando a identificar os isolados como pertencentes a espécie *V.fungicola*. Entre essas razões, referindo-se a aspectos taxonômicos GAMS & ZAAYEN (1982), dizem à página 63, ao descrever *V.fungicola* var. *aleophilum*: "Como na variedade *fungicola* os conídios são muito variáveis em forma e tamanho. A única diferença consistente entre as variedades é o máximo de temperatura". Ou seja *V.f.f.* - ótimo 20-24°C, máximo à 27°C; *V.f.a.* - ótimo 24-27°, máximo 33°C. Portanto, de acordo com os autores, a diferença real entre *V.fungicola* var. *fungicola* e o *V.fungicola* var. *aleophilum* seria apenas à nível fisiológico. Como usualmente o nome do taxon infra específico *variedade* está nos limites das diferenças morfológicas detectáveis e, de acordo com o que relataram os próprios

autores, essas diferenças não são consistentes, a nosso ver, seria preferível o uso de outros taxons infra específicos mais apropriados para exprimir diferenças fisiológicas como : forma especial, raça, biotipo, etc. Por outro lado, ainda referindo-se a diferenças entre *V.f.f.* e *V.f.a.*, ZAAYEN & GAMS (1982) trabalharam também com aspectos patológicos. Realizaram inoculações experimentais e verificaram que *A.bitorquis*, que prefere temperaturas mais altas (25°C) do que *A.bisporus* (16-18°C) é muito menos suscetível *V.f.f.* do que esta espécie. Entretanto, *V.f.a.* é capaz de produzir manchas marrons deprimidas em *A.bitorquis* reduzindo seu valor comercial. Os autores referiram-se ao fato que *V.f.a.* também seria capaz de causar deformações nos corpos de frutificação de *A.bitorquis* e fizeram descrições comparativas de sintomas causados por uma e outra variedade cujo subjetivismo não permite uma distinção muito clara entre as mesmas. Se fossemos tomar como base o fator temperatura, os espécimes por nós isolados estariam mais próximos de *V.fungicola* var. *aleophilum* (Vide curvas de temperatura das figuras: 2, 3 e 4). Todavia, uma vez que todos os isolados se comportaram igualmente nos testes de patogenicidade produzindo sintomas característicos de "bolha seca" quando inoculados em *A.bisporus* e como não incluímos em nossos experimentos inoculações em *A.bitorquis*, enfatizando o que já foi dito anteriormente, preferimos identificar os isolados simplesmente como *V.fungicola*. Outros estudos serão necessários para esclarecer sobre a possibilidade da existência em nosso meio, de *V.psalliotae* ou mesmo de diferenças marcantes entre as diversas populações de *V.fungicola* a ponto de justificar a criação de novos taxons infra específicos.

Embora, DADWAL & JAMALUDDIN (1984) tenham relatado a presença de *Gliocladium virens* Miller, Giddens & Foster na Índia causando doença no cogumelo comestível *A.bisporus*, no qual induziria lesões marrons necróticas no pileo e

fendilhamentos no estípe essa, seguramente não é a espécie por nós isolada a partir de material colhido na propriedade do Sr. Lee, Bairro de Botujuru em Moji das Cruzes. Esse fato pôde ser comprovado pelas inoculações artificiais realizadas com o isolado 296-H em *A.bisporus*, as quais foram inócuas, não resultando em quaisquer sintomas nos cogumelos inoculados. Por outro lado, algumas estruturas bastante indicativas de espécies nematófagas, como a formação de anéis do tipo não constritantes³, foram observadas na espécie isolada quando esta era cultivada em meio pobre em proteínas (A.A.). Convém salientar que tanto solos ricos em matéria orgânica como o composto utilizado para o cultivo de cogumelos são habitats excelentes para proliferação de espécies nematófagas.

MARLOWE & ROMAINE (1982) na Califórnia, USA, demonstraram que *V.fungicola* infectava tanto *A.bisporus* como *Pleurotus ostreatus*, outra espécie de cogumelo comestível cultivado. Na região de Moji das Cruzes existem várias famílias que cultivam esta espécie. Estudos seriam necessários para determinar se existem perdas causadas por *V.f.* em cultivos de *P.ostreatus*.

Finalmente, a grande importância econômica de *V.fungicola* pode ser avaliada pela existência, no catálogo de 1982 da American Type Culture Collection, de 19 linhagens registradas e mantidas por aquela Organização para fins de estudo científicos (ATCC 1982).

3- Anéis não constritantes são estruturas desenvolvidas por alguns fungos adaptados à caça de nematóides e que parasitam esses organismos como fonte alternativa de proteínas.

Os resultados obtidos nos ensaios sobre o efeito da alternância de temperatura sobre o crescimento vegetativo de *V.fungicola* foram bastante distintos daqueles obtidos por FIGUEIREDO (1972) trabalhando com *Ascochyta phaseolorum* Sacc. . Enquanto a alternância com baixas temperaturas estimularam e as altas temperaturas inibiram o crescimento de *A.phaseolorum* em relação ao crescimento na temperatura base 24°C, no caso de *V.fungicola* a alternância aproximou os crescimentos com o crescimento do ponto de ótimo (24°C). Apenas a alternância com temperatura de 33°C reduziu significativamente o crescimento micelial de *V.fungicola* (Figura 6) . Este é um assunto que merece ser melhor estudado para verificar se períodos curtos de temperaturas elevadas poderiam reduzir significativamente a incidência da doença sem afetar os fluxos de produção do cogumelo.

Com relação a esporulação à diferentes temperaturas, em MAA conforme pode ser observado na Tabela 4 , para a maioria dos isolados a melhor esporulação ocorreu à 24°C coincidindo com a temperatura para melhor crescimento vegetativo. Os isolados 290-H e 293-H esporularam melhor à 21°C mas os valores observados foram muito próximos à 24°C (Tabela 4).

Em meio de BDA o isolado 300-H esporulou melhor à 21°C enquanto os demais à 24° ou 27°C. Neste meio de cultura parece ter havido um deslocamento da esporulação para temperaturas mais altas (27°C). Este aspecto careceria de estudos mais detalhados. Há ainda a considerar que fatores como estes podem, muitas vezes, estar relacionados com o vigor do inoculo inicial que, por vezes, causam pequenas

alterações em ensaios desse tipo. Entretanto, parece estar claro que a melhor esporulação, também neste caso está ao redor de 24°C.

Não foram incluídos no planejamento deste trabalho, estudos sobre o controle profilático porque já existe, sobre o assunto, uma tecnologia bem estabelecida. Todavia, não poderíamos deixar de tecer alguns comentários sobre o problema com base na literatura levantada e nas observações e anotações de campo realizadas no período de visitas aos cultivos comerciais. Foi verificado, por exemplo, que a doença é prevalente no terço final dos cultivos e nas propriedades nas quais as instalações são mais rústicas. Quando os restos da "toalete" (fragmentos de estipe e rizomorfos) realizadas depois das colheitas não são destruídas e são deixadas próximas aos cultivos sem maiores cuidados e há uma grande infestação de moscas Sciaridae e Phoridae a incidência da bolha seca é maior. É importante a coleta do solo de cobertura em locais distantes de cultivo de cogumelos. Quando isso não é possível há necessidade de esterilização do solo por métodos químicos ou pela passagem de vapor aerado (WUEST & MOORE 1972). pois a utilização da terra de cobertura contaminada por *V.fungicola* leva ao aparecimento da doença no início do cultivo. Essa incidência precoce é comercialmente desastrosa levando, seguramente, ao total insucesso. Estes dados estão de acordo com as observações feitas por NAIR & MACAULEY (1987) na Nova Zelândia. Um resumo das principais medidas profiláticas recomendadas em nosso meio podem ser encontradas em trabalho publicado por FIGUEIREDO & MUCCI (1985).

Apesar das pressões dos ambientalistas para que seja evitada a aplicação de defensivos agrícolas nos cultivos de cogumelos, cujas colheitas são realizadas diariamente, a literatura hoje existente sobre o controle alternativo das pragas e

das doenças do cogumelo é ainda inexpressiva. As tentativas preliminares de OLIVIER *et alii* (1978) e OLIVIER (1987) procurando desenvolver alguns métodos para o controle biológico de *V.fungicola* com bactérias ou espécies não patogênicas de *Trichoderma* não tiveram sucesso. Talvez o caminho mais promissor para o possível controle de *V.fungicola* sem a utilização de compostos químicos seja aquele proposto por KALBERER (1984) nos Estados Unidos. Este autor sugeriu o incremento dos estudos da biologia e bioquímica da interação de parasitismo de *V.fungicola* × *Agaricus* spp visando o auxílio na seleção de linhagens geneticamente resistentes à *Verticillium* e a outras doenças do cogumelo causado por fungos.

Há uma certa dificuldade no controle químico da "bolha seca" do cogumelo por meio de fungicidas, uma vez que tanto o patógeno como o hospedeiro pertencem a um mesmo grupo de microrganismos e portanto, sensíveis a fungicidas.

O princípio básico na escolha de fungicidas para o controle de um determinado patógeno está relacionado ao seu espectro de ação, portanto, nesses casos, deve se dar preferência a fungicidas que apresentam princípio ativo mais seletivos.

No início, o controle químico dessa doença era feito desinfetando os utensílios empregados no cultivo do cogumelo com o formaldeído. O primeiro fungicida orgânico recomendado para o controle de *Verticillium* no cogumelo foi o zineb em 1950 (KLINGMAN, 1950; ATKINS, 1952). Em 1970, foi introduzido o benomil por WUEST & COLE JUNIOR (1970) em substituição ao zineb. Posteriormente, outros princípios ativos como o benodanil, carboxin, carbendazim, clorotalonil, imazilil e tridemorph foram testados no controle de *Verticillium*, e outras doenças fúngicas do

cogumelo, porém, esses fungicidas também interferiram no crescimento de *Agaricus* spp (GANDY & SPENCER 1976, 1978; SAMUELS & JOHNSTON 1980; CHALLEN & ELLIOT 1985).

No presente estudo, foram utilizados o benomil, clorotalonil, prochloraz e TBZ, empregados internacionalmente no controle da "bolha seca" do cogumelo, com a finalidade de se observar o comportamento de *V.fungicola*, *A.bisporus* e *A.bitorquis* sob a ação desses fungicidas.

Os resultados obtidos com o clorotalonil demonstraram que esse fungicida inibe o crescimento micelial de *A.bisporus* e *A.bitorquis*, quando empregado na dose de 10 µg/ml de p.a. do produto incorporado ao meio de BDA (Tabela 5), concordando com os resultados obtidos por GANDY & SPENCER (1978). Essa inibição provavelmente ocorreu porque o clorotalonil é um fungicida que apresenta amplo espectro de ação, controlando vários fungos, tanto Hyphomycetos como Basidiomicetos. Embora esse fungicida tenha se mostrado muito eficiente no controle dos isolados de *Verticillium* que apresentam resistência ao benomil ele foi eliminado dos ensaios subsequentes por ser muito tóxico às duas espécies de *Agaricus*.

O prochloraz+Mn provocou uma inibição menor no crescimento micelial na duas espécies de *Agaricus*, na dose de 10 µg/ml, do que o clorotalonil. O crescimento de *Agaricus* só foi inibida pelo prochloraz quando se empregou a dose de 100 µg/ml (Tabela 5). Desse modo, a faixa do DE₅₀ do prochloraz tanto para *A.bisporus* como para *A.bitorquis* situou-se abaixo de 10 µg/ml (Figuras 8 e 9). NAIR &

MACAULEY (1987) obtiveram para esse fungicida uma DE₅₀ entre 20 e 30 µg/ml para *A.bisporus*, valor acima do obtido no presente ensaio.

Dos produtos ensaiados, o procloraz+Mn foi um dos que apresentaram a melhor eficiência no controle de *V.fungicola* quando comparado com os demais fungicidas na dose de 1 µg/ml (Tabela 10). A fungitoxicidade desse fungicida ao *V.fungicola* apresentou uma DE₅₀ menor do que 1 µg/ml (Figura 10).

Pesquisas anteriores tem demonstrado que o procloraz+Mn é eficiente no controle da "bolha seca" (ZAAYEN & ADRICHEN 1982, FLETCHER *et alii* 1983, EICKER 1987 ; NAIR & MACAULEY 1987), obtiveram para esse fungicida DE₅₀ próximos de 2 µg/ml.

O procloraz+Mn tem sido muito eficiente no controle de isolados que são tolerantes ao benomil e o TBZ (FLETCHER *et alii* 1983 ; NAIR & MACAULEY 1987), além disso, como aconteceu no presente estudo (Tabela 8), esse fungicida pode controlar outros patógenos do cogumelo, como, *Mycogone perniciosa*, *Hypomyces rosellus* e *Cladosporium dendroides* (ZAAYEN & ADRICHEN 1982; FLETCHER *et alii* 1983 ; EICKER 1987).

Outros estudos tem demonstrado que o procloraz+Mn não é tóxico para *A.bisporus* e *A.bitorquis* (ZAAYEN & ADRICHEN 1982 ; EICKER 1987), apresentando resíduos baixos e bastante aceitáveis, além de não alterar o sabor do cogumelo (ZAAYEN & ADRICHEN 1982; FLETCHER *et alii* 1983; EICKER 1987 ; NAIR & MACAULEY 1987).

O benomil apresentou o mesmo efeito que o procloraz+Mn na inibição do crescimento micelial das duas espécies de *Agaricus*, na dose de 10 µg/ml de p.a. (Tabela 7). O crescimento de *A.bisporus* e *A.bitorquis* só foi inibido pelo benomil quando se empregou as doses de 100 e 500. µg/ml de p.a., respectivamente (Tabela 5). Portanto, a faixa da DE₅₀ do benomil para *A.bisporus* e *A.bitorquis* situou-se abaixo de 10 µg/ml (figura 8 e 9). WUEST & COLE JUNIOR (1970) já haviam constatado que o *Agaricus* era tolerante ao benomil. Posteriormente, EDGINGTON *et alii* (1971) determinaram a toxicidade do benomil para *A.bisporus*, em meio de malte e, encontraram uma DE₅₀ menor do que 31 µg/ml, enquanto que SNEL & FLETCHER (1971) obtiveram um valor um pouco superior com uma DE₅₀ de 48 µg/ml.

No ensaio, o benomil demonstrou uma eficiência inferior ao procloraz no controle dos 12 isolados de *V.fungicola*, porque apresentou dois isolados (302-H e 299-H) insensíveis à dose de 1 µg/ml (Tabela 10). A fungitoxicidade do benomil apresentou uma DE₅₀ menor do que 1 µg/ml (Figura 9) SNEL & FLETCHER (1971) demonstraram que o benomil apresenta uma DE₅₀ de 0,4 µg/ml para *V.fungicola*.

Várias pesquisas tem demonstrado que o benomil controla *V.fungicola*. Segundo SNEL & FLETCHER (1971) parcelas que estavam com 80% dos cogumelos doentes, após serem tratados com o benomil à 5 µg/ml, apresentavam um controle estimado de 35 a 40% e, total, quando a dose empregada foi de 10 µg/ml. Esses pesquisadores constataram que o benomil não atrasou e nem diminuiu a produção de esporóforos em testes "in vitro". Segundo FLETCHER *et alii* (1983) o benomil também controla *M.perniciosa* e *H. rosellus*.

De maneira semelhante ao procloraz+Mn, as pesquisas tem demonstrado que o cogumelo não apresenta problemas de resíduos quando tratado com o benomil (SNEL & FLETCHER, 1971). Substratos com corpos de frutificação de *A.bisporus* tratados com 10 µg/g de benomil, podem apresentar 0,67 a 3,70 µg de resíduos, e, segundo JALALI & ANDERSON (1976) não foi constatado resíduos nos cogumelos colhidos.

O TBZ, na dose de 10 µg/ml, foi entre os fungicidas testados o que menos interferiu no crescimento micelial do *V.fungicola* (Tabela 7). Embora pertença ao mesmo grupo do benomil, os benzimidazois, este apresentou uma maior seletividade do que aquele, permitindo o crescimento de *A.bisporus* e *A.bitorquis*, na dose de 500 µg/ml (Tabela 6). A faixa de DE₅₀ do TBZ, tanto para *A.bisporus* como para *A.bitorquis* situou-se entre 10 a 100 µg/ml do fungicida (Figuras 8 e 9) SNEL & FLETCHER (1971) haviam constatado em pesquisas anteriores que o TBZ apresentava uma margem seletiva para *Agaricus bisporus* superior ao benomil com DE₅₀ = 100 µg/ml.

Por outro lado, a eficiência do TBZ em inibir o crescimento micelial dos isolados de *V.fungicola* foi inferior ao do procloraz, nas três doses empregadas (Tabelas 8 e 10) e ao benomyl nas doses de 1 e 10 µg/ml (Tabela 9).

A fungitoxicidade do TBZ ao *V.fungicola* nesse ensaio, apresentou uma DE₅₀ entre 1 e 10 µg/ml (Figura 10), enquanto que SNEL & FLETCHER (1971) obtiveram uma DE₅₀ de 0,8 µg/ml. Segundo esses pesquisadores o TBZ não chegou a diminuir a produção de esporóforos nos testes "in vitro".

Foi verificado também nos ensaios realizados que a linhagem de *A.bitorquis* apresentou uma maior tolerância aos fungicidas benomil, procloraz+Mn e TBZ do que a linhagem de *A.bisporus* (Tabela 7). Isto se deve a essa linhagem apresentar naturalmente um maior crescimento do que *A.bisporus* (Tabela 5). Pelos dados obtidos, observa-se uma diferença de sensibilidade entre as duas espécies de *Agaricus* e *V.fungicola* aos fungicidas benomil, procloraz e tiabendazol, como apresentado na Tabela 11. Entretanto, essa diferença de sensibilidade foi menor do que as observadas por NAIR & MACAULEY (1987) para o procloraz e SNEL & FLETCHER (1971) para o benomil e o TBZ. Isso pode sugerir que a linhagem de *A.bisporus* ensaiada seja menos tolerante aos fungicidas empregados do que a linhagem de *A.bisporus* empregada por esses pesquisadores.

Nesse trabalho foi constatado a ocorrência de 2 isolados de *V. fungicola*, causadores da "bolha seca" do cogumelo (*A.bisporus*), resistentes ou tolerantes ao fungicida benomil (Tabela 5). Esses isolados foram obtidos de cogumelos colhidos através de levantamento efetuado no período de 1985 a 1989 na região de Moji das Cruzes-SP (Tabela 2)

Os isolados 299-H e 302-H foram ensaiados "in vitro" quanto a sua sensibilidade ao benomil nas doses de 100, 500 e 1000 µg/ml, pelo método do disco de micélio com o fungicida incorporado ao meio de cultura. Pelos resultados obtidos e apresentados na Tabela 12, verificou-se que esses isolados tiveram um grande crescimento micelial em meio contendo até 1000 µg/ml de benomil, o que corresponde a uma DE₅₀ superior a essa dose. Segundo EDGINGTON *et alii* (1971) a toxicidade do

benomil no meio de cultura com BDA para o *Verticillium albo-atrum* é $DE_{50} = 0,2 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ e os fungos que apresentam DE_{50} igual ou superior a $50 \mu\text{g/ml}$ são considerados insensíveis ao fungicida. No presente estudo verificou-se uma grande diferença entre as linhagens resistentes ($1000 \mu\text{g/ml}$) e as sensíveis ($1 \mu\text{g/ml}$), conforme foi demonstrado nas Tabelas 10 e 12.

O primeiro relato de espécies fungícolas de *Verticillium* resistentes ao benomil foi feita por WUEST *et alii* (1974) que encontraram isolados naturalmente tolerantes em populações do patógeno. Eles verificaram que cada vez que o benomil era aplicado, os indivíduos suscetíveis eram eliminados da população e os tolerantes sobreviviam. Segundo esses autores, a pressão de seleção exercida pelas sucessivas aplicações do benomil, modificaram a razão de isolados tolerantes e sensíveis e, com isso, populações tolerantes tornaram-se a maioria. O presente estudo, constatou pela primeira vez no Brasil a ocorrência de isolados de *V.fungicola* apresentando resistência ao benomil.

O surgimento de isolados resistentes ao benomil ocorre porque esse fungicida tem sido empregado intensamente no controle de muitas doenças. Segundo DELF (1980), além de ocorrerem isolados naturalmente resistentes numa população fúngica, também, o modo de ação específico desse fungicida favorece o aparecimento de casos de resistência. Pesquisas tem demonstrado que os fungicidas do grupo dos benzimidazois apresentam o mesmo mecanismo de ação, interferindo na fase mitótica da célula fúngica (DAVIDSE & FLACH 1977). NAIR & MACAULEY (1987) obtiveram em laboratório vários isolados de *V.f.f.* e *V.f.a.* resistentes ao TBZ e, SAMUELS &

JOHNSTON (1980) contataram isolados de *V.f.* e *V.p.* que não foram controlados pelo benomil.

Um levantamento realizado por GAZE & FLETCHER (1975) na Inglaterra constatou que 50% das propriedades apresentavam *V.f.* tolerantes ao benomil, sendo que em 33% dessas propriedades a incidência era severa com perdas ao redor de 10% da produção. Dos 229 isolados coletados em todo país, 85 deles tinham o DE_{50} = 0,5 µg/ml, 20 isolados de 5 a 50 µg/ml e 124 isolados de 50 a 500 µg/ml. FLETCHER & YARHAN (1976) também estudaram a sensibilidade de 299 isolados de *V.f.* ao benomil e obtiveram 63% desses isolados apresentando alguma tolerância e 53% muito tolerantes com DE_{50} acima de 50 µg/ml. No Brasil, até o momento não existem estudos de levantamento dos locais de ocorrência de isolados de *V.f.* resistentes ao benomil.

O sucesso obtido com a aplicação dos benzimidazóis no controle de várias doenças provocaram uma diminuição nos cuidados fitos sanitários em muitas propriedades produtoras. Segundo GANDY & SPENCER (1974) nos locais onde ocorreram processos de tolerância, deveriam ser retomadas as antigas práticas de fitossanidade, até que novos produtos fossem recomendados.

No conjunto dos dados verifica-se que o TBZ embora tenha sido bastante seletivo para *Agaricus*, foi pouco eficiente no controle de *V.fungicola* na dose de 10 µg/ml. Já, o benomil e o procloraz+Mn apresentam a mesma interferência sobre o crescimento micelial das duas espécies de *Agaricus*., entretanto, devido a constatação da existência de dois isolados de *V.fungicola* resistentes ao benomil, o procloraz+Mn foi considerado mais adequado no controle desse fungo.

As pesquisas realizadas no exterior tem mostrado que tanto o benomil como o procloraz+Mn são empregados em cultivos comerciais no controle de *V.fungicola*. ZAAYEN & ADRICHEN (1982) e EICKER (1987) recomendaram a aplicação de 1,5 g p.a./m² de procloraz+Mn, 9 dias após a distribuição do solo de cobertura, repetindo a operação no final da colheita do primeiro fluxo de produção. Para o benomil, HOLMES *et alii* (1971) recomendam a aplicação de 0,3 g/l do produto, após a distribuição do solo de cobertura.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a necessidade de serem efetuados testes complementares "in vitro" sobre a sensibilidade na duas espécies de *Agaricus* e em *V.fungicola* a esses e outros fungicidas em doses menores do que 1 µg/ml de p.a. Posteriormente, deve-se avaliar a eficiência dos fungicidas em cultivos comerciais para o controle da "bolha seca" do cogumelo e seu efeito na produção, uma vez que no Brasil ainda não existem estudos nesse sentido.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- 1- Os melhores métodos para a manutenção de culturas viáveis e inalteradas de *Verticillium* causadores de doença nos cogumelos comestíveis são os métodos da água destilada (Castellani) e liofilização.
- 2- A doença mais importante do cogumelo comestível (*Agaricus bisporus*) no Estado de São Paulo é a "bolha seca", causada por *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk.
- 3- A temperatura ótima para o crescimento micelial dos isolados situa-se entre 21 a 27°C predominando, para a maioria, a temperatura de 24°C. Não houve crescimento à 33°C para os isolados e o ponto térmico letal dos conídios de *V.fungicola* como estando ente 39-40°C.
- 4- O fungicida procloraz+Mn foi mais eficiente na inibição do crescimento micelial de *Verticillium fungicola*; porém apresentou média fungitoxicidade às duas espécies de *Agaricus* e o TBZ, embora bastante seletivo à *Agaricus*, apresentou baixa eficiência na inibição do crescimento de *V.fungicola*.
- 5- Foi demonstrado, pela primeira vez, no País a existência de populações de *Verticillium fungicola* resistentes ou tolerantes ao benomil.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, J.F. do. A cultura do cogumelo **Biológico**, **20**: 126-128, 1954.

AMARAL, J.F. do. Doenças concorrentes na cultura do cogumelo comestível. **Biológico**, **30**: 299-301, 1964.

ATCC American Type Culture Collection. Catalogue of Strains I. 50th ed. Rockville Ma., 1982, 753p.

ATKINS, F.C. **Mushroom growing today** London, Faber & Faber Ltd. , 1952. 198p.

BARKEPIGEL, A. Soil as a storage medium for fungi. **Mycologia**, **45**:596-604, 1953.

BARKEPIGEL, A. A further report on the soil storage of fungi. **Mycologia**, **46**: 680-681, 1954.

BONONI, V.L.R. & TRUFEM, S.F.B. **Cogumelos comestíveis**. Ed. Ícone, São Paulo, SP, 1986, 83p.

BRADY, B. L. K. & GIBSON, I.A.S. *Verticillium fungicola*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, No. 498, 1976.

BRADY, B. L. K. & WALLER, J.M. *Verticillium psalliotae* CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, No. 497, 1976.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water J. Trop. Med. & Hyg. 24: 270-276, 1939.

CBS. List of Cultures. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn. Holanda. 1936, 113 p.

CHALLEN, M.P. & ELLIOTT, T.J. The "in vitro" responses to a range of fungicides of two strains of the mushroom *Agaricus bisporus* and the pathogen *Verticillium fungicola*. Mycopathol., 90: 161-164, 1985.

CHANG, S.T. & HAYES, W.A. The biology and cultivation of edible mushrooms N.Y. Academic Press Inc. 1978, 819p

CMI. Catalogue of the culture collection of the Commonwealth Mycological Institute. 70th ed. Kew, Inglaterra. 1975. 295 p.

COUTINHO, L.N. Suscetibilidade de *Agaricus campestris* L. em diferentes fases de seu desenvolvimento ao fungo *Verticillium* sp. Summa Phytopathol., 14: 66, 1988.

COUTINHO, L.N. & AZEVEDO, J.L. *Verticillium fungicola* (Preuss.) Hassebrauk (*V.malthousei* Ware), agente causal da "bolha seca", principal doença do cogumelo comestível (*Agaricus bisporus*) (Lange) Sing. no Estado de São Paulo **Fitopatol. Bras** : 16 (2), 1991.

COUTINHO, L.N. & CARVALHO JUNIOR, A.A. Fungo captor de nematóide isolado a partir de composto para cultivo de cogumelo comestível (*Agaricus bisporus* (Lange) Sing.. **Arq. Inst. Biol.** :57 (Supl.) :30, 1990.

COUTINHO, L.N. ; KIM, Y.S.; FIGUEIREDO, M.B. Levantamento de fungos causadores de doenças e competidores em cultura do cogumelo comestível (*Agaricus campestris* L.) **Fitopatol. Bras.**, 12 : 123, 1987.

DADWAL, V.S. & JAMALUDDIN. A new disease of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) **Curr. Sci.**, 53: 532-533, 1984.

DAVIDSE, L.C. & FLACH, W. Differential binding of methyl benzimidazol - 2 -yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to their antimetabolic agent in mutant of *Aspergillus nidulans* **Journal of Cell Biol.**, 72:174-193, 1977.

DE KOMAID, A.VAN G. Viability of fungal cultures after ten years of storage in sterile water at room temperature. **Rev.Latinam. Microbiol.**, 30: 219-221, 1988.

DELF, C.J. Coping with resistance to plant disease control agents. **Plant Dis.**, 64: 652-657, 1980.

- EDGINGTON, L.V.; KHEW, K. L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, **61**; 42-44, 1971.
- EIKER, A. A report on the use of prochloraz-manganese complex for controlling of major fungal pathogens of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) in the South Africa . *S. Afr. J. Bot.*, **53**: 345-348, 1987.
- ELLIS, J.J. Preserving fungus strains in sterile water *Mycologia*, **71**: 1072-1075, 1979.
- FASSATIÒVA, O Über die auffassung der Art *Verticillium malthousei* Ware. *Preslia*, **37**: 363-368, 1965.
- FEKETE, K. Über Morphologie, Biologie und Bekämpfung von *Verticillium malthousei*, enem parasiten des kulturchampignons. *Phytopathol. Z.* **59**: 1-32, 1967.
- FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patogênicos em plantas. *Biológico*, **33**:9-13, 1967.
- FIGUEIREDO, M.B. Resenha de dados obtidos sobre o método de preservação em água destilada. *Rev. Soc. Bras. Fitopatol*, **4**: 89-91, 1971.

FIGUEIREDO, M.B. Estudos fisiológicos e serológicos sobre o fungo *Ascochyta phaseolorum* Sacc. e sobre a doença por ele causada em berinjela (*Solanum melongena* L.) e em outras plantas cultivadas. Piracicaba, 1972. 130p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

FIGUEIREDO, M.B. & MUCCI, E.S.F. Doenças e pragas do cogumelo comestível (*Agaricus campestris* L. ex. Fr.) In: Encontro Nacional de Cogumelos Comestíveis.1, Moji das Cruzes,SP 1985. *Anais*. São Paulo, Instituto de Botânica,1985. 140 p.

FIGUEIREDO, M.B. & PIMENTEL, C.P.V. Primeiro Catálogo da micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica. *Arq. Inst. Biol*, **44**: 247-256, 1977.

FIGUEIREDO, M.B. & PIMENTEL, C.P.V. Métodos de preservação de fungos em cultura. *Biológico*, **55**:27-33, 1989.

FLETCHER, J. T.; HIMMS, M. J.; HALL, R.T. The control of dry bubble and cobweb disease of mushroom with prochloraz. *Plant. Pathol.*, **32**: 123-131, 1983.

FLETCHER, J. T. & YARHAN, D. J. The incidence of benomyl tolerance in *Verticillium fungicola*, *Micogone perniciosus* and *Hypomyces rosellus* in mushroom crops. *Ann. Appl. Biol.*, **84**:343-353, 1976.

FORCELINI, C.A. & REIS, E.M. Controle de *Helminthosporium sativum*, *Septoria nodorum*, *Fusarium graminearum* e *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* pelo tratamento de sementes de trigo com fungicidas. **Fitopatol. Bras.** 13:28-31, 1988.

GAMS, W & ZAAYEN, A. VAN. Contribution to the taxonomy and pathogenicity of fungicolous *Verticillium* species. I TAXONOMY. **Neth. J. Plant. Pathol.**, 88: 57-78, 1982.

GANDY, D.G. Observation on the development of *Verticillium malthousei* in mushroom crops and the role of cultural practices in its control. **Mushroom. Sci.**, 8:171-181, 1972.

GANDY, D.G. & SPENCER, D.M. Fungicide tolerance and its implications. **Mushroom. J.**, 8:468-470, 1974.

GANDY, D.G. & SPENCER, D.M. The use of chlorothalonil for the control of benzimidazole tolerant strains of *Verticillium fungicola* (Preuss.) Hassebr. on the cultivated mushroom. **Scientia Hort.**, 5: 13-21, 1976.

GANDY, D.G. & SPENCER, D.M. The interaction between mushroom strains and fungicides in the control of dry bubble disease caused by *Verticillium fungicola*. **Ann. Appl. Biol.**, 90: 355-360, 1978.

GARCIA-JOVER, S. & PEREZ DE, A. Viabilidad de los hongos em água destilada **Rev Latinam. Microbiol. y Parasit.**, 9: 61-64, 1967.

GAZE, R.H. & FLETCHER, J.T. ADAS Survey of mushroom disease and fungicide usage 1974/75. **Mushroom.J.** 35:370-376, 1975.

GELMINI, A.G. & NOVO, J.P.S. **Defensivos Agrícolas, informações básicas e legislação.** Ed. Fundação Cargill, 1987. 577p

GUILLAUMES, J. & OLIVIER, J.M. Desinfection des murs de caves.. In.: Intern.Sci. Con. Cult. Edib. Fung., 11, Australia, 1981. **Proceedings. Mushroom. Sci.**, 21: 455-472, 1981.

HASSEBRAUK,K. Pilzliche Parasiten der Getreidoroste. **Phytopath. Z.**, 9:513-516, 1936.

HAWKSWORTH, D.L. **Mycologist's Handbook.** Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute Kew, 1974. 231p,

HOLMES, J.; COLE JUNIOR, H.; WUEST, P.J. Control of the *Verticillium* disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*, with benomyl spray applications to the cased trays **Plant Dis. Rept.**, 55: 684-687, 1971.

JALALI, I. & ANDERSON, J.P.E. Uptake of benomyl by the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. **J.Agric. Food. Chem.**, 24: 431-472, 1976.

- KALBERER, P.P. Some properties of an extracellular proteolytic enzyme of *Verticillium fungicola* a pathogen of *Agaricus bisporus*. *Phytopath. Z.*, **110**: 213-220, 1984.
- KLINGMAN, M.A. *Handbook of Mushroom Culture*. Pennsylvania, USA, Business Press., 1950. 356 p.
- LAMBERT, D.H. & WUEST, P.J. Increased sensitivity to zineb for *Verticillium dahliae* strains tolerant to benomyl. *Phytopathology* **65**: 637-638, 1975.
- MALAVOLTA, V. M. A. Patogenicidade de isolados do gênero *Myrothecium* em cultivares comerciais de arroz (*Oryza sativa* L.) Piracicaba, 1985 57p (Mestrado- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- MARLOWE, A. & ROMAINE, C.P. Dry bubble of Oyster mushroom caused by *Verticillium fungicola* *Plant Dis.*, **66**: 859-860, 1982
- MENTEN, O.M.; MACHADO, C.C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". *Fitopatol. Bras.*, Brasília, DF **1**: 57-66, 1976.
- MOORE, R.K. & WUEST, P.J. Occurrence and severity of *Verticillium* disease of mushrooms produced on casing soil treated with aerated steam. *Phytopathology*, **63**: 1368-1374, 1973.

MUCCI, E. S. F. & FIGUEIREDO, M.B. Levantamento das doenças e competidores do cogumelo comestível no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathol.**, 7:8, 1981.

NAIR, N. G. & MACAULEY, B. J. Dry bubble disease of *Agaricus bisporus* and *A.bitorquis* and its control by prochloraz- manganese complex. **N. Z. J. Agric. Res.**, 30: 107-116, 1987.

OLIVIER, J.M.; GUILLAUMES, J.; CHIRON, E. Biologie de Quelques Ennemis du Champignon de Couche **Mushroom Sci.**, 10: 723-740, 1978.

OLIVIER, J.M. Evolution of the Phytopathological Situation in French Caves. In: INT. SYMP. SCIENTIFIC AND THECHN. ASPECTS OF CULTIV. ED. FUNG Pennsylvania, PA, 1986.Proceedings. **Develop. Crop Scien.**, PA, USA, 10, Elsevier Sci. Publ. B.V. Amsterd. Holanda, 1987.

PERKINS, D.D. Preservation of *Neurospora* stok cultures with anhydrous silica gel **Can. J. Microbiol.**, 8: 591-594, 1962.

PICCINI, E. & PASCHOLATI, S.F. Viabilidade de isolados de *Colletotrichum graminicola* após conservação de 14 anos pelo Método de Castellani In: VI Reunião Anual do Instituto Biológico , RAIB 6, Resumos, , 1993. . p.32.

PIMENTEL, C.P.V. ; PITTA, G.P.B.; FIGUEIREDO, M.B. Preservação da patogenicidade de alguns fungos em água destilada **Biológico**, 46: 279-308, 1980.

RETTEW, G.R. & THOMPSON, F.G . **Manual of mushroom culture**. Mushroom Supply Company.,Toughkenamon, P.A. USA 1948 . 272 p.

SAMUELS, G.L. & JOHNSTON, J.P. Benomyl and the *Verticillium* disease of cultivated mushrooms. **N. Z. J. Agric. Res.**, **23**:155-157, 1980.

SEILER, J.P The mutagenicity of benzimidazole derivatives . **Mutat. Res.**, **15**: 273, 1972.

SMITH, F.E.V . Three diseases of cultivated mushrooms. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, 81-97, 1924.

SOHI, H.S. Diseases of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) in India and their control. **Ind. J. Mycol. Plant Pathol.**, **18** : 10-18, 1988.

SOKAL, R.R. & ROHLF, J. F. **Biometry**. W.H. Freeman and Company ed. 1969. 776p.

SNEL, M. & FLETCHER, J.T. Benomyl and thiabendazole for the control of mushroom diseases **Pl. Dis. Rept.**, **55**: 120-121, 1971.

SPENCER, D.M . Results in practice II- Glasshouse Crops. In: MARCH, R.W. ed. **Systemic Fungicides** 2 ed.. New York, Longman, 1977. Chapter 11-II, p. 240-258. 1979

STOREY, I. F. *Cephalosporium* sp attacking mushrooms . **Mushroom J.**, 20: 310-312, 1974.

TORREND, C.S.J. **Os cogumelos na alimentação e sua cultura.** Ed. Chácaras e Quintais, São Paulo, SP 1951. 19p.

TRESCHOW, C. The *Verticillium* diseases of cultivated mushrooms. **Dan. Bot. Ark.**, 11 1-31, 1941.

TSENG, M.C. & LUONG, J. H. Mushroom cultivation - Technology for commercial production . **Ann. Rep. Ferm. Process.**, 7: 45-47, 1984.

TUTTE, J. **Plant Pathological Methods.** Fungi and Bacteria . Minneapolis, Minn., Burgess Publishing Company, 1969 239 p.

UPSTONE, M. E. & CARTER, M. A. The occurrence of *Verticillium psalliotae* on *Agaricus bitorquis* in Surrey. **Mushroom J.**, 73:38-40, 1979.

URDANETA, S. M. & LACAZ, C.S. Preservation of fungi in distilled water - preliminary results **Rev. Inst. Med. Trop.**, SP, 7: 24-26, 1965.

WARE, W.M. A disease of cultivated mushrooms caused by *Verticillium malthousei* sp. nov. **Ann. Bot.**, 47: 764-783, 1933.

WONG, W.C. & PREECE T. F. . Sources of *Verticillium fungicola* on a commercial mushroom farm in England. **Plant Pathol.**, **23**:577-582, 1987.

WUEST, P.J. & COLE JUNIOR, H. Effect of three fungicides on vegetative growth of *Verticillium malthousei* and *Agaricus bisporus* isolates **Phytopathology**, **60**: 1320, 1970.

WUEST, J. P. ; COLE JUNIOR, H. ; SANDERS, P. L. Tolerance of *Verticillium malthousei* to benomyl **Phytopathology**, **64**: 331-334, 1974.

WUEST, P. J. ; BAKER, K. F.; CONWAY, W. S. Sensitivity of selected mushroom pathogens to aerated stem **Phytopathology**, **60**: 1274-1275, 1970

WUEST, P.J.; COLE JUNIOR, H.; PATTON, T.G. Influence of benomyl on mushroom production. **Can. J. Plant Sci.**, **52**: 811-815, 1972.

WUEST, P.J. & MOORE, R.K. Additional data on the thermal sensitivity of selected fungi associated with *Agaricus bisporus* . **Phytopathology**, **62**: 1470-1472, 1972.

ZAAYEN, A. VAN . *Verticillium* sp a pathogen of *Agaricus bitorquis*. **Mushroom Sci.**, **11**: 591-595, 1981. .

ZAAYEN, A. VAN & ADRICHEN, J.C.J. VAN. Prochloraz for control of fungal pathogens of cultivated mushrooms. **Neth. J. Plant. Pathol.**, **88**: 203-213, 1982.

ZAAYEN, A. VAN & GAMS, W. Contribution to the taxonomy and pathogenicity of fungicolous *Verticillium* species. II PATHOGENICITY. **Neth. J. Plant. Pathol.**, **88**:143-154, 1982.