



**WILLIAM PEREIRA MACIEL**

**CULTIVO DE *Lentinula edodes* EM DIFERENTES  
CONDIÇÕES DE SUBSTRATO E  
TEMPERATURA**

**LAVRAS – MG**

**2012**

**WILLIAM PEREIRA MACIEL**

**CULTIVO DE *Lentinula edodes* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE  
SUBSTRATO E TEMPERATURA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

PhD. Eustáquio Souza Dias

**LAVRAS - MG**

**2012**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Maciel, William Pereira.

Cultivo de *Lentinula edodes* em diferentes condições de substrato e temperatura / William Pereira Maciel. – Lavras : UFLA, 2012.

34 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Eustáquio Souza Dias.

Bibliografia.

1. Shiitake. 2. Eficiência biológica. 3. Linhagens. 4. Ambiente. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.222

**WILLIAM PEREIRA MACIEL**

**CULTIVO DE *Lentinula edodes* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE  
SUBSTRATO E TEMPERATURA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de fevereiro de 2012.

PhD. Eustáquio Souza Dias                      UFLA

PhD. Sebastião Carlos da Silva Rosado      UFLA

PhD. Diego Cunha Zied                         FCA/UNESP

PhD. Eustáquio Souza Dias

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2012**

*A meu pai, Nilton Maciel (in memoriam), pelo estímulo.*

*A minha mãe, Natália, pelo apoio e educação.*

*A minha irmã, Ericka, pela amizade.*

*A minha irmã, Rita, pelo apoio.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao professor Eustáquio Souza Dias, pela orientação, apoio e pela confiança depositada.

Ao professor Romildo da Silva, pelas sugestões.

À professora Rosane Freitas Schwan, pelos ensinamentos durante os seminários e durante a sua disciplina.

À professora Cristina Ferreira Silva e Batista, pela atenção e apoio que me foi dado sempre que solicitado.

Ao professor Gabriel José de Carvalho, pelas sugestões e críticas de grande ajuda para o desenvolvimento do projeto.

Ao Zé Guilherme e Marcelo, por permitirem que parte do experimento fosse realizado na Fazenda Champ Gourmet.

Ao Vinícius, pela amizade e ajuda no desenvolvimento do experimento.

Ao Paulinho, pela ajuda.

Ao Emerson e ao Thiago, pela amizade e companheirismo.

As minhas amigas do laboratório, Simone, Manuela e Débora, que me apoiaram e auxiliaram em alguns momentos.

À secretária Rose, pela paciência e ajuda nas questões burocráticas.

Aos meus amigos e parceiros, William, Rúbio e Rafael, agradeço, do fundo do coração, pelo incentivo e companheirismo.

A todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que esse trabalho tenha sido desenvolvido.

## RESUMO

A produtividade de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler é influenciada por diversos fatores, como tipo de linhagem, temperatura, formulação do substrato de cultivo e competição com outros fungos. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência biológica (EB) de cinco linhagens de *L. edodes* (Le<sub>1</sub>, Le<sub>2</sub>, Le<sub>3</sub>, Le<sub>4</sub> e Le<sub>6</sub>) em função de dois ambientes, um com temperatura controlada e outro sem controle de temperatura; do tipo de substrato, foram três formulações, variando-se a concentração e os tipos de farelos utilizados como suplemento e do pré-tratamento da serragem: duas formulações com serragem lavada e as mesmas formulações com serragem não lavada. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a EB foi melhor para todas as linhagens com o substrato que teve maior concentração de farelos, porém, com relação aos dois ambientes de cultivo, o ambiente com temperatura controlada foi melhor para Le<sub>2</sub>, Le<sub>3</sub> e Le<sub>6</sub>, com 79,55%, 75,81% e 82,3% de EB, respectivamente. Le<sub>1</sub> apresentou a mesma EB (78,6) nos dois ambientes de cultivo, enquanto Le<sub>4</sub> apresentou melhor desempenho no ambiente sem controle de temperatura, com 83,14% EB. Não houve diferença na EB entre a serragem lavada e não lavada para cada bloco que produziu cogumelos, porém, o tratamento com serragem lavada teve menor índice de contaminação, ou seja, ao se considerar a produção total, o uso de serragem lavada permite uma maior produção.

Palavras-chave: *Lentinula edodes*. Eficiência biológica. Linhagens. Ambiente.

## ABSTRACT

The productivity of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler is influenced by several factors: lineage types, temperature, formulation of the cultivation substrate and competition with other fungi. The objective of this work was to evaluate the biological efficiency (BE) of five lineages of *L. edodes* (Le<sub>1</sub>, Le<sub>2</sub>, Le<sub>3</sub>, Le<sub>4</sub> and Le<sub>6</sub>) in function of two environments: one with controlled temperature and the other without temperature control; of the substrate type: there were 3 formulations with varied concentrations and the types of meal used as supplement; and of the sawdust pre-treatment: two formulations with washed sawdust and the same formulations with unwashed sawdust. According to the results obtained, it was verified that BE was better for all of the lineages in the substrate with higher meal concentration, however regarding the 2 cultivation environments, the controlled temperature environment was better for Le<sub>2</sub>, Le<sub>3</sub> and Le<sub>6</sub>, with 79.55, 75.81 and 82.3% of EB respectively. Le<sub>1</sub> presented the same BE (78.6) in the two cultivation environments, while Le<sub>4</sub> presented better performance in the environment without temperature control with 83.14% EB. There was no difference in BE between the washed and unwashed sawdust for each block that produced mushrooms, however the treatment with washed sawdust had lower contamination, in other words, when considering the total production, the use of washed sawdust allows higher production.

Keywords: *Lentinula edodes*. Biological efficiency. Sawdust. Environment.



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	10
2.1	<i>Lentinula edodes</i> .....	10
2.2	Cultivo de Shiitake.....	11
2.2.1	Substrato de cultivo .....	12
2.2.2	Serragem .....	13
2.2.3	Condições Físicas para o cultivo de <i>Lentinula edodes</i> .....	14
2.4	Contaminantes presentes no cultivo de Shiitake.....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1	Local de realização do experimento .....	16
2.2	Produção do inoculante.....	16
2.3	Preparo e inoculação do substrato .....	17
2.4	Indução da frutificação e colheita de <i>L. edodes</i> .....	17
2.5	Cultivo de <i>L. edodes</i> em dois ambientes.....	18
2.6	Tratamento da serragem para o cultivo de Shiitake .....	19
2.7	Isolamento e identificação dos contaminantes presentes nos blocos de cultivo.....	19
2.8	Antagonismo entre as linhagens de <i>L. edodes</i> e os contaminantes presentes nos blocos de cultivo .....	20
2.9	Efeito do pH no crescimento das linhagens de <i>L. edodes</i> e dos contaminantes .....	20
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
3.1	Eficiência biológica em função da temperatura e do substrato.....	22
3.2	Eficiência biológica em relação ao tratamento da serragem .....	24
3.3	Resistência aos contaminantes.....	25
3.4	Efeito do pH no crescimento dos microrganismos estudados.....	27
4	CONCLUSÕES.....	29
	REFERÊNCIAS.....	30

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo de shiitake, no Brasil, teve início há cerca de duas décadas e vem aumentando significativamente, em virtude da possibilidade de ser cultivado em pequenas áreas e por constituir uma boa fonte alternativa de renda (PAULA et al., 2001). De todos os cogumelos cultivados no mundo, o shiitake ocupa o segundo lugar (CHANG; MILES, 2004).

Na América Latina, 870 toneladas de shiitake foram produzidas em 2002, sendo o Brasil o maior produtor, com 92% e o México, com 3,45% do total (HERNÁNDEZ et al., 2011). Alguns dos principais problemas enfrentados durante o cultivo de shiitake no Brasil estão associados a ambientes com baixo controle de temperatura, umidade, iluminação e ventilação do ar. Esses fatores podem favorecer o crescimento de fungos causadores de bolor verde no bloco de cultivo (NEVES; GRACIOLLI, 2008).

Em relação ao substrato, *Lentinula edodes* é muito eficiente em degradar serragem de carvalho suplementado com 20% a 30% (peso seco) com farelo de trigo, farelo de arroz e palha de milho (PIRE; WRIGHT; ALBERTO, 2001). Palha de trigo e outros subprodutos agrícolas resultantes do processamento de milho, algodão, girassol, uvas, café, cacau e outras plantas foram examinadas como substratos alternativos para o cultivo de cogumelos (LÓPEZ; VALENCIA; CHANG, 2004). No entanto, pouco se sabe sobre seu rendimento em substratos à base de serragem de eucalipto, suplementado com diferentes concentrações de substratos associados ao tipo de linhagem e variação de temperatura durante a frutificação.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento de seis diferentes linhagens de *L. edodes* em função da presença de fungos competidores, da temperatura durante o período de frutificação e da suplementação do substrato com diferentes farelos em diferentes concentrações.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Lentinula edodes*

O cogumelo *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, comumente conhecido na China como “shiang-gu” e no Japão, como “shiitake” (CHANG; KWAN; KANG, 1996), cresce como saprófita em madeiras de árvores e forma corpos de frutificação a temperaturas entre 18 °C a 22 °C, sob condições de umidade próximas a 90%. Este cogumelo pode ser encontrado crescendo naturalmente na China, no Japão, na Coréia, nas montanhas do Himalaia, ao norte de Bornéu, nas Filipinas e na parte norte da Tailândia (CAMPBELL; SLEE, 1987). Seu cultivo foi iniciado na China há cerca de 1.100 anos antes de Cristo e suas técnicas foram posteriormente introduzidas no Japão pelos agricultores chineses (ROYSE, 1985), tornando-se, atualmente, um dos cogumelos mais consumidos no mundo (RAJARATHNAM; SHASHIREKA; BANO, 1992; ROYSE, 1985), e com expectativa de continuar em ascensão (WORRAL; YANG, 1992).

Por ser apto a utilizar lignina, celulose e hemicelulose como fonte de carbono e nutrientes, o shiitake pode ser cultivado em uma grande variedade de resíduos agrícolas, dentre eles o bagaço de cana (EIRA; MINHONI, 1996). Por ter característica fibrosa, quando prensado, o bagaço pode condicionar espaços com aeração suficiente para o crescimento micelial, uma vantagem para o cultivo de shiitake. No entanto, por ser resultante de cana-de-açúcar, que sofreu diversos tipos de tratamento e lavagens em usinas de produção de álcool e açúcar, é um resíduo final rico em parede celular, de baixo conteúdo de células inteiras, baixa densidade e pobre em proteínas e minerais (SANTOS, 1990).

## 2.2 Cultivo de shiitake

O cultivo de shiitake no Brasil, na maioria das vezes, é feito em pequenas propriedades e de maneira rudimentar, utilizando-se instalações já existentes e adaptadas. O estado de São Paulo destaca-se como o maior produtor nacional. Lá, muitos descendentes de imigrantes orientais produzem o cogumelo em sistema familiar de pequenas propriedades, trabalhando em mutirão (BONONI et al., 1995).

O cultivo de shiitake pode ser dividido em duas categorias: uma forma rudimentar de cultivo realizada em toras de madeira e outra forma, que requer mais tecnologia, que é o cultivo em substratos sintéticos (CHANG; MILES, 2004). Tradicionalmente, o shiitake é produzido em cepos de eucalipto, mas o cultivo axênico em substratos sintéticos à base de diversos resíduos agrícolas é uma alternativa rentável na produção comercial deste cogumelo, uma vez que a colheita acontece mais rapidamente e a eficiência biológica do fungo é bastante elevada (HIROMOTO, 1991; LEVANON et al., 1993; PRZYBYLOWICZ; DONOGHUE, 1988).

Portanto, o cultivo em substrato sintético oferece maior rentabilidade, quando comparado ao cultivo tradicional em toras, porque oferece vantagens importantes em relação ao método rústico, tais como menor tempo e maior eficiência biológica da produção (KALBERER, 2000; KIRCHHOFF; LELLEY, 1991; TAN; MOORE, 1992). No entanto, este sistema de cultivo é mais caro, porque envolve formulação de substrato adequado, controle preciso das condições de crescimento e frutificação e, em grande parte, depende do genótipo da cepa empregada (CHEN; ARROLD; STAMETS, 2000; ROYSE; BAHLER, 1986; SABOTA, 1996).

### 2.2.1 Substrato de cultivo

*Lentinula edodes* é um fungo lignolítico, o qual produz uma série de enzimas hidrolíticas e oxidativas, como celulasas, hemicelulasas e ligninases envolvidas no processo de degradação dos principais componentes de materiais lignocelulósicos. A otimização da produção e a eficiência biológica dos cogumelos conduzem a uma mais efetiva degradação dos referidos polímeros e a uma maior valorização dos resíduos lignocelulósicos (PLATT et al., 1981). Por ser apto a utilizar lignina, celulose e hemicelulose como fonte de carbono e nutrientes, o shiitake pode ser cultivado em uma grande variedade de resíduos agrícolas (BUSWELL; CAI; CHANG, 1996; EIRA; MINHONI, 1996).

Royse (1985) sugere que, dentre resíduos agrícolas, o farelo de arroz acrescentado à serragem de madeira serve como fonte de nutrientes para um ótimo crescimento do *L. edodes*. Esses autores sugerem também que uma proporção de mistura de 10% a 40% desse suplemento estimularia o crescimento micelial. Por outro lado, Fasidi e Kadiri (1993), avaliando o crescimento micelial de *Lentinula submudus* sobre palha de *Andropogon tectorum* enriquecida com 10% a 50% de farelo de arroz, mostraram que a proporção de 30% desse suplemento promoveu maior desenvolvimento do fungo e a proporção de 50% estimulou maior densidade micelial. Esses autores atribuíram esse efeito estimulante do desenvolvimento micelial aos carboidratos, aminoácidos e minerais, presentes no farelo de arroz.

Rossi, Monteiro e Machado (2001), avaliando a velocidade de miceliação do substrato à base de bagaço de cana para o cultivo de shiitake, suplementado com farelo de arroz, obtiveram maior taxa de miceliação em menores concentrações de suplemento, ou seja, à medida que diminuía a relação C:N, a velocidade de miceliação também diminuía. A alta concentração de N limita a degradação da lignina.

### 2.2.2 Serragem

Boa parte dos resíduos sólidos da cadeia produtiva madeira e móveis é gerada no processamento da madeira serrada. Embora a fração percentual que representam os resíduos varie em função de fatores como processo, máquinas utilizadas e dimensões das toras, ocorre significativa perda no desdobro e nos cortes de serra que, para madeiras de reflorestamento, se situam entre 20% e 40% do volume das toras processadas (FINOTTI et al., 2006).

No Brasil, a geração de resíduos florestais tem mostrado valores expressivos, o que nos leva a considerar seriamente a sua utilização na cadeia produtiva. Com produção de 22,5 milhões de toneladas de madeira serrada e eficiência em torno de 50%, a indústria nacional gera nada menos que outros 22,5 milhões de toneladas de resíduos, os quais representam não apenas um problema econômico pelo desperdício, mas também um sério problema ambiental. Os fatores que inibem a plena utilização de resíduos florestais são o custo do transporte, a heterogeneidade, a sazonalidade e a falta de tecnologia e de investimento. A ineficiência deve-se à falta de dimensões entre a oferta e a demanda do produto, à defasagem tecnológica e à mão de obra pouco capacitada. Além da falta de eficiência, a indústria brasileira ainda não sabe o que fazer com seus resíduos. As indústrias madeireiras estão sendo forçadas a resolver o problema de resíduo que não poderá ser simplesmente queimado ou dispensado em locais inadequados. Em várias regiões, onde a exploração da madeira se apresenta como atividade de relevante valor econômico, observa-se um acúmulo significativo destes resíduos (SOUZA, 1997).

Os resíduos lignocelulósicos apresentam, em sua estrutura, principalmente celulose, hemicelulose e a lignina, que apresentam grande dificuldade em relação à degradação, dificultando, no caso do processamento da madeira, o processo de tratamento desses resíduos (SCRIBAN, 1985). Por esse

motivo, a procura por processos alternativos para reutilizar esses resíduos lignocelulósicos tem levado ao cultivo de cogumelos comestíveis, particularmente os da espécie que atacam a madeira, degradando a fração da lignina do complexo e deixando os resíduos biotransformados, sem problemas toxicológicos. Exemplos de fungos lignocelulósicos são os fungos *Volvariella* sp., *Lentinula Edodes* e *Pleurotus* sp. (NICOLINI et al., 1993).

### **2.2.3 Condições físicas para o cultivo de *Lentinula edodes***

A temperatura para o cultivo de *Lentinula edodes* é linhagem dependente, podendo variar de 10 °C a 30 °C. Linhagens de temperatura baixa devem ser cultivadas na faixa de 16 °C a 18 °C e linhagens de temperatura alta devem ser cultivadas entre 21 °C a 27 °C (ZERVAKI et al., 2001).

A umidade relativa até a formação dos primórdios deve ficar acima de 90%; quando a umidade relativa situa-se abaixo disso, ocorre o aborto de vários primórdios, comprometendo a produtividade final (CHANG; MILES, 2004; CHEN, 2001). Durante a frutificação, a umidade relativa deve ficar entre 60% e 80%. Caso fique muito acima desse intervalo, a qualidade dos cogumelos e sua durabilidade ficam comprometidas (CHANG; MILES, 2004; CHEN, 2001).

O pH do substrato para o cultivo de *Lentinula edodes* deve ficar entre 4,5 a 5,5, porém, algumas linhagens apresentam tolerância ao pH mais alcalino (CHANG; MILES, 2004; CHEN, 2001).

Para a indução da frutificação é necessário imergir os blocos de *L. edodes* em água à temperatura de 12 °C a 15 °C, por um período de 8 a 10 horas, porém, algumas linhagens não necessitam de imersão para indução do primeiro fluxo (CHANG; MILES, 2004; PHILIPPOUSSIS; DIAMANTOPOULOU; ZERVAKIS, 2003).

## 2.4 Contaminantes presentes no cultivo de shiitake

A produção de shiitake, tanto no sistema de cultivo em toras como em substratos sintéticos, tem sido prejudicada pela competição com outros fungos, entre eles várias espécies do gênero *Trichoderma*, que têm causado sérios problemas à produção (BADHAM, 1991).

Os principais fungos competidores presentes no substrato para cultivo de *Lentinula edodes* são *Trichoderma* spp. e *Penicillium* spp. Uma vez que esses fungos se instalam, o substrato pode ser descartado porque, dificilmente, o micélio do shiitake consegue competir, em função da elevada agressividade desses contaminantes, a menos que a contaminação ocorra num momento em que o bloco já esteja bem colonizado pelo cogumelo (LAIXUTHAI et al., 1987).

Terashima, Igusa e Ohga (2002), estudando o efeito dos contaminantes *Penicillium brevicompactum* e *Trichoderma harzianum*, durante a colonização do substrato de cultivo e a formação dos corpos de frutificação, demonstrou que algumas linhagens de *Lentinula edodes* interromperam seu crescimento quando entraram em contato com os contaminantes, enquanto as linhagens que continuaram a crescer colonizaram o substrato, mas produziram corpos de frutificação irregulares.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de realização do experimento

Parte do experimento foi conduzida no Laboratório de Cogumelos Comestíveis na Universidade Federal de Lavras (UFLA), durante o período de janeiro a dezembro de 2011 e na Fazenda Champ Gourmet, localizada a 6 km de Bemposta, RJ (coordenadas: latitude: -22.139722, longitude: -43.098056).

#### 2.2 Produção do inoculante

Foram utilizadas cinco linhagens, Le<sub>1</sub>, Le<sub>2</sub>, Le<sub>3</sub>, Le<sub>4</sub> e Le<sub>6</sub>, de *L. edodes*, todas pertencentes à micoteca do Laboratório de Cogumelos Comestíveis.

As culturas foram reativadas e mantidas em meio de cultura BDA (200 g batata, 20 g dextrose, 20 g ágar e 1 L de água destilada), incubadas em câmara BOD, a 25 °C, sendo estas culturas consideradas como matriz primária para o preparo do inoculante de *L. edodes*.

A matriz secundária (*spawn*) foi preparada em substrato à base de serragem, suplementado com 10% de farelo de trigo, 2% de gesso agrícola e 2% de calcário calcítico, tendo como base o peso total da mistura dos ingredientes principais (serragem e farelo de trigo). Os ingredientes foram misturados e tiveram a umidade ajustada para 60%; depois, foram acondicionados em frascos de vidro, com capacidade para 400 g. Para a proteção dos frascos, foram utilizadas tampas furadas e vedadas com fita cirúrgica microporosa com 2,5 cm de largura, da marca Missnermicropore, para permitir trocas gasosas. Os frascos foram autoclavados, por 2 horas, a 121 °C. Depois de 24 horas, foram inoculados com 4 discos de 5 mm de diâmetro das colônias que cresceram em

BDA. Os frascos foram incubados à temperatura de 24 °C a 28 °C, por 3 semanas (PHILIPPOUSSIS; DIAMANTOPOULOU; ZERVAKIS, 2002).

### **2.3 Preparo e inoculação do substrato**

Os ingredientes para a montagem dos substratos foram pesados e misturados de acordo com seus respectivos tratamentos e tiveram sua umidade ajustada para 60%. Os substratos foram acondicionados em sacolas de polipropileno de alta densidade, com filtro de 4 cm<sup>2</sup>, sendo 2,5 kg de substrato por sacola. Após o acondicionamento dos substratos nas sacolas, os mesmos foram prensados em uma forma com 20 cm de comprimentos por 13 cm de largura, selados e autoclavados, por 2 horas, a 121 °C. Depois de 24 horas, tempo necessário para o resfriamento dos blocos à temperatura ambiente, foi realizada a inoculação dos substratos em condições assépticas, com 75 g do *Spawn*, referentes às cinco linhagens de *L. edodes* estudadas.

### **2.4 Indução da frutificação e colheita de *L. edodes***

Após o período de 2 meses, os substratos inoculados com as linhagens de *L. edodes* passaram por um processo de desprendimento, entre a parede do bloco e a parte interna do saco de cultivo, criando bolsões de ar. Decorridos trinta dias do desprendimento, os blocos foram removidos de dentro dos sacos e levados para a casa de cultivo, com temperatura e umidade controlada. Foi realizado o mesmo procedimento na Fazenda Champ Gourmet, porém, a temperatura foi variável de acordo com o ambiente. A colheita foi realizada durante trinta dias e, após esse período, a temperatura foi elevada para 25 °C, por dez dias. Para iniciar o segundo ciclo de cultivo, foi dado um choque térmico nos blocos, imergindo-os em água à temperatura de 14 °C, por 8 horas e, depois

disso, a temperatura da sala de cultivo foi reduzida para 18 °C, durante o período de colheita.

## 2.5 Cultivo de *L. edodes* em dois ambientes

Foram montadas, na Fazenda Champ Gourmet, três formulações de substrato (Tabela 1) e inoculados com as cinco linhagens de *L. edodes*. Nesse ambiente não houve controle da temperatura de cultivo. Os mesmos tratamentos foram montados no Laboratório de Cogumelos Comestíveis, porém, a temperatura de cultivo foi controlada. Nas condições não controladas, a temperatura de cultivo foi de 22±3 °C, durante o dia e 14±2 °C, no período noturno, enquanto, em condições controladas, a temperatura foi de 16±2 °C. Porém, em ambos os locais de cultivo, a umidade relativa do ambiente foi mantida acima de 80%, durante o período de frutificação. O delineamento foi em blocos casualizados e as médias foram comparadas estatisticamente pelo software SISVAR (FERREIRA, 2000), por meio do teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Tabela 1 Substrato para o teste de temperatura (serragem – SE, farelo de trigo – FT, farelo de algodão – FA, fubá grosso – FG, farelo de arroz – FAR)

Formulação	Matéria-						Teor de nitrogênio	pH
	prima (%)	Suplementos (%)						
		SE	FT	FA	FG	FAR		
1	80	20	0	0	0	0	0,96	7
2	90	1	1	1	6,8	0,2	1,06	6,7
3	80	2	2	2	13,6	0,4	1,18	6,8

## 2.6 Tratamento da serragem para o cultivo de shiitake

Foram acondicionados, em uma caixa d'água com volume de 400 litros, 200 kg de serragem, que foram lavados quatro vezes ao dia, durante trinta dias. Cada lavagem durou 1 hora, período em que começava a sair água no cano ao fundo da caixa d'água. Após o período de lavagem, a serragem foi utilizada para montar dois substratos, equivalentes às formulações 2 e 3, conforme a Tabela 1. Paralelamente, foram montados dois substratos com a mesma formulação, porém, utilizando serragem não tratada. A montagem dos substratos foi realizada conforme a metodologia descrita no item 2.2. Após a esterilização dos substratos, eles foram inoculados com as cinco linhagens de *L. edodes*.

## 2.7 Isolamento e identificação dos contaminantes presentes nos blocos de cultivo

Durante a colonização do substrato, foram coletadas amostras dos blocos que apresentaram regiões com coloração esverdeada. As amostras foram levadas para placas de Petri contendo o meio de cultura BDA. A partir das culturas puras, as espécies foram cultivadas em meios específicos e, para cada gênero, foram utilizados manuais de identificação padronizados. Os isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* foram cultivados no meio de cultura *czapek yeast agar*, ou CYA (1 g  $K_2HPO_4$ ; 10 mL concentrado de Czapek; 5 g extrato de levedura; 15 g ágar; 1 L água destilada; para o concentrado de Czapek utilizaram-se 30 g  $NaNO_3$ ; 5 g  $KCl$ ; 5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,1 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,1 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,05 g  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  e 100 mL água destilada) e no meio de cultura MEA (20 g extrato de malte; 1 g peptona; 30 g glicose; 20 g ágar; 1 L água destilada), a 25 °C e a 37 °C e, após 7 dias de incubação, foram observadas as características macroscópicas e microscópicas.

Os isolados de *Aspergillus* foram identificados conforme Klich (2002) e as espécies de *Penicillium*, de acordo com Pitt (2000), sendo essas identificações amparadas por Pitt e Hocking (1997) e Samson, Hoekstra e Frisvad (2000). Os isolados pertencentes aos gêneros *Trichoderma* e *Cladosporium* foram cultivados em extrato de malte (MEA), a 25 °C, por 7 dias e a identificação dos isolados foi realizada conforme Samson, Hoekstra e Frisvad (2000).

## **2.8 Antagonismo entre as linhagens de *L. edodes* e os contaminantes presentes nos blocos de cultivo**

Dois isolados fúngicos obtidos dos blocos contaminados foram escolhidos para o teste de antagonismo com as linhagens de *L. edodes*.

Foi inoculado 1 disco de 5 mm de diâmetro das cinco linhagens de *L. edodes* em um dos cantos da placa de Petri contendo o meio de cultura BDA, e um disco do contaminante foi inoculado no lado oposto da placa, cinco dias após a inoculação das linhagens de *L. edodes*. Foram montadas todas as combinações possíveis entre as linhagens de *L. edodes* com os contaminantes. As placas foram armazenadas em BOD, a 25 °C. A cada 48 horas, foi realizada a leitura da distância percorrida pelo micélio dos fungos, com uma régua de 10 cm graduada a 1 mm (LEE et al., 2008).

## **2.9 Efeito do pH no crescimento das linhagens de *L. edodes* e dos contaminantes**

Foram montados quatro substratos à base de serragem (86%), farelo de trigo (10%), gesso agrícola (2%), carbonato de cálcio (2%) e cal hidratado em diferentes concentrações (0%, 0,1%, 0,2%, 0,5% e 1,0%). Os pH de cada substrato foram de 6,6; 7; 7,2; 7,5 e 8, respectivamente. A umidade do substrato

foi ajustada para 60%. Trinta gramas dos substratos foram distribuídos em tubos de ensaio com capacidade para 20 ml, os quais foram vedados com tampão de algodão e autoclavados, por 2 horas, a 121 °C. Após o resfriamento, eles foram inoculados com um disco de 4 mm de diâmetro das linhagens de *L. edodes* e dos contaminantes *T. harzianun* e *Paecilomyces* sp. Foram montadas 6 repetições para cada tratamento. A velocidade do crescimento micelial foi avaliada a cada 48 horas, com o auxílio de uma régua de 10 cm graduada a 1 mm. O delineamento foi inteiramente casualizado e as médias foram comparadas, por meio de teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Eficiência biológica em função da temperatura e do substrato

Os resultados de eficiência biológica das diferentes linhagens de *Lentinula edodes* em função do substrato e do ambiente estão demonstrados na tabela 2. O substrato suplementado apenas com farelo de trigo apresentou os piores valores de eficiência biológica, para todas as linhagens utilizadas, nos dois ambientes testados (controlado e não controlado). Como era de se esperar, o tratamento com maiores concentrações de farelos apresentou maior eficiência biológica. Entretanto, observou-se que a linhagem Le<sub>2</sub> apresentou resposta apenas do substrato 1 para o 2, não se observando diferenças entre 2 e 3, nos dois ambientes testados. Os dois substratos apresentaram os mesmos ingredientes, mas, para a formulação 3, foi utilizada menor proporção de serragem (80%) e o dobro dos demais ingredientes em relação à formulação 2. Esses resultados demonstram que a resposta a substratos mais ricos pode ser dependente da linhagem utilizada.

Para o substrato mais pobre (formulação 1), o ambiente controlado proporcionou maior eficiência biológica para todas as linhagens. Entretanto, para os substratos mais ricos, a resposta ao ambiente foi linhagem dependente. Para a linhagem Le<sub>1</sub> não houve diferença de eficiência biológica entre os dois ambientes, quando foi utilizado o substrato mais rico (formulação 3). Outro resultado interessante foi que, enquanto, para a maioria das linhagens, substratos mais ricos resultaram em maior eficiência biológica no ambiente controlado, para a linhagem Le<sub>4</sub>, os substratos mais ricos (formulações 2 e 3) apresentaram menor eficiência biológica no ambiente controlado (Tabela 2). Esses resultados demonstram que, para o ambiente não controlado, essa linhagem apresenta

desempenho semelhante ao da linhagem mais produtiva em ambiente controlado, que foi a Le<sub>6</sub>.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, pode-se concluir que, para o ambiente controlado, as linhagens Le<sub>1</sub>, Le<sub>2</sub> e Le<sub>6</sub> são as mais indicadas, enquanto, para o ambiente não controlado, a linhagem Le<sub>4</sub> é a melhor.

Houve diferença significativa entre os tratamentos em função do ambiente de cultivo; a eficiência biológica (EB) foi melhor no ambiente com condições controladas, exceto a linhagem 4, que teve maior EB no substrato 3, sob condições variáveis de temperatura. Essa linhagem pode ter uma resposta favorável à maior variação de temperatura no ambiente não controlado, quando cultivada em substrato mais rico. Zervakis (2001) mostrou que *L. edodes* pode crescer em diferentes temperaturas porque essa é uma espécie linhagem dependente e cada linhagem apresenta uma temperatura ótima de crescimento. Bruhn e Mihail (2009) mostraram que o ambiente com temperatura controlada apresenta maior EB e mais uniformidade na formação dos basidiocarpos de shiitake.

Tabela 2 Eficiência biológica referente aos ensaios montados em condição controlada de temperatura (C1, C2 e C3) e sem controle de temperatura (S1, S2 e S3)

Substratos	Linhagens				
	Le <sub>1</sub>	Le <sub>2</sub>	Le <sub>3</sub>	Le <sub>4</sub>	Le <sub>6</sub>
C1	44,46 E c	53,7 B b	48,21 C c	52,11 D b	67,91 C a
C2	70,64 B b	79,17 A a	63,99 B c	66,75 C c	77,42 B a
C3	78,06 A a	79,55 A a	75,81 A b	74,19 B b	82,3 A a
S1	31,34 F d	45,37 C b	39,35 D c	45,5 E b	61,59 D a
S2	49,46 D c	56,69 B b	60,12 B b	73,8 B a	69,3 C a
S3	75,36 A b	54,79 B d	62,01 B c	83,14 A a	76,05 B b



Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV = 7,33

### **3.2 Eficiência Biológica em relação ao tratamento da serragem**

Considerando que a eficiência biológica foi calculada com base apenas nos blocos que produziram cogumelos, não houve diferença significativa entre os tratamentos com serragem tratada e não tratada, para nenhuma das linhagens utilizadas (Tabela 3). De modo geral, foram obtidos resultados de eficiência biológica semelhantes àqueles demonstrados na tabela 2, confirmando, portanto, os resultados de produção para cada linhagem.

Portanto, o principal efeito observado do tratamento de lavagem da serragem antes do preparo do substrato foi a redução dos índices de contaminação no substrato preparado com serragem lavada (Tabela 4). Empresas que usam a prática de lavar a serragem, alegam que o processo permite a eliminação de resinas e outras substâncias tóxicas que inibem o crescimento do fungo. Entretanto, para as condições do presente estudo, esse efeito não foi observado, o que era de certa forma esperado pelo menos quando se utiliza apenas serragem de eucalipto, porque se o fungo consegue colonizar a madeira desta espécie, não seria de se esperar problemas de toxidez na serragem da mesma madeira.

Outra informação importante obtida neste experimento foi a observação de que o índice de contaminação não foi maior no substrato mais ricos em farelos, uma vez que esta tem sido uma das preocupações por parte dos produtores. Mas é importante ressaltar que mesmo os menores índices de contaminação encontrados neste estudo ainda são muito elevados para uma produção comercial, sendo extremamente importante alcançar índices menores para a viabilidade econômica do negócio.

Tabela 3 Eficiência biológica de *L. edodes* em substrato à base de serragem tratada (T2 e T3) e serragem não tratada (N2 e N3)

Formulação	Linhagens				
	Le <sub>1</sub>	Le <sub>2</sub>	Le <sub>3</sub>	Le <sub>4</sub>	Le <sub>6</sub>
T2	72,15 B b	74,81 B b	64,14 B c	66,45 B c	78,29 B a
T3	75,2 A b	80,24 A a	75,86 A b	72,74 A c	82,11 A a
N2	73,12 B a	73,42 B a	63,63 B c	68,93 B b	76,78 B a
N3	75,3 A b	80,41 A a	75,56 A b	74,94 A b	82,23 A a

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, Cv = 3,5

Tabela 4 Porcentagem de contaminação referente à perda de blocos de cultivo para serragem tratada (T2 e T3) e serragem não tratada (N2 e N3).

Tratamento	Linhagem				
	Le <sub>1</sub>	Le <sub>2</sub>	Le <sub>3</sub>	Le <sub>4</sub>	Le <sub>6</sub>
T2	16,7	25	25	16,7	25
T3	16,7	25	25	16,7	25
N2	25	33,33	33,33	33,33	33,33
N3	33,33	25	33,33	33,33	25

### 3.3 Resistência aos contaminantes

No teste de antagonismo, o contaminante *T. harzianun* apresentou a maior velocidade de crescimento micelial (0,96 cm/dia), sendo o dobro da velocidade de crescimento micelial da linhagem Le<sub>4</sub> (0,48 cm/dia), que foi a mais rápida entre todas as linhagens de *L. edodes* (Tabela 5). As linhagens Le<sub>1</sub>, Le<sub>2</sub> e Le<sub>3</sub> tiveram velocidade de crescimento micelial semelhante, sendo de 0,44; 0,42 e 0,43 cm/dia, respectivamente. A linhagem Le<sub>6</sub> apresentou menor velocidade de crescimento micelial (0,37 cm/dia), a qual foi semelhante à

velocidade do *Paecilomyces* sp. (0,39 cm/dia). Todas as linhagens de *L. edodes* cresceram na presença de seu antagonista, *Paecilomyces* sp. Mesmo quando o micélio de *L. edodes* entrou em contato com o micélio do antagonista, continuou seu crescimento sobre o micélio do *Paecilomyces* sp. Já o *Paecilomyces* sp., ao entrar em contato com as linhagens de *L. edodes*, teve seu crescimento interrompido, demonstrando que este fungo não chega a ser um grande problema para o cultivo de shiitake. Por outro lado, *T. harzianun* apresentou velocidade de crescimento micelial superior à velocidade das linhagens testadas e causou um efeito inibitório, interrompendo o crescimento de *L. edodes* ao entrar em contato com seu micélio. Portanto, esta espécie demonstrou ser a mais agressiva e deverá ser objeto de maior preocupação e maiores esforços de pesquisa para o seu controle nos cultivos de shiitake.

Lee (2008) estudou a resistência de onze linhagens de *L. edodes* e observou que duas delas mostraram-se resistentes ao *T. harzianun*. Segundo o autor, provavelmente, a atividade antifúngica exercida por algumas linhagens de *L. edodes* se deve à produção de algumas enzimas e antioxidantes, a qual seria estimulada na presença de fungos competidores. O entendimento dessa interação pode ser uma solução para o controle da contaminação presente nos blocos de cultivo (SAVOIE; MATA, 2003).

Tabela 5 Velocidade de crescimento micelial (Vc = cm/dia) das linhagens de *L. edodes* e dos contaminantes, no teste de antagonismo

	Le <sub>1</sub>	Le <sub>2</sub>	Le <sub>3</sub>	Le <sub>4</sub>	Le <sub>6</sub>	<i>T.</i> <i>harzianun</i>	<i>Pecilomyces</i> sp.
Vc	0,44 c	0,42 c	0,44 c	0,48 b	0,38 d	0,96 a	0,39 d

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV = 3,86

### 3.4 Efeito do pH no crescimento dos microrganismos estudados

A velocidade de crescimento micelial das cinco linhagens de *L. edodes* e dos contaminantes *T. harzianun* e *Paecilomyces* sp., em diferentes valores de pH, está expressa na Tabela 6. Observou-se que a velocidade de crescimento micelial foi inversamente proporcional ao valor do pH. Apesar disso, mesmo nos maiores valores de pH, observou-se que todas as linhagens de *L. edodes* bem como as culturas de *Trichoderma* e *Paecilomyces* apresentaram crescimento micelial, ou seja, não houve inibição total de crescimento nos valores de pH testados.

Além disso, a redução da velocidade de crescimento ocorreu na mesma proporção entre as linhagens de *L. edodes* e *T. harzianun*, de modo que a elevação do pH no substrato de cultivo não permitiu nenhum controle do contaminante. Andrade e Graciolli (2005) mostraram que a cal hidratada pode interferir na qualidade do cogumelo, diminuindo o tamanho do píleo. Isso ocorre porque a elevação do pH pode interferir na fixação de fósforo realizada pelo micélio do fungo. Portanto, uma elevação maior do pH, mesmo se permitisse um certo controle dos contaminantes, poderia trazer um efeito adverso sobre a qualidade dos cogumelos produzidos.

Tabela 6 Velocidade de crescimento micelial das linhagens de *L. edodes* e dos contaminantes *T. harzianun* e *Paecilomyces* sp., em substrato com diferentes valores de pH

pH	Linhagem						
	Le <sub>1</sub>	Le <sub>2</sub>	Le <sub>3</sub>	Le <sub>4</sub>	Le <sub>6</sub>	<i>T. harzianun</i>	<i>Paecilomyces</i> sp.
6,6	0,17 A d	0,2 A c	0,168 A d	0,22 A b	0,21 A b	0,45 A a	0,10 A e
7,0	0,15 B e	0,19 A c	0,16 B d	0,20 B b	0,19 B c	0,41 B a	0,068 B f
7,2	0,15 B d	0,18 C b	0,16 B c	0,18 C b	0,18 C b	0,38 C a	0,066 B e
7,5	0,15 B c	0,16 D b	0,15 C c	0,16 D b	0,16 D b	0,37 D a	0,06 C d
8,0	0,14 C b	0,12 E c	0,14 D b	0,14 E b	0,14 E b	0,33 E a	0,04 D d

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV = 2,36

#### 4 CONCLUSÕES

- a) A linhagem  $Le_6$  de *L. edodes* é a linhagem mais adequada para o cultivo de shiitake em ambiente controlado.
- b) A linhagem  $Le_4$  é a mais indicada para o cultivo de shiitake em ambiente não controlado.
- c) A lavagem da serragem antes do preparo do substrato de cultivo do shiitake é importante, por diminuir a perda de blocos por contaminação, reduzindo, portanto, os custos de produção.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. C. N.; GRACIOLLI, L. A. Controle de fungos contaminantes no cultivo do cogumelo comestível shiitake em toros de eucalipto. **Scientia Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 293-299, 2005.
- BADHAM, E. R. Growth and competition between *Lentinus edodes* and *Trichoderma harzianum* on sawdust substrates. **Mycologia**, New York, v. 83, n. 4, p. 455-463, Mar. 1991.
- BONONI, V. L. R. et al. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Cone, 1995. 104 p.
- BRUHN, J. N.; MIHAIL, J. D. Forest farming of shiitake mushrooms: aspects of forced fruiting. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 3, p. 5973-5978, Apr. 2009.
- BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T. Ligninolytic enzyme production and secretion in edible mushroom fungi. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MUSHROOM BIOLOGY AND MUSHROOM PRODUCTS, 2., 1996, University Park. **Proceedings...** University Park: Pennsylvania State University, 1996. p. 113-122.
- CAMPBELL, A. C.; SLEE, R. W. Commercial cultivation of shiitake in Taiwan and Japan. **Mushroom Journal Tropical**, Hong Kong, v. 7, n. 1, p. 127-134, 1987.
- CHANG, S. T.; KWAN, H. S.; KANG, Y. N. Collection, characterization, and utilization of germ plasm of *Lentinula edodes*. **Canadian Journal Botanical**, Ottawa, v. 73, n. 1, p. 955-965, Feb. 1996.
- CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms**: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. Boca Raton: CRC, 2004. 451 p.
- CHEN, A. W. What is shiitake? In: GUSH, R. (Ed.). **Shiitake cultivation**. Seoul: Mush Word, 2005. p. 3-32.
- CHEN, A. W.; ARROLD, N.; STAMETS, P. Shiitake cultivation systems. **Mushroom Science**, New York, v. 15, n. 32, p. 771-778, July 2000.

EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. **Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1996. 96 p.

FASIDI, I. O.; KADIRI, M. Use of agricultural wastes for the cultivation of *Lentinus subnudus* (Polyporales: Polyporaceae) in Nigeria. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 41, n. 3, p. 411-415, 1993.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANNUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRI, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FINOTTI, A. R. et al. Uso energético de resíduos de madeira na cadeia produtiva de madeira/móveis e possibilidades de geração de créditos de carbono. In: SCHNEIDER, V. E.; NEHME, M. C.; BEN, F. (Org.). **Pólo moveleiro da serra gaúcha: sistemas de gerenciamento ambiental na indústria moveleira**. Porto Alegre: EDUCS, 2006. p. 191-230.

HERNÁNDEZ, R. G. et al. Quantitative changes in the biochemical composition of lignocellulosic residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 52, n. 1, p. 30-40, Jan./Feb. 2011.

HIROMOTO, B. T. Comparative analysis of shiitake culture systems. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 13., 1991, Dublin. **Abstracts...** Dublin: Balkema, 1991. v. 2, p. 489-496.

KALBERER, P. P. Influence of urea and ammonium chloride on crop yield and fruit body size of shiitake (*Lentinula edodes*). **Mushroom Science**, New York, v. 15, n. 32, p. 361-366, July 2000.

KIRCHHOFF, B.; LELLEY, J. Investigations of Shiitake (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.) bag-log cultivation to increase the yield in Germany. **Mushroom Science**, New York, v. 13, n. 28, p. 509-516, Feb. 1991.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002. 116 p.

LAIXUTHAI, N.; GAEWGLA, M.; TRIRATANA, S. Study on contaminative fungi in shiitake substrate bags. In: ANNUAL CONFERENCE OF



KASETSART, 25., 1987, Bangkok. **Proceedings...** Bangkok: Kasetsart, 1987. p. 520-527.

LEE, H. M. et al. Breeding and screening of *Lentinula edodes* strains resistant to *Trichoderma* spp. **The Korean Society of Mycology**, Seoul, v. 36, n. 4, p. 270-273, Aug. 2008.

LEVANON, D. et al. Bulk treatment of substrate for the cultivation of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) on straw. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 63-64, Apr. 1993.

LÓPEZ, C. J.; VALENCIA, N. R.; CHANG, S. T. Cultivation of shiitake on coffee waste. **Mushroom Science**, New York, v. 16, n. 34, p. 307-311, Aug. 2004.

NEVES, C. F. D. Q.; GRACIOLLI, L. A. Caracterização da produção em toros do cogumelo comestível em *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler na região oeste do Estado de São Paulo. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 4, p. 487-494, 2008.

NICOLINI, L. et al. Changes in in-vitro digestibility of orange peels and distillery grape stalks after solid-state fermentation by higher fungi. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 17-20, Apr. 1993.

PAULA, D. P. et al. Viabilidade econômica do cultivo de Shiitake em diferentes escalas de produção. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 431-436, 2001.

PHILIPPOUSSIS, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; ZERVAKIS, G. Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinus edodes*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 26, p. 551-557, Mar. 2003.

\_\_\_\_\_. Monitoring of mycelial growth and fructification of *Lentinula edodes* on several lignocellulosic residues. In: SANCHEZ, J. E.; HUERTS, G.; MONTIEL, E. (Ed.). **Mushroom biology and mushroom products**. Ciudad del Mexico: Universidad Autonoma del Estado de Morelos, 2002. p. 279-287.

PIRE, D. G.; WRIGHT, J. E.; ALBERTO, E. Cultivation of shiitake using sawdust from widely available local woods in Argentina. **Micologia Aplicada International**, Berkeley, v. 13, n. 2, p. 87-91, Apr. 2001.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 17-22, 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.

PLATT, M. W. et al. Lignocelluloses degradation of during growth of the *Pleurotus* logy. **Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 13, n. 2, p. 194-201, 1981.

PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J. **Shiitake growers handbook: the art and science of mushroom cultivation**. Dubuque: Kendall, 1988. 217 p.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M. N.; BANO, Z. Biopotentialities of the asidiomacromycetes. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 37, n. 54, p. 233-361, Jan. 1992.

ROSSI, I. H.; MONTEIRO, C. A.; MACHADO, O. J. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 887-891, June 2001.

ROYSE, D. J. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitke mushroom. **Mycologia**, New York, v. 77, n. 87, p. 756-762, Feb. 1985.

\_\_\_\_\_. Specialty mushrooms. **Mushroom News**, Washington, v. 43, n. 1, p. 4-19, 1995.

ROYSE, D. J.; BAHLER, C. C. Effects of genotype, spawn run time and substrate formulation on biological efficiency of shiitake. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, n. 67, p. 1425-1427, Aug. 1986.

SABOTA, C. Strain of shiitake mushroom [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] and wood species affect the yield of shiitake mushrooms. **HortScience**, Alexandria, v. 6, n. 17, p. 388-392, Jan. 1996.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food and airborne fungi**. 7<sup>th</sup> ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 389 p.

SANTOS, F. A. P. **O bagaço de cana-de-açúcar tratado sob pressão de vapor como alternativa para a alimentação de bovinos na entressafra das pastagens**. Campinas: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1990. 203 p.

SAVOIE, J. M.; MATA, G. *Trichoderma harzianum* metabolites pré-adapt mushrooms to *Trichoderma aggressive* antagonism. **Mycology**, New York, v. 95, n. 2, p. 191-199, Apr. 2003.

SCRIBAN, R. **Biotecnologia de la fermentacion**. São Paulo: Manole, 1985. 238 p.

SOUZA, M. R. Tecnologias para usos alternativos de resíduos florestais: experiência do laboratório de produtos florestais, IBAMA na área de utilização de resíduos florestais e agrícolas. In: WORKSHOP SUL-AMERICANO SOBRE USOS ALTERNATIVOS DE RESÍDUOS DE ORIGEM FLORESTAL E URBANA, 1., 1997, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA, 1997. p. 182.

TAN, Y. H.; MOORE, D. Convenient and effective methods for in vitro cultivation of mycelium and fruiting bodies of *Lentinus edodes*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 87, p. 1077-1084, June 1992.

TERASHIMA, Y.; IGUSA, H.; OHGA, S. Influence of contamination by *Penicillium brevicompactum* and *Trichoderma harzianum* during *Lentinula edodes* spawn run on fruiting in sawdust-based substrates. **Journal Mycoscience**, Tokyo, v. 43, n. 54, p. 277-280, Feb. 2002.

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

ZERVAKIS, G. et al. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 46, n. 62, p. 231-234, Mar. 2001.