

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

**EFEITO DE LINHAGENS E SUBSTRATOS NO CRESCIMENTO
MICELIANO E PRODUTIVIDADE EM CULTIVO AXÊNICO DO
COGUMELO SHIITAKE (*Lentinula edodes* (BERK.) PEGLER).**

RENATO MAMEDE DE CASTRO MONTINI

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia - Área de Concentração em
Energia na Agricultura

BOTUCATU-SP
Setembro – 2001

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

**EFEITO DE LINHAGENS E SUBSTRATOS NO CRESCIMENTO
MICELIANO E PRODUTIVIDADE EM CULTIVO AXÊNICO DO
COGUMELO SHIITAKE (*Lentinula edodes* (BERK.) PEGLER).**

RENATO MAMEDE DE CASTRO MONTINI

Orientador: Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia - Área de Concentração em
Energia na Agricultura

BOTUCATU-SP
Setembro - 2001

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira pelos ensinamentos, apoio, paciência e orientação segura.

À Prof^a. Dra. Marli Teixeira de Almeida Minhoni pelo apoio, compreensão e conselhos providenciais.

Ao Prof. Dr. Nelson Barros Colauto pelo apoio, colaboração e incentivo.

Ao Prof. Dr. José Raimundo de Souza Passos pela paciência, colaboração e cuidadoso amparo estatístico

À Dra. Vera Lúcia Ramos Bononi pelo apoio e incentivo durante a execução do trabalho.

Ao Prof. Dr. Ademércio Antônio Paccola pelos conselhos e atenção.

Aos funcionários do Módulo de Cogumelos Ivando Roberto Fogaça, José Antonio Fogaça, Janderson Cleyton Paes e Márcio de Jesus Fogaça pelo auxílio nos experimentos de campo.

Aos amigos sempre presentes e a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas e a Coordenação do Curso de Pós-graduação em Energia na Agricultura, pelo apoio logístico e auxílio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro através do Projeto Temático (Proc. 98/07726-5).

Aos meus padrinhos Paschoal e Lourdes pela confiança, amizade e principalmente carinho.

E, principalmente, aos meus pais José e Estela, ao meu irmão Leandro e minha namorada Luciane pelo incentivo constante, paciência, auxílio e apoio espiritual.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	4
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
4.1. VALOR MEDICINAL.....	7
4.2. CRESCIMENTO MICELIANO.....	8
4.3. APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS OU AGROINDUSTRIAIS.....	9
4.4. CULTIVO DO <i>L. EDODES</i> EM SUBSTRATO.....	10
4.4.1. Obtenção da matriz primária e produção da "semente" ou "spawn".....	10
4.4.2. Substratos de cultivo.....	11
4.4.3. Inoculação do substrato.....	14
4.4.4. Colonização do Substrato.....	15
4.4.4.1. "Corrida do micélio".....	15
4.4.4.2. Estabilidade ou maturação do micélio.....	16
4.4.5. Indução de primórdios e frutificação.....	17
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
5.1. LINHAGENS.....	22
5.2. MEIOS DE CULTURA.....	23
5.2.1. Meio de cultura SDA-20 (serragem-dextrose-ágar).....	23
5.2.2. Meio de cultura SDA-40	24
5.2.3. Meio de cultura SBDA-20 (serragem-bagaço-dextrose-ágar).....	24
5.2.4. Meio de cultura SBDA-40.....	24
5.2.5. Composição química dos meios de cultura.....	24
5.3. SUBSTRATOS.....	25
5.3.1. Composição química dos substratos	26

5.4.	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO MICELIANO EM MEIO DE CULTURA.....	26
5.4.1.	Monitoramento do crescimento micelial	27
5.4.1.1.	Determinação da área de crescimento micelial.....	28
5.4.1.2.	Análise de vigor (<i>mean gray level</i>)	29
5.4.2.	Metodologia estatística	29
5.5.	PREPARO E PRODUÇÃO DO <i>L.EDODES</i> EM CULTIVO AXÊNICO.....	29
5.5.1.	Adaptação do micélio.....	30
5.5.2.	Preparo dos substratos de cultivo	31
5.5.2.1.	Preenchimento dos sacos	31
5.5.3.	Inoculação	32
5.5.4.	Incubação	32
5.5.4.1.	Fase de "corrida de micélio".....	32
5.5.4.2.	Fase de maturação do micélio	33
5.5.5.	Indução de primórdios e frutificação	33
5.5.6.	Colheita e avaliações.....	34
5.5.7.	Metodologia estatística	34
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6.1.	DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIANO DO <i>L. EDODES</i> EM MEIO DE CULTURA.....	35
6.1.1.	Modelo de crescimento miceliano	35
6.1.2.	Cinética de crescimento miceliano em meio de cultura	36
6.2.	ESTUDO DO VIGOR DO <i>L. EDODES</i> EM MEIO DE CULTURA.....	51
6.3.	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BASIDIOCARPOS DE <i>L.EDODES</i> EM CULTIVO AXÊNICO.....	57
6.3.1.	Massa Fresca de Cogumelos (MFC) em função das linhagens e substratos	59
6.3.2.	Eficiência Biológica (EB) em função das linhagens e substratos.....	62
6.3.3.	Massa Fresca Média por Cogumelo (MFMC) em função das linhagens e substratos.....	66
6.3.4.	Número de Cogumelos (NC) em função das linhagens e substratos	69
6.3.5.	Massa Seca (MS) em função das linhagens e substratos.....	71
7.	CONCLUSÕES	73
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
1 Dados de origem e a data de isolamento de cada linhagem de <i>L. edodes</i>	23
2 Composição química do extrato aquoso dos meios de cultura, após fervura (durante 15 minutos) e filtrado em algodão.....	25
3 Proporção da mistura de ingredientes utilizada em cada formulação de substrato, em base seca.....	26
4 Composição química dos substratos de cultivo axênico, após a homogenização, adição de água e esterilização (121°C por 4 horas).....	26
5 Teor de umidade dos ingredientes dos substratos, por secagem sob radiação infravermelha (110°C).....	30
6 Teor de umidade dos ingredientes dos substratos, por secagem sob radiação infravermelha (110°C).....	31
7 Comparações estatísticas entre o parâmetro alfa do modelo de regressão não linear, referente à cinética de crescimento miceliano do <i>L.edodes</i> , segundo meio de cultura e linhagem. (pelo teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).....	37
8 Comparações estatísticas entre o parâmetro beta do modelo de regressão não linear, referente à cinética de crescimento miceliano do <i>L.edodes</i> , segundo meio de cultura e linhagem. (pelo teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).....	37
9 Comparações estatísticas entre o parâmetro gama do modelo de regressão não linear, referente à cinética de crescimento miceliano do <i>L.edodes</i> , segundo meio de cultura e linhagem. (pelo teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).....	38
10 Comparações estatísticas entre o parâmetro alfa do modelo de regressão não linear, referente à cinética de crescimento miceliano do <i>L.edodes</i> , segundo linhagem e meio de cultura. (pelo teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).....	43

11	Comparações estatísticas entre o parâmetro beta do modelo de regressão não linear*, referente à cinética de crescimento miceliano do <i>L.edodes</i> , segundo linhagem e meio de cultura. (pelo teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).....	43
12	Comparações estatísticas entre o parâmetro gama do modelo de regressão não linear*, referente à cinética de crescimento miceliano do <i>L.edodes</i> , segundo linhagem e meio de cultura. (pelo teste não paramétrico de Student-Newman-Kills).....	44
13	Comparação estatística entre medianas dos valores de tonalidade máxima do micélio, pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), segundo linhagem e meio de cultura.....	54
14	Comparação estatística entre medianas da massa fresca de cogumelos ($g\ 1,2kg^{-1}$), pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, Dunn's e estatísticas, segundo linhagem e substrato.....	61
15	Comparação estatística entre medianas da eficiência biológica (%), pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, Dunn's e estatísticas, segundo linhagem e substrato.....	64
16	Comparação estatística entre medianas da massa fresca média dos cogumelos (g), pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, Dunn's e estatísticas, segundo linhagem e substrato.....	67
17	Comparação estatística entre medianas do número de cogumelos, pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, Dunn's e estatísticas, segundo linhagem e substrato.....	69
18	Comparação estatística entre medianas da massa seca dos cogumelos, pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, Dunn's e estatísticas, segundo linhagem e substrato.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano da linhagem LE 96/17 nos meios de cultura SDA-20, SDA-40, SBDA-20 e SBDA-40 (crescimento radial em placas de Petri).....	40
2 Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano da linhagem LE 98/51 nos meios de cultura SDA-20, SDA-40, SBDA-20 e SBDA-40 (crescimento radial em placas de Petri).....	40
3 Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano da linhagem LE 98/53 nos meios de cultura SDA-20, SDA-40, SBDA-20 e SBDA-40 (crescimento radial em placas de Petri).....	41
4 Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano da linhagem LE 98/56 nos meios de cultura SDA-20, SDA-40, SBDA-20 e SBDA-40 (crescimento radial em placas de Petri).....	41
5 Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano das linhagens LE 96/17, LE 98/51, LE 98/53 e LE 98/56 em meio de cultura SDA-20 (crescimento radial em placas de Petri).....	46
6 Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano das linhagens LE 96/17, LE 98/51, LE 98/53 e LE 98/56 em meio de cultura SDA-40 (crescimento radial em placas de Petri).....	46
7 Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano das linhagens LE 96/17, LE 98/51, LE 98/53 e LE 98/56 em meio de cultura SBDA-20 (crescimento radial em placas de Petri).....	47
8 Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano das linhagens LE 96/17, LE 98/51, LE 98/53 e LE 98/56 em meio de cultura SBDA-40 (crescimento radial em placas de Petri).....	47

9 Valores médios com os respectivos intervalos de confiança `a 95% da tonalidade do micélio (vigor), em escala de cinza, do crescimento miceliano da linhagem LE 96/17 em função dos meios de cultura (sendo o valor 0 referente à cor preta e o 255 à cor branca).....	52
10 Valores médios com os respectivos intervalos de confiança `a 95% da tonalidade do micélio (vigor), em escala de cinza, do crescimento miceliano da LE 98/51 em função dos meios de cultura (sendo o valor 0 referente à cor preta e o 255 à cor branca).....	52
11 Valores médios com os respectivos intervalos de confiança `a 95% da tonalidade do micélio (vigor), em escala de cinza, do crescimento miceliano da LE 98/53 em função dos meios de cultura (sendo o valor 0 referente à cor preta e o 255 à cor branca).....	53
12 Valores médios com os respectivos intervalos de confiança `a 95% da tonalidade do micélio (vigor), em escala de cinza, do crescimento miceliano da LE 98/56 em função dos meios de cultura (sendo o valor 0 referente à cor preta e o 255 à cor branca).....	53
13 Produção de massa fresca de cogumelos entre quatro linhagens de <i>L. edodes</i> (LE 96/17, 98/51, 98/53e 98/56) e quatro substratos (S20, S40, SB20 e SB40) em cultivo axênico.....	60
14 Eficiência biológica (%) entre quatro linhagens de <i>L. edodes</i> (LE 96/17, 98/51, 98/53e 98/56) e quatro substratos (S20, S40, SB20 e SB40) em cultivo axênico...	64
15 Massa fresca média por cogumelo, entre quatro linhagens de <i>L. edodes</i> (LE 96/17, 98/51, 98/53e 98/56) e quatro substratos (S20, S40, SB20 e SB40) em cultivo axênico.....	67
16 Número de cogumelos entre quatro linhagens de <i>L. edodes</i> (LE 96/17, 98/51, 98/53e 98/56) e quatro substratos (S20, S40, SB20 e SB40) em cultivo axênico.....	69
17 Massa seca dos cogumelos entre quatro linhagens de <i>L. edodes</i> (LE 96/17, 98/51, 98/53e 98/56) e quatro substratos (S20, S40, SB20 e SB40) em cultivo axênico.....	71

1. RESUMO

Foram estudadas as interações entre quatro fórmulas de substratos e as linhagens LE 96/17, LE 98/51, LE 98/53 e LE 98/56 na cinética de crescimento micelial e produção do cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler), em cultivo axênico, no primeiro fluxo. As linhagens utilizadas foram provenientes da Micoteca do Módulo de Cogumelos da Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP - Campus de Botucatu. Os isolados foram obtidos por via vegetativa, pela técnica de fragmentos de basidiocarpos e repicados em meio de cultura de serragem-dextrose-ágar. No estudo da cinética de crescimento miceliano, avaliaram-se os parâmetros crescimento em área (mm²) e vigor, em meio de cultura, através de monitoramento digital. O crescimento das linhagens de *L. edodes* foi fotografado diariamente, até a colonização total do meio de cultura, em placa de Petri. As fotos digitais, foram analisadas pelo programa UTHSCSA *ImageTool*, versão 2.0, 1997, desenvolvido pela *University of Texas Health Science Center*, San Antonio, Texas. Para avaliar a produção do *L. edodes*, foram utilizados os parâmetros massa fresca dos cogumelos, número total de cogumelos, massa fresca média do cogumelo e Eficiência Biológica ($EB = (g \text{ cogumelo fresco } g^{-1} \text{ substrato seco}) \times 100$). Para tanto, foram utilizados sacos de polietileno de alta densidade (PEAD), com 20cm de largura por 40 cm de comprimento, nos quais foram colocados $1200g \pm 10g$ de

substrato. Foi utilizado um tampão de algodão para evitar a ruptura durante a autoclavagem e propiciar aeração durante a colonização. A seguir, foram autoclavados à temperatura de 121°C por 4 horas. Após o resfriamento, o substrato foi inoculado em uma câmara de fluxo laminar e, a seguir, incubado a 24°C $\pm$ 2°C durante 123 dias. Para a indução de primórdios foi utilizado um choque térmico a 8°C durante 72 horas, seguido de embebição em água à mesma temperatura durante 48 horas. Pelos resultados obtidos, nas condições experimentais deste trabalho, observou-se que o modelo estatístico de melhor ajuste à cinética de crescimento miceliano em área (mm²), das linhagens de *L. edodes*, possui como componente determinístico, a exponencial de uma função Gompertz. O vigor, avaliado através do valor da tonalidade média do micélio, na escala de cinza, apresentou um comportamento semelhante entre as linhagens, ocorrendo seu valor máximo entre o 4º e o 5º dia de incubação. Após alcançarem o valor máximo, verificou-se o declínio gradativo dos valores até o final da incubação. Com relação ao cultivo axênico do *L. edodes* nos substratos, as diferenças entre as linhagens influenciaram diretamente a produção. As maiores produções de *L. edodes* foram obtidas com as menores proporções de farelos (10% farelo de trigo e de 10% farelo de arroz) enquanto que, as maiores proporções de farelos (20% farelo de trigo e de 20% farelo de arroz) inibiram a produção. As linhagens LE 96/17 e 98/56 apresentaram as maiores produções de basidiocarpos (174,2 e 145,2 g kg⁻¹, respectivamente) e as maiores EBs (40,3 e 33,3%, respectivamente) em apenas 14 dias de produção, sendo portanto, maiores que muitos relatos da literatura.

EFFECT OF STRAINS AND SUBSTRATE ON MYCELIUM GROWTH AND PRODUCTIVITY ON AXENIC SAWDUST CULTIVATION OF SHIITAKE (*Lentinula edodes* (BERK.) PEGLER). [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]. Botucatu, 2001. 104p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: RENATO MAMEDE DE CASTRO MONTINI.

Adviser: AUGUSTO FERREIRA DA EIRA.

2. SUMMARY

It was studied the interaction among four substratum formula and the strains LE 96/17, LE 98/51, LE 98/53 and LE 98/56 on mycelium growth kinetics and shiitake mushroom yield at the first flush of the axenic sawdust culture. The strains were from the mycological collection of the Faculdade de Ciências Agronômicas, Unesp de Botucatu. Mycelium fragments were transferred to a Petri dish with Sawdust-Dextrose-Agar medium. Mycelium growth kinetics was evaluated by measuring mycelium growth area and vigor on Petri dishes with digital camera and the program UTHSCSA ImageTool, version 2.0, 1997, developed by the University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas. The mushroom yield was evaluated by the Biological Efficiency (BE), total fresh mass and number of mushrooms. The fungus was cultivated in plastic bags of 20 x 40 cm and with 1200g $\pm$ 10g of substratum. After autoclaved at 121°C for 4 h the mycelium was inoculated and the bags incubated at 24°C for 123 days. Primordia were induced at temperature of 8°C for 72 h in a cold room and after that soaked in cold water at the same temperature for 48 h. It was observed that the best statistical model of curve that adjusts for mycelium growth kinetics was the Gompertz function. The vigor evaluated by mycelium color was in the maximum value between the 4th and 5th day of incubation. The highest yield of mushroom was from substrate with smaller than higher quantity of brain (wheat and rice bran). The higher quantity of bran inhibited the yield. Strains LE 96/17 e 98/56 had the highest yield (174,2 and 145,2 g kg⁻¹, respectively) and the highest BE (40,3 and 33,3%, respectively) on 14 days of culture, the highest value found in this researched literature.

Keywords: Shiitake, *Lentinula edodes*, substrate, mycelium growth, strains.

3. INTRODUÇÃO

Face às características de sua biologia e maior valor gastronômico, quando comparado com *Agaricus* spp e *Pleurotus* spp (Diehle & Royse, 1986) e relativa facilidade de produção, o *Lentinula edodes* vem sendo cultivado há cerca de 800 anos, primeiramente na China e depois no Japão (Chang & Miles, 1989). É um alimento de elevado valor nutritivo, possui baixo teor de carboidratos, gorduras e quantidades significativas de vitaminas (Chang & Miles, 1989; Przybylowicz & Donoghue, 1990; Harris, 1993). Afora o valor nutritivo, têm sido atribuídas ao *L. edodes* algumas propriedades medicinais, dentre outras: ação contra infecções viróticas, diminuição do crescimento de tumores em ratos (Fujii et al., 1978; Chihara, 1978) e redução no nível sérico de colesterol (Yamamura & Cochran, 1974).

Atualmente é produzido em toras e em cultivo axênico, nos países orientais como o Japão, Taiwan, República Popular da China, Tailândia, Coréia e Malásia, além de países ocidentais como EUA, Canadá, México e Brasil (Leatham, 1985; Chang & Miles, 1989; Przybylowicz & Donoghue, 1990; Oei, 1991; Eira & Minihoni, 1997; Mata et al., 1998). O cultivo axênico (substrato esterilizado), em sacos de polipropileno, é uma alternativa técnica de cultivo intensivo. Essas técnicas foram desenvolvidas usando-se, como substrato,

serragem misturada a vários ingredientes, em condições ambientais controladas ou semi-controladas (Royse, 1985; Han et al., 1981). Nestas condições, a produção do *L. edodes* possui um grande potencial para o desenvolvimento futuro da indústria de cogumelos (Chang & Miles, 1989; Przybylowicz & Donoghue, 1990; Oei, 1991).

Pelas informações da literatura, o cultivo do *L. edodes*, em substrato axênico, desenvolve-se rapidamente e resulta em maior produtividade em relação ao seu cultivo em toras. Entretanto, a qualidade do cogumelo produzido é geralmente menor que os produzidos nas toras (Chang & Miles, 1989). Na prática, a técnica de cultivo usada para seu rápido crescimento, principia pela esterilização do substrato em embalagens resistentes ao calor, seguida da inoculação. Neste processo é utilizada mão-de-obra intensiva e consome-se quantidade substancial de energia.

O propósito deste trabalho foi estudar interações entre linhagens de *L. edodes* e substratos (resíduos da agricultura ou agro-industriais), na cinética e vigor de crescimento miceliano e correlações com a produtividade e qualidade dos basidiocarpos em cultivo axênico.

4. REVISÃO DA LITERATURA

Atualmente a popularidade dos cogumelos não é apenas por seu valor gastronômico, mas também por seu potencial proteico elevado, o que enriquece a dieta humana, especialmente em alguns países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Quimio et al., 1990), onde os índices de desnutrição são elevados (Chang & Miles, 1984; Chang, 1991).

Neste contexto, os cogumelos comestíveis são alimentos de elevado valor nutritivo, com quantidades significativas de vitaminas (B₁, B₂, B₁₂, D, niacina e ácido pantotênico) e baixo teor de carboidratos e gorduras (Rigau, 1980; Chang & Miles, 1984; Bononi & Trufem, 1986; Molena, 1986; Bano & Rajarathnam, 1988; Chang, 1991).

O conteúdo proteico na matéria seca do *L. edodes* varia de 12 a 25% (Quimio et al, 1990; Harris, 1993) e o teor de lipídeos entre 1,6 a 2,5% (Harris, 1993). São apreciados em muitas dietas européias e orientais, com importante crescimento nos últimos anos, face à possibilidade econômica de produção (Eira & Montini, 1997). Além do valor nutritivo, têm sido atribuídas ao *L. edodes*, e a muitos outros cogumelos comestíveis, algumas propriedades medicinais (Suzuki & Oshima, 1974; Cochran, 1978; Chang 1982; Nanba et al. 1986; Mizuno, 1990).

4.1. VALOR MEDICINAL

Em muitas culturas orientais, os cogumelos são tidos como um grupo de alimentos com atributos especiais, promotores da saúde (Imazeki, 1980). O cogumelo *L. edodes* tem propriedades câncer-preventivas e pode ser benéfico à dieta humana (Jong & Birmingham, 1993).

O lentinan, um polissacarídeo produzido pelo *L. edodes*, foi isolado pela primeira vez em 1969, no Instituto Nacional do Câncer do Japão, devido a seus efeitos antitumorais (Chihara et al., 1970). Este polissacarídeo não exerce atividade tóxica direta às células tumorais, mas inibe o crescimento de tumores pela estimulação do sistema imunológico (Chihara, 1978). O lentinan possui também a propriedade de ativar macrófagos, indiretamente, através do estímulo às células T-auxiliares (Dennert & Tucker, 1973; Hamuro et al., 1976; Chihara, 1978). Além destas interações já citadas, o lentinan exerce outras com o sistema imunológico, que são responsáveis pela sua forte atividade antitumoral, como a ativação de células “natural killer” (Sendo et al., 1981) e aumento da produção das interleucinas IL-2 (Chihara et al., 1987).

A eritadenina, isolada do *L. edodes*, tem se mostrado eficiente em reduzir o nível sérico de colesterol (Yamamura & Cochram, 1974).

O polissacarídeo complexo (KS-2), isolado do Shiitake por Fujii et al. (1978), é outro composto que exerce atividade antitumoral contra o sarcoma 180 induzido e tumores de Ehrlich em camundongos (Fujii et al., 1978). Neste contexto, Alves de Lima et al. (2001), investigando o efeito antimutagênico de extratos hidrosolúveis de *L. edodes* em camundongos, observaram que esses extratos brutos possuíam propriedades antimutagênicas podendo, estas, correlacionarem-se a efeitos anticarcinogênicos.

Os efeitos medicinais e nutriceuticos, têm levado à valorização do cogumelo *L. edodes* no Brasil, garantindo um futuro promissor, tanto para as pesquisas (Montini, 1997; Sant'anna, 1998; Rossi, 1999; Teixeira, 2000; Fontanari et al., 2000; Pinto et al., 2000; Eira et al., 2000; Alves de Lima et al., 2001; Regina, 2001; Nascimento et al., 2001), como para estimular sua produção (Bononi & Trufem, 1986; Molena, 1986; Bononi et al., 1995; Eira & Minhoni, 1997).

4.2. CRESCIMENTO MICELIANO

O crescimento miceliano de fungos pode ser avaliado através da medida do crescimento linear das hifas sobre meio de cultura sólido, no qual o crescimento ocorre em função do tempo. A taxa de crescimento pode ser comparada sob diferentes condições ambientais, sendo que tais medidas providenciam as bases para a determinação dos fatores mais favoráveis ao crescimento fúngico (Chang & Miles, 1989).

Em condições de laboratório, o meio de cultura sólido (ágar) é por vezes considerado mais natural, uma vez que os fungos, na natureza, utilizam como substratos materiais sólidos, como por exemplo, madeira, restos de animais e vegetais, ou solo (Griffin, 1994). O crescimento miceliano em meio sólido, pode ser avaliado através de medidas de área, volume (Griffin, 1994; Regina, 2001) ou raio médio da circunferência (Marino, 1997; Celso, 1999).

O crescimento em função do tempo, resulta em uma curva do tipo sigmóide, que pode ser dividida em várias fases, as quais evidenciam diferentes propriedades fisiológicas. A primeira fase é denominada de lag-fase, caracterizada por menores taxas de crescimento; a segunda fase é a exponencial, caracterizada por uma taxa de crescimento constante e máxima; a terceira fase é a de declínio da taxa de crescimento, algumas vezes vista

como fase estacionária, de curta duração e a fase de morte. A duração da lag-fase depende da espécie do inóculo e dos nutrientes no meio de cultura. A fase exponencial é fortemente afetada por suplementos nutricionais, como fontes de nitrogênio e carbono. A fase de declínio da taxa de crescimento ocorre devido a exaustão de alguns nutrientes limitantes ou pelo acúmulo de metabólitos tóxicos. A fase de morte é usualmente acompanhada de autólise (Griffin, 1994).

A concentração de O₂ e o pH influenciam os processos metabólicos dos fungos e, conseqüentemente, a habilidade de utilizar substâncias nutritivas tais como carbono, nitrogênio, vitaminas e minerais (Chang & Miles, 1989). Khan et al. (1991), relatam que o maior crescimento em diâmetro do *L. edodes*, em meio de cultura, ocorreu em pH 5. O acúmulo de produtos finais tóxicos e a produção de metabólitos secundários, também influenciam o crescimento (Prosser, 1994).

4.3. APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS OU AGROINDUSTRIAIS

A utilização de resíduos agrícolas ou agroindustriais visando a ciclagem de nutrientes, é fato real e crescente desde a década de 90. Neste processo, ocorre a oxidação ou transformação dos resíduos lignocelulósicos, tais como o bagaço de cana-de-açúcar, serragem, palhas diversas, entre outros, para formas mais simples, disponíveis aos vegetais, animais e/ou microbiota nativa e/ou introduzida no sistema. O processo é popularmente conhecido como "fermentação no estado sólido" (Capelari, 1996; Pandey et al., 2000a) e envolve a atividade de uma comunidade microbiana diversa, incluindo bactérias e fungos, os quais, em conjunto com outros fatores, governam o processo. Neste sentido, é importante mencionar que a seleção de linhagens microbianas, bem como a composição dos substratos e a escolha dos parâmetros físicos, químicos e/ou bioquímicos do processo, podem

propiciar resultados mais adequados, para cada fim (Pandey et al., 2000b).

Com relação à degradação de madeira e de material lignocelulósico, em geral, sabe-se que os degradadores naturais mais eficientes de lignina são os fungos causadores de podridão branca da madeira, os quais são, na sua maioria, basidiomicetos. Este nome deriva da coloração que a madeira adquire em fases avançadas de degradação (Capelari, 1996). A utilização de substâncias lignocelulósicas pelos fungos, depende da sua capacidade de secretar enzimas que hidrolizem a celulose, hemicelulose e lignina, liberando nutrientes para o seu crescimento (Shuen & Buswell, 1992).

4.4. CULTIVO DO *L. EDODES* EM SUBSTRATO

Para o cultivo do *L. edodes* em substrato, geralmente são adotadas as seguintes operações: obtenção da matriz primária, produção da "semente" ou "spawn" (matriz secundária), preparo, inoculação e colonização do substrato, indução de primórdios, frutificação e colheita.

4.4.1. Obtenção da matriz primária e produção da "semente" ou "spawn"

A matriz primária constitui-se da fase micelial ou vegetativa do fungo, que coloniza completamente um substrato nutritivo previamente esterilizado. A obtenção da matriz primária inicia-se pelo isolamento do fungo, através de pequenos fragmentos de um basidiocarpo sadio, colocados em meio de cultura esterilizado, sob condições assépticas. Após cerca de oito dias de crescimento no escuro, com temperatura mantida a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, faz-se a repicagem do micélio inicial (desenvolvido em meio de cultura) para serragem enriquecida com farelo, incubando-se por 30 dias, no escuro, a $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Esta fase corresponde à produção da "semente" (Molena, 1986; Abe et al., 1992; Bononi et al., 1995; Eira & Minhoni, 1997;

Eira & Montini, 1997). Embora os meios de cultura mais utilizados, na obtenção da matriz primária, sejam batata-dextrose-ágar (San Antonio & Hanners, 1983; Bononi et al.; 1995; Abe, 1989; Abe, 1990) e malte-ágar (Nutalaya & Pataragetvit, 1981; Itävaara, 1993), o meio de serragem-dextrose-ágar (SDA) é mais indicado por evitar a adaptação fisiológica, que pode ocorrer quando o meio de cultura utilizado possui características muito diferentes do substrato de produção (Eira & Minhoni, 1997; Eira & Montini, 1997). Leatham & Griffin (1984) observaram que, culturas de *L. edodes* cujo desenvolvimento ocorreu em meio de extrato de madeira, conseguiram adaptar-se melhor aos efeitos inibitórios dos compostos presentes na madeira. Savoie et al. (1995), concluíram que esta adaptação envolve a produção de enzimas, necessárias à degradação dos compostos inibitórios.

4.4.2. Substratos de cultivo

Na produção do *L. edodes* em substrato, geralmente se utiliza a serragem da mesma espécie de árvore do cultivo em toras (Przybylowicz & Donoghue, 1990; Oei, 1991), a qual é comumente adicionada de resíduos agroindustriais livres de produtos químicos adversos ao crescimento do micélio. Esta adição, altera as condições químicas e/ou físicas do substrato, aumentando a velocidade de crescimento e a produção do *L. edodes*. Diversos resíduos têm sido utilizados, tais como: farelo de arroz, de trigo, de soja, polpa de beterraba, de café, quirera de milho, bagaço de cana-de-açúcar, levedo de cerveja etc. (Han et al., 1981; Royse, 1985; Badham, 1988; Chang & Miles, 1989; Przybylowicz & Donoghue, 1990; Royse, Bahler & Bahler, 1990; Quimio, Chang & Royse, 1990; Oei, 1991; Eira & Minhoni, 1997; Pandey et al., 2000). A escolha de um ou mais resíduos como suplemento à serragem depende, dentre outros fatores, dos custos e disponibilidade na região (Eira & Minhoni, 1997; Eira & Montini, 1997).

Atualmente, os estudos estão sendo voltados para o desenvolvimento de uma tecnologia que possibilite o cultivo de cogumelos comestíveis em substratos de baixo custo, fácil aquisição, com homogeneidade e ecologicamente corretos (Badham, 1988; Itäavara, 1993). O eucalipto reúne tais características pois tem sido amplamente utilizado em reflorestamento no Brasil (Carmo et al., 1990). A serragem de eucalipto é facilmente encontrada em madeiras, principalmente no sul e sudeste do Brasil.

Dentre os diversos suplementos, o bagaço de cana de açúcar, além de possuir disponibilidade nas regiões produtoras de açúcar e álcool, possui homogeneidade na sua composição química, características físicas e bromatológicas (Nussio & Balsalobre, 1993). Por possuir característica fibrosa, o bagaço de cana, quando prensado, pode condicionar espaços com aeração suficiente para o crescimento micelial (Rossi, 1999). De modo geral, apresenta-se com as seguintes características: 100 a 150 kg.m⁻³ de densidade e 48,21% de matéria seca. A matéria seca compõe-se de 1,86% de proteína bruta, 45,09% de fibra bruta, 48,06% de extrato não nitrogenado, 2,26% de extrato etéreo e 2,73% de matéria mineral. Dentro da fração fibra bruta, predomina a celulose com 44,69%, a hemicelulose com 22,91% e a lignina com 14,89% (Burgi, 1985).

Grãos, farelos ou materiais similares também são comumente utilizados como suplementos nutricionais, sendo sua composição uma mistura de proteínas, carboidratos e gorduras. A proteína é a principal fonte de nitrogênio destes materiais. Os suplementos nutricionais contêm minerais e vitaminas que também influenciam no crescimento do fungo. Sua adição objetiva, principalmente, o aumento dos níveis de nitrogênio e carboidratos disponíveis. Açúcares e amido são carboidratos prontamente disponíveis. Eles aumentam a velocidade de colonização e a degradação do substrato,

reduzindo o tempo até a frutificação. Devido ao fato do micélio converter estes carboidratos em reservas para a frutificação, ele aumenta a produção. Por outro lado, níveis muito altos resultam em um pequeno período de corrida de micélio, resultando em micélio pouco denso que produzem cogumelos de baixa qualidade (Przybylowicz & Donoghue, 1990; Oei, 1991).

Outros suplementos, como o calcário ou CaCO_3 , devem ser adicionados ao meio de cultivo, para a manutenção do pH favorável ao crescimento fúngico durante os últimos estágios de decomposição quando, então, ocorre um aumento da acidez ocasionada pelo metabolismo do fungo (Przybylowicz & Donoghue, 1990).

A umidade ideal para o crescimento do *L. edodes*, no substrato, situa-se entre 55 a 70% (Royse, 1985; Triratana & Tantikanjana, 1989; Quimio, Chang & Royse, 1990; Oei, 1991; Rinker, 1991).

Quanto às formulações de substratos para o cultivo axênico, segundo Royse (1985), a mais utilizada nos Estados Unidos da América é constituída por 80% de serragem (*Quercus* spp), 10% de farelos e 10% de grãos triturados, geralmente milho ou trigo. Rinker (1991) e Royse (1985) utilizaram, em base seca, uma proporção de 80% de serragem (*Quercus* spp), 10% farelo de trigo e 10% de painço. A umidade foi ajustada para aproximadamente 60% durante o preparo. Chang & Miles (1989) citam uma proporção de 72% de serragem (*Dalberia sisso*, *Acacia arabica* e *Populos alba*) adicionado de 26% de farelo de trigo e 2% de calcário. Sant'anna (1998) relata a utilização de 80% de serragem de eucalipto para 20% de farelo de trigo, sendo o pH corrigido com CaCO_3 para valores entre 5,5 a 6,0. Oei (1991) reporta como substrato comumente usado, serragem adicionada de 3 a 4% de farelo de arroz, 1% de farelo de trigo e 1% de CaCO_3 sendo, que a relação C/N deve ser de 25:1 na inoculação.

Segundo Sinch & Verma (1996), a relação C:N pode afetar a produção de *L.edodes*, sendo dependente da linhagem do cogumelo cultivado. Kalberer (2000), observou que a relação C:N ideal depende da disponibilidade e concentração das fontes de carbono e nitrogênio no substrato, da linhagem e das condições de cultivo. Rossi (1999), constatou que relações C:N de 49:1 e 45:1, obtidas com proporções de 25 e 30% de farelo de arroz com bagaço de cana, proporcionaram produções mais altas. Entretanto, Tokimoto & Kawai (1975), relataram que a produção não foi afetada pela relação C:N.

4.4.3. Inoculação do substrato

A inoculação dos substratos é feita em condições assépticas, após a abertura dos recipientes, resistentes ao calor, os quais foram autoclavados a 121°C durante 2 a 4 horas (Eira & Montini, 1997). Segundo Miller & Jong (1986), os sacos devem ser autoclavados a 121°C (até que o centro dos sacos alcancem 121°C por, no mínimo, 15 minutos). Entretanto, Badham (1988) autoclavou os sacos, que continham 2,2 kg de substrato e dimensões de 20x12x45 cm (largura, espessura e altura), à pressão de 1,3 kg/cm² por 4 horas. Após o resfriamento do substrato, procede-se a inoculação com o micélio do fungo ("semente"), sob condições assépticas (câmara de fluxo laminar).

Nos sacos de polipropileno ou polietileno de alta densidade, faz-se uso de um tampão de algodão para evitar a ruptura durante a autoclavagem e propiciar aeração durante a colonização (Oei, 1991; Rinker, 1991; Chang & Miles, 1989). Pode-se também utilizar outros materiais, como os filtros microbiológicos (microporo), previamente termosoldados à parede dos sacos (Quimio, Chang & Royse, 1990).

4.4.4. Colonização do Substrato

A colonização do substrato pode ser dividida em duas fases: "corrida" e estabilidade ou maturação do micélio.

4.4.4.1. "Corrida do micélio"

A "corrida do micélio" refere-se ao crescimento micelial imediatamente após a inoculação, até que o substrato do recipiente seja completamente colonizado pelo fungo (Chang & Miles, 1989). Durante a "corrida", o micélio absorve nutrientes, os quais serão utilizados na sua estrutura e na conversão da energia necessária para seu metabolismo e crescimento. Ainda nesta fase, o micélio utiliza o oxigênio e libera, entre outros, o gás carbônico (Kalberer, 1995; Mori, 1987).

Um fator importante, que deve ser considerado, são as trocas gasosas dos substratos nos sacos durante esta fase. Donoghue & Denison (1995) demonstraram que, em sacos com aberturas maiores para trocas gasosas, o micélio cresceu mais rapidamente. No entanto, faz-se necessário o controle ambiental adequado quando utilizam-se sacos com grandes aberturas, pois juntamente com o CO₂ perde-se água, ambos produtos da respiração do fungo.

A concentração de alguns compostos, especificamente o CO₂ e outros elementos voláteis como o etileno, influenciam o crescimento e o desenvolvimento do fungo (Przybylowicz & Donoghue, 1990). Regina (2001) relatou que, a baixa oxigenação não ocasionou a suspensão completa do crescimento do micélio em substrato, porém, causou uma forte retração do processo. Donoghue & Denison (1995) cultivando *L. edodes* em substratos com diferentes diâmetros de partícula de serragem, observaram menores níveis de CO₂ e

maiores de O_2 quando as partículas foram maiores, possibilitando, dessa forma, melhor troca gasosa. Por outro lado, as partículas maiores são degradadas mais lentamente, pois a sua área superficial é menor. Partículas muito pequenas, por sua vez, acabam inibindo a corrida do micélio devido à dificuldade de trocas gasosas. Assim, partículas com tamanho entre 2 a 3 mm são ideais para uma boa colonização. Partículas menores que 1,5 mm levam a um desenvolvimento micelial muito lento (Przybylowicz & Donoghue, 1990).

4.4.4.2. Estabilidade ou maturação do micélio

A fase de estabilidade ou maturação do micélio começa ao final da "corrida do micélio" e vai até o endurecimento e escurecimento da capa micelial que torna-se amarronzada (Chang & Miles, 1989). A formação da capa micelial, é muito importante pois age como uma barreira à perda de umidade, sendo também uma defesa contra contaminações (Przybylowicz & Donoghue, 1990). Ainda segundo estes autores, as áreas marrons são resultantes da oxidação de polifenol oxidases, uma reação à luz e ao oxigênio.

Segundo Bononi et al. (1995), durante a colonização do substrato devem ocorrer ciclos de claro e escuro alternados, com pelo menos 8 horas de luz por dia. O comprimento de onda entre 370 a 420 nm (Przybylowicz & Donoghue, 1990) e, a intensidade entre 180 a 500 lux (Przybylowicz & Donoghue, 1990) são os mais eficientes durante a colonização do substrato.

A aeração durante esta fase, também é necessária, pois os fungos utilizam o oxigênio e liberam, entre outros, o gás carbônico (Przybylowicz & Donoghue, 1990). A troca gasosa inadequada é um fator inibitório para o crescimento micelial do *L. edodes* (Leatham & Stahmann, 1987), podendo ainda, causar o acúmulo de produtos finais tóxicos e produção de metabólitos secundários (Stanier et al., 1969; Prosser, 1994). Durante o

período de colonização do substrato a temperatura ideal é 24°C (Abe, 1989; Eira & Montini, 1997).

O período para a formação da capa micelial também depende da linhagem (características genéticas) e do material utilizado no substrato que, segundo Klein (1996), tem influência pois pode determinar um crescimento micelial alterado, dependendo da sua estrutura granulométrica e de suas substâncias químicas.

O tempo de colonização do micélio varia em razão da linhagem utilizada e condições de crescimento. Em geral, no mínimo 60 dias e no máximo 180 dias são necessários (Chang & Miles, 1989). Ainda, segundo Chang & Miles (1989), caso a indução de primórdios seja realizada entre 120 a 150 dias, obtêm-se cogumelos de tamanho e forma desejados e boa produtividade. Royse (1985), avaliando a produtividade do Shiitake em cultivo axênico, também verificou que o maior tempo de colonização (116 dias) resultou em maior produtividade e tamanho médio de cogumelos quando comparado com o menor tempo de colonização (58 dias).

O micélio pode sofrer um retardamento de maturação como resultado de uma baixa degradação do substrato, assimilação inadequada dos produtos decompostos, ou uma deficiência de nutrientes no micélio. Neste caso, o bloco irá produzir um grande número de basidiocarpos defeituosos (sem pôneo, com forma irregular, estipe curta etc.), tal como observado por Chang & Miles (1989).

4.4.5. Indução de primórdios e frutificação

A indução de primórdios é utilizada no cultivo de cogumelos com o objetivo de estimular e acelerar a formação dos mesmos, podendo ser feita alterando-se a

temperatura de incubação ($\pm 24^{\circ}\text{C}$) por temperaturas mais baixas, entre 15 a 18°C (Chang & Miles, 1989; Royse, 1985; Kalberer, 1995). Algumas linhagens respondem bem a esta variação de temperatura, outras, porém, produzem mais quando submetidas a choque térmico (Leatham, 1985). O choque térmico pode ser feito refrigerando-se os blocos entre 5 a 8°C (Sant'anna, 1998; Leatham, 1985) durante 2 a 8 dias (Han et al., 1981; Sant'anna, 1998) e/ou mergulhando os blocos em água fria (5° a 16°C) durante 12 a 72 horas (Przybylowicz & Donoghue, 1990; Han et al., 1981). Ainda, sobre a indução de primórdios, Przybylowicz & Donoghue (1990) citam que a temperatura ideal depende da linhagem utilizada, sendo a maioria induzida por temperaturas entre 10 e 20°C durante 3 a 10 dias.

Dentre as variáveis, a temperatura tem sido um dos fatores mais importantes no cultivo do *L. edodes*. Ela influencia, dentre outros, o tempo de colonização do substrato, a indução de primórdios, o período de frutificação e a morfologia do basidiocarpo (Przybylonicz & Donoghue, 1990; Khan et al., 1991).

Durante a frutificação, a temperatura afeta a indução de primórdios e o seu desenvolvimento. Quanto à morfologia do basidiocarpo, altas temperaturas causam estipes longos e píleos de contexto delgado; baixas temperaturas causam estipes curtos e píleos de contexto espesso (San Antonio, 1981; Chang & Miles, 1989).

Estudos classificam as linhagens fúngicas em função da temperatura e época do ano em que ocorre naturalmente a frutificação. Algumas frutificam melhor ao redor de 10°C , outras entre 10 - 18°C e as de altas temperaturas, acima de 20°C (Oei, 1991; Przybylonicz & Donoghue, 1990 ; Raaska, 1992; Chang & Miles, 1989). Entretanto, alguns

testes realizados no Módulo de Cogumelos¹, mostraram que algumas linhagens, tidas como de baixa temperatura, produziam melhor durante o verão. Itävaara (1993), reporta que condições ambientais modificam a expressão gênica.

Quanto à umidade relativa, a faixa ideal situa-se entre 85 a 95%, não devendo ultrapassar 95%, pois o potencial de evaporação ficaria muito baixo e a superfície dos blocos permaneceriam molhadas, o que reduz a indução de primórdios e facilita a contaminação. Por outro lado, umidade relativa baixa, desidrata rapidamente os blocos de substratos, causando o aborto dos primórdios (Przybylonicz & Donoghue, 1990).

Para o cultivo do *L. edodes*, assim como de outros cogumelos comestíveis, é necessário que haja um mínimo de luminosidade para a indução, formação dos primórdios e desenvolvimento normal dos basidiocarpos (Przybylonicz & Donoghue, 1990). O comprimento de onda entre 370 e 420nm (Ando, 1974; Miller & Jong, 1986) e intensidade de 550 lux (Van et al., 1981; Han et al., 1981) são os mais eficientes para a frutificação do “Shiitake”. Han et al. (1981), estudando a influência da intensidade de luz no cultivo de *L. edodes*, reportou que não ocorreu indução de primórdios acima de 940 lux e abaixo de 180 lux. Observou, ainda, que a baixa luminosidade reduziu o desenvolvimento dos basidiocarpos quanto ao diâmetro do píleo e comprimento da estipe.

A concentração de CO₂ no ar do ambiente de frutificação deve ficar abaixo de 1200 mg kg⁻¹ (Royse, 1985; Royse, Bahler & Bahler, 1990), uma vez que altas concentrações causam píleos pequenos e estipes longos (Przybylonicz & Donoghue, 1990).

A remoção do saco plástico durante a frutificação, pode ser parcial ou total, em função das condições do ambiente de cultivo. Nos cultivos realizados com controle

1 Departamento de Produção Vegetal - Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP - Campus de Botucatu

ambiental (temperatura, umidade, luminosidade, CO₂ etc.), pode-se remover totalmente os sacos pois a perda de umidade ocorrerá de forma controlada (Rinker, 1991; Royse, 1985; Royse et al., 1990). Por outro lado, em cultivos rústicos, geralmente situados em localidades de clima favorável, onde o controle ambiental é realizado de forma rudimentar ou não o é, a abertura parcial do saco auxilia na manutenção da umidade do substrato (Przybylonicz & Donoghue, 1990; Chang & Miles, 1989).

Uma variedade de condições de frutificação é reportada por diferentes autores, sendo consenso a diminuição da temperatura (seguida ou não de imersão em água) e aumento da luminosidade.

Um dos métodos é incubar os blocos entre 20 a 25°C, no escuro, por 60 a 70 dias. Assim que o micélio tenha colonizado todo o substrato, o saco plástico é removido. Coloca-se o bloco em uma sala com temperatura entre 16 a 18 °C e umidade relativa entre 85 a 90%. O aparecimento de primórdios ocorre em 3 a 4 semanas e os cogumelos desenvolver-se-ão entre 7 a 10 dias (Chang & Miles, 1989).

Kalberer (1995) reporta que após 50 dias de incubação, os blocos foram transferidos para a sala de frutificação, iluminada 24 horas por dia. Durante os três primeiros dias a temperatura foi mantida a 15°C e após, elevou-se para 18°C, quando foram retirados os sacos plásticos. A umidade relativa da sala de produção ficou entre 91 a 98%.

Segundo Pettipher (1988), os blocos de substrato colonizados foram colocados em uma sala de frutificação à temperatura de 16°C e umidade relativa alta, com ciclo de doze horas (luz/escuro) em ambiente controlado. Os basidiocarpos foram colhidos de todos os blocos entre 9 e 19 dias após a transferência para o ambiente de frutificação.

Miller & Jong (1986) relatam que, após o micélio colonizar totalmente o substrato, o saco plástico é removido e o bloco de substrato é colocado em uma sala de frutificação com ambiente controlado, até a formação da capa micelial. A primeira produção pode ser induzida através de um choque térmico (frio) com duração de 24 a 48 horas ou diminuindo a temperatura ambiente para 10°C por vários dias.

O tempo total de colheita de um substrato varia entre 3 a 6 meses, ou mais, dependendo das condições ambientais durante a frutificação, fórmula do substrato e tamanho do bloco (Przybylonicz & Donoghue, 1990).

A colheita deve ser realizada quando o cogumelo apresentar características físicas desejadas para a comercialização e/ou consumo. O período entre o choque de indução e a colheita é função das características do substrato, da genética do fungo e também de variáveis abióticas e bióticas do ambiente (Eira & Minhoni, 1997).

A produtividade do substrato varia de acordo com os materiais utilizados na sua composição. Eficiência Biológica entre 0,6 e 135% foi descrita para o cultivo do *L. edodes* em substrato (Han et al., 1981; Royse, 1985; Badham, 1988; Pettipher, 1988; Chang & Miles, 1989; Rinker, 1991; LevAnon et al., 1993; Mata & Hernandez, 1994; Rossi, 1999).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Módulo de Cogumelos do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Campus de Botucatu, Área de Biotecnologia e Microbiologia Agrícola (Latitude 22°51' Sul, Longitude 48° 27' Oeste e altitude 786 m).

5.1. LINHAGENS

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens de *Lentinula edodes* LE 96/17, anteriormente utilizada na produção de Shiitake em toras, LE 98/51, LE 98/53, LE 98/56 utilizadas para cultivo axênico. Essas linhagens, segundo Nascimento et al. (2001), apresentam genótipos diferentes, segundo caracterização molecular pelo Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD). A análise qualitativa dos perfis de RAPD, diferenciou as linhagens em grupos distintos em relação ao grau de similaridade. Assim, a linhagem LE96/17, adaptada ao cultivo em toros de eucalipto, pertence a um grupo e as linhagens LE98/51, LE98/53 e 98/56, adaptadas ao cultivo axênico, pertencem a outros três grupos (Figura 22, em anexo). Todas as linhagens foram provenientes da micoteca do

Módulo de Cogumelos da FCA/UNESP, sendo consideradas as matrizes primárias dos experimentos.

O Quadro 1 apresenta os dados de origem e a data de isolamento de cada linhagem de *L. edodes*.

Quadro 1. Dados de origem e a data de isolamento de cada linhagem de *L. edodes*.

Linhagem	Data do isolamento	Origem
LE 96/17	04/96	basidiocarpo coletado em Rio Claro – SP, de um cultivo comercial em toros de eucalipto, segundo o produtor (Waldir Vieira) é oriunda de Israel.
LE 98/51	05/98	basidiocarpo coletado de cultivo comercial em substrato axênico, segundo o produtor originária dos EUA , denominada MM1.
LE 98/53	07/98	basidiocarpo coletado de um substrato axênico de cultivo comercial, segundo o produtor (Hiroki) é oriunda do Japão.
LE 98/56	11/98	isolado em Taiwan por bolsista do Módulo de Cogumelos (Yeh Wen Sheng), de um cultivo comercial em substrato axênico.

5.2. MEIOS DE CULTURA

Os meios de culturas foram preparados de acordo com a metodologia básica descrita por Eira & Minhoni (1997), Eira & Montini (1997). O meio de cultura utilizado no armazenamento das linhagens (matrizes primárias) foi constituído de serragem-dextrose-água (SDA-20), conforme descrito a seguir.

5.2.1. Meio de cultura SDA-20 (serragem-dextrose-água)

O meio de cultura foi preparado a partir da infusão de 200g de substrato composto pela mistura, em base seca de: 156g de serragem, 20g de farelo de trigo, 20g de farelo de arroz e 4g de carbonato de cálcio, por litro de água fervente durante 15 minutos; após filtrado em algodão, adicionou-se 10g L⁻¹ de dextrose e 15g L⁻¹ de água,

completando-se, caso necessário, o volume a 1L com água destilada. O meio foi autoclavado a 1 atm (121°C) por 30 minutos.

5.2.2. Meio de cultura SDA-40

O meio de cultura SDA-40 foi preparado conforme o item 5.2.1., porém, composto pela mistura em base seca de 116g de serragem, 40g de farelo de trigo, 40g de farelo de arroz e 4g de carbonato de cálcio.

5.2.3. Meio de cultura SBDA-20 (serragem-bagaço-dextrose-ágar)

Este meio de cultura foi preparado conforme o item 5.2.1., contudo, composto pela mistura em base seca de 116g de serragem, 40g bagaço de cana de açúcar, 20g de farelo de trigo, 20g de farelo de arroz e 4g de carbonato de cálcio.

5.2.4. Meio de cultura SBDA-40

Foi preparado conforme o item 5.2.1., todavia, formado pela mistura em base seca de 86g de serragem, 30g bagaço de cana de açúcar, 40g de farelo de trigo, 40g de farelo de arroz e 4g de carbonato de cálcio.

5.2.5. Composição química dos meios de cultura

A composição química dos extratos, após filtragem, dos meios de cultura, está indicada no Quadro 2.

Quadro 2. Composição química do extrato aquoso dos meios de cultura, após fervura (durante 15 minutos) e filtrado em algodão.

Meios de cultura	Meio SDA-20 ²	Meio SDA-40	Meio SBDA-20	Meio SBDA-40
Carbono Total % ²	0,30	0,75	0,30	0,90
N Total %	0,014	0,035	0,014	0,042
MO % (550°C)	0,54	1,35	0,54	1,62
pH (CaCl ₂ 0,01M)	5,00	4,90	5,00	5,00
Relação C/N	21/1	21/1	21/1	21/1
K ₂ O Total %	0,03	0,07	0,04	0,06
P ₂ O ₅ Total %	0,07	0,16	0,08	0,15
Ca Total%	0,01	0,004	0,01	0,004
Mg Total%	0,01	0,02	0,01	0,02
S Total %	0,0004	0,001	0,0006	0,0009

² Todos parâmetros expressos ao natural (extrato aquoso), segundo LANARV (1983). Análises realizadas pelo laboratório do Departamento de Solos, FCA/UNESP- Botucatu. ³ Os meios SDA-20 (156g de serragem (s), 20g de farelo de trigo (ft), 20g de farelo de arroz (fa) e 4g de carbonato de cálcio (cc)) SDA-40 (116g s, 40g ft, 40g fa e 4g cc) SBDA-20 (116g s, 40g bagaço de cana de açúcar, 20g ft, 20g fa e 4g cc) e SBDA-40 (86g s, 30g bagaço de cana de açúcar, 40g ft, 40g fa e 4g cc) em base seca, por litro de água.

5.3. SUBSTRATOS

Os materiais utilizados para compôr os substratos de cultivo foram serragem de eucalipto, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, farelo de arroz e carbonato de cálcio. Para formulação dos substratos foi utilizada a metodologia básica, descrita por Chang & Miles (1989), Badham (1988), Przybylowicz & Donoghue (1990), Royse (1985), Han et al. (1981), Sant'anna (1998) e Eira & Montini (1997), adaptada às condições do presente trabalho.

A serragem foi misturada com outros ingredientes (suplementos) em várias proporções, como mostra o Quadro 3.

Quadro 3. Proporção da mistura de ingredientes utilizada em cada formulação de substrato, em base seca.

Fórmula do substrato	Serragem de eucalipto (%)	Bagaço de cana de açúcar (%)	Farelo de trigo(%)	Farelo de arroz(%)	CaCO ₃ (%)	Ajuste da umidade do substrato (%)
S 20	78	-	10	10	2	60
S 40	58	-	20	20	2	60
SB 20	58	20	10	10	2	60
SB 40	43	15	20	20	2	60

5.3.1. Composição química dos substratos

A composição química dos substratos, está indicada no Quadro 4.

Quadro 4. Composição química dos substratos de cultivo axênico, após a homogenização, adição de água e esterilização (121°C por 4 horas).

Substratos	S 20 ³	S 40	SB 20	SB 40
Carbono Total % ²	52,78	51,10	51,67	51,67
N Total %	1,05	1,40	1,26	1,68
MO % (550°C)	95,00	92	93,00	93,00
pH *(CaCl ₂ 0,01M)	4,90	4,90	4,90	5,00
Relação C/N	50/1	37/1	41/1	31/1
Umidade* (110°C)	58,1	55,3	56,1	56,6

*Valor expresso em % ao natural (extrato aquoso) segundo LANARV (1983), demais parâmetros expressos em base seca (110°C). ²Análises realizadas pelo laboratório do Departamento de Solos, FCA/UNESP- Botucatu. ³ Os meios SDA-20 (156g de serragem (s), 20g de farelo de trigo (ft), 20g de farelo de arroz (fa) e 4g de carbonato de cálcio (cc)) SDA-40 (116g s, 40g ft, 40g fa e 4g cc) SBDA-20 (116g s, 40g bagaço de cana-de-açúcar, 20g ft, 20g fa e 4g cc) e SBDA-40 (86g s, 30g bagaço de cana-de-açúcar, 40g ft, 40g fa e 4g cc) em base seca, por litro de água.

5.4. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO MICELIANO EM MEIO DE CULTURA

Antecedendo o experimento de determinação da área, fez-se a inoculação das quatro linhagens

O meio de cultura, contido em frascos de vidro do tipo Duran, foi vertido para placas de Petri, em câmara de fluxo laminar e, após sua completa solidificação, as quatro linhagens armazenadas em tubos de ensaio (item 5.1) foram inoculadas em todos os

meios de cultura (item 5.2), para aumentar a adaptação do fungo aos nutrientes e diminuir a interferência de outros fatores na coleta dos dados. Assim que o micélio atingiu a distância de, aproximadamente, 10 mm do perímetro da placa, fez-se a transferência, em câmara de fluxo laminar, para novas placas contendo o mesmo meio de cultura, para a determinação do crescimento miceliano. Para a transferência, utilizou-se um cortador circular com 5 mm de diâmetro para o corte do meio de cultura com micélio, da extremidade da colônia e, com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, fez-se a inoculação do disco (corte circular do meio de cultura) no centro da placa, com o micélio voltado para o meio de cultura. As placas foram invertidas e incubadas dentro de sacos plásticos (para evitar a entrada de acáros), em câmaras de BOD a 25°C, sem fotoperíodo.

5.4.1. Monitoramento do crescimento micelial

O crescimento das linhagens de *L. edodes* foi fotografado diariamente durante a incubação, até a colonização total da placa de Petri, sempre próximos do horário em que foi realizada a inoculação, estabelecendo-se assim, ciclos de 24 horas. Para tanto, utilizou-se uma câmera digital acoplada a um pedestal com fundo preto fosco, instalado dentro da câmara de fluxo laminar. Desta maneira, a posição da câmera em relação à plataforma de foco permaneceu fixa. Na plataforma nivelada a placa foi acomodada numa posição também fixa. A luz incidente e refletida no local do posicionamento da placa era, respectivamente, de 550 lux e 50 lux, sendo medida, com auxílio de um luxímetro, conforme metodologia descrita por Busselle (1990). As lâmpadas utilizadas para a iluminação foram fluorescentes.

O equipamento fotográfico e sua regulação foram: câmera digital marca *Agfa*, modelo "*ePhoto1280*"; resolução usada: 307S (640 x 480 pixels, *standard compression*), *zoom* mínimo, *preview* normal, foco automático macro, demais *settings* padrão.

As fotos digitais foram analisadas com o auxílio do programa de computador (*freeware*), denominado UTHSCSA *ImageTool*, versão 2.0, de 1997, desenvolvido pela *University of Texas Health Science Center*, San Antonio, Texas, também utilizado por Celso (1999).

5.4.1.1. Determinação da área de crescimento micelial

Para análise das fotografias utilizou-se o *Image Tool*. Os álbuns onde estavam arquivadas as fotografias de cada tratamento foram abertos, primeiramente, pelo programa *Agfa PhotoWise* (acessório da câmera); em cada fotografia a colônia foi selecionada (inscrita num quadrilátero) para, então, ser enviada ao *ImageTool*.

A análise das imagens digitais, pelo programa, baseia-se na identificação de objetos que podem ser geometricamente delimitados. Tais objetos compreendem uma região contínua, definida por uma mesma tonalidade. No caso, as imagens somente podem ser analisadas em preto e branco (escala do cinza). A distinção se faz a partir dos extremos do branco ou do preto. A partir daí, a imagem vai sendo degradada no espectro do cinza (*grayscale*). Existe uma posição neste espectro em que o objeto, no caso, a colônia a ser delimitada, adquire a sua forma real, sendo este limite (*thresholding*) fixado manualmente. Neste ponto pode ser acionada a ferramenta de análise (*Object Analysis*), cujas medições são automaticamente registradas numa planilha com a média e desvio padrão que, então, podem ser editadas no *Microsoft Excel*. Foram feitas sete repetições de cada tratamento e avaliadas separadamente para, então, determinar sua área (mm^2) e vigor caracterizado pelo valor médio de tons de cinza (*mean gray level*).

5.4.1.2. Análise de vigor (*mean gray level*)

O vigor foi também avaliado através do programa *ImageTool*, pelo cálculo do valor médio dos pontos (pixels) na escala de cinza, contidos na área delimitada pela análise de objetos. Deve-se ressaltar que, para a análise da imagem, fez-se necessária a conversão das cores para tons de cinza. A escala de cinza pode variar de 0 a 255, sendo o primeiro valor referente à presença de pontos pretos e, o segundo, à de pontos brancos (informações obtidas no *Help* do programa). Portanto, quanto maior o valor na escala de cinza, maior será a intensidade do branco e, consequentemente, maior será o vigor.

5.4.2. Metodologia estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado, em experimento fatorial de quatro linhagens e quatro meios de cultura, com sete repetições por tratamento. Foram utilizados modelos de regressão não linear, com o objetivo de modelar o crescimento micelial do *L. edodes*. Após a seleção do melhor modelo, foi realizada a análise de variância não paramétrica, referente aos parâmetros do modelo de crescimento, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. Nos casos em que existiram diferenças significativas, foram aplicados o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) em nível de 5% de probabilidade e estimada a velocidade de crescimento instantânea pela primeira derivada da equação ajustada.

5.5. PREPARO E PRODUÇÃO DO *L. EDODES* EM CULTIVO AXÊNICO

Utilizou-se a metodologia proposta por Chang & Miles (1989), Badham (1988); Przybylowicz & Donoghue (1990), Royse (1985), Han et al. (1981), Royse et al. (1990), Diehle & Royse (1986), Rinker (1991) e Eira & Montini (1997), adaptada às condições do presente trabalho.

5.5.1. Adaptação do micélio

O preparo do substrato, destinado à fase de adaptação micelial, foi feita a partir da verificação do teor de umidade (Quadro 5) de cada um dos ingredientes dos substratos, por secagem sob radiação infravermelha (110°C).

Quadro 5. Teor de umidade dos ingredientes dos substratos, por secagem sob radiação infravermelha (110°C).

	Serragem	Bagaço de cana-de-açúcar	Farelo de trigo	Farelo de arroz
Teor de umidade (%)	6	37	18	18

Descontando-se a porcentagem de umidade existente, cada material teve sua massa medida, conforme quantidade especificada nas fórmulas (item 5.3), em relação à matéria seca. Para maior homogeneidade, os materiais foram misturados ainda secos, com o auxílio de uma betoneira e, após alguns minutos, adicionou-se água para correção da umidade a 60 %.

Cada substrato, após a correção da umidade e devida homogenização, foi colocado em frascos de vidros tipo conserva de 800ml (transparentes e cilíndricos), com o auxílio de um funil de boca larga, na quantidade de 300g por frasco. Os frascos de vidros foram fechados, com tampas originais previamente perfuradas ao centro e preenchidas com algodão (para propiciar as trocas gasosas). A seguir, as tampas foram cobertas com papel para evitar o molhamento do algodão e identificadas. Após estas operações, os frascos foram autoclavados a 121°C (1 atm), por um período de 2 horas (Eira & Minhoni, 1997). Após resfriamento, os frascos foram inoculados com o micélio, de mesmo tratamento, proveniente das matrizes em meio de cultura (item 5.4). Todo o processo de inoculação foi feito em câmara de fluxo laminar. Após a inoculação e identificação (linhagem e substrato) os frascos

de vidros foram acondicionados em sala com temperatura controlada a $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro, durante 20 dias, período necessário para a completa colonização. A seguir, deu-se início à segunda etapa do experimento.

5.5.2. Preparo dos substratos de cultivo

Os substratos foram preparados conforme as fórmulas do item 5.3 e mesma metodologia do item 5.5.1 para determinação do teor de umidade dos materiais (Quadro 6).

Quadro 6. Teor de umidade dos ingredientes dos substratos, por secagem sob radiação infravermelha (110°C).

	Serragem	Bagaço de cana-de-açúcar	Farelo de trigo	Farelo de arroz
Teor de umidade (%)	6	43	18	18

A serragem foi peneirada para a remoção de pequenos pedaços de madeira ou outros materiais duros para que, no enchimento e manuseio dos sacos não ocorressem perfurações, evitando-se a entrada de contaminantes.

Cada substrato foi preparado, separadamente, de acordo com a seguinte ordem: pesagem dos materiais (massa seca), homogenização, adição de água (para correção da umidade a 60%), preenchimento dos sacos, fechamento e identificação.

5.5.2.1. Preenchimento dos sacos

Foram utilizados sacos de polietileno de alta densidade (PEAD), pois suportam as altas temperaturas a que foram submetidos na autoclave (121°C ou 1 atm.), com 20cm de largura por 40 cm de comprimento, nos quais foram colocados $1200\text{g} \pm 10\text{g}$ de substrato. Foi utilizado um tampão de algodão para evitar a ruptura durante a autoclavagem e

propiciar aeração durante a colonização. Depois de identificados, foram autoclavados à temperatura de 121°C (1 atm.) por 4 horas.

5.5.3. Inoculação

Após o resfriamento, o substrato foi retirado da autoclave e colocado em um armário com lâmpadas ultra violeta acionadas durante trinta minutos, antes da inoculação em uma câmara de fluxo laminar. Os substratos foram inoculados com o micélio crescido nos frascos de mesmo tratamento (item 5.5.1), na proporção de 2,0%, da massa do substrato. Após a inoculação, os sacos foram identificados (linhagem e substrato) e, em seguida, incubados.

5.5.4. Incubação

O substrato inoculado foi incubado em uma sala de alvenaria a 24°C $\pm$ 3°C (com auxílio de um ar condicionado), com no mínimo 8 horas de luz, durante 123 dias. Os sacos foram inspecionados a cada dez dias, sendo retirados os sacos danificados e contaminados.

5.5.4.1. Fase de "corrida de micélio"

Durante a colonização, face às deficiências de aeração, para facilitar o crescimento do micélio até o fundo do saco, procedeu-se ao descolamento manual entre o filme plástico e o substrato (Wang & Zhang, 1993), o que favoreceu a aeração (trocas gasosas), regularizando o crescimento do fungo, que colonizou todo o substrato.

5.5.4.2. Fase de maturação do micélio

Nesta fase, foi possível observar que o micélio na superfície do bloco tornou-se espesso, ocorrendo a presença de exsudados em alguns tratamentos, entretanto, não foram observadas áreas marrons (início da formação da capa micelial).

Tendo em vista a importância da capa micelial e dos fatores que influenciam sua formação, optou-se por um período adicional (90 dias no total) de espera. Por não ocorrer a formação da capa em todos os tratamentos, optou-se pela indução da capa micelial, através da injeção de oxigênio, na parte interna dos sacos e externa dos blocos de substratos, por 10 segundos à pressão de 0,1 bar. Este procedimento foi realizado em todos os substratos.

5.5.5. Indução de primórdios e frutificação

Dentre as várias formas relatadas de indução, optou-se pela técnica de submeter os blocos de substratos a um choque térmico a 8°C durante 72 horas, seguido de embebição com água à mesma temperatura durante 48 horas. Para isso, os blocos colonizados foram retirados da sala de incubação e colocados (com o saco plástico) em câmara fria a 8°C por 72 horas. A seguir, os sacos foram abertos na extremidade superior, dentro da câmara fria e, então, adicionou-se 1 litro de água a 8°C no seu interior, permanecendo por 48 horas.

Ao final do choque térmico e imersão, foram removidos os sacos plásticos. Os blocos foram então acondicionados em câmara de cultivo, com ambiente controlado (tecnologia holandesa de última geração), ficando a temperatura entre 19 a 20°C, umidade relativa entre 90 a 95% e 12 horas de luz por ciclo de 24 horas. Além disso, o nível de CO₂ foi mantido abaixo de 1200 mg kg⁻¹.

5.5.6. Colheita e avaliações

Os basidiocarpos foram colhidos manualmente, segurando-os pela base da estipe e provocando, simultaneamente, um movimento de rotação e pressão em direção ao bloco de substrato. Os primeiros basidiocarpos foram colhidos 5 dias após o final da indução e o período de colheita estendeu-se por mais 9 dias. Os basidiocarpos foram contados, pesados (massa fresca) e desidratados em estufa com circulação forçada de ar a $60^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$, para secagem até massa constante e determinação da massa de matéria seca.

As variáveis usadas para a avaliação da produtividade foram: Massa Fresca dos Cogumelos (MFC), Massa Seca (MS), Número de Cogumelos (NC), Massa Fresca Média dos Cogumelos (MFMC) e Eficiência Biológica (EB). A MFMC foi calculada através da razão entre a MFC e o NC (Royse et al. 1990). A EB foi calculada através da razão entre a MFC e massa de matéria seca do substrato, multiplicada por cem, sendo, portanto, expressa em porcentagem.

5.5.7. Metodologia estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado, em experimento fatorial de quatro linhagens e quatro substratos, com 33 repetições por tratamento. Entretanto, devido a contaminação de 56 repetições, o número de repetições foi variável por tratamento, totalizando 472 repetições de 1,2 kg. Após a análise da distribuição dos dados, verificou-se sua distribuição não normal, e então, procedeu-se a análise de variância não paramétrica, referentes às variáveis MFC, MS, NC, MFMC e EB utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. Nos casos em que existiram diferenças significativas, foi aplicado o teste de Dunn's ao nível de 5% de probabilidade.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos em função das condições e metodologias adotadas, são apresentados a seguir.

6.1. DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIANO DO *L. EDODES* EM MEIO DE CULTURA

A velocidade de crescimento miceliano, seguiu modelos de regressão não linear , sendo detalhados a seguir.

6.1.1. Modelo de crescimento miceliano

Foram testados os modelos logísticos Neibull e Gompertz, sendo que o melhor explicou a cinética de crescimento das linhagens de *L. edodes*, em meio de cultura sólido, tem como componente determinístico a exponencial de uma função Gompertz (Ratkoswsky, 1983):

$$Y_{ij} = \exp \left\{ \alpha_j \exp \left[- \exp \left(\beta_j - \gamma_j X_{ij} \right) \right] \right\} + e_{ij}$$

onde, Y_{ij} é a área de crescimento (mm^2); X_{ij} é o tempo (dias); α , β e γ são os componentes do vetor de parâmetros θ ; e_{ij} = componente aleatório (ruído). Os índices i e j são relativos à i -ésima observação e ao j -ésimo tratamento (cruzamentos), respectivamente.

Uma vez ajustado o modelo para cada combinação de tratamento, linhagem e repetição, foram obtidas as estimativas dos parâmetros pelo método dos quadrados mínimos. A expressão que fornece a derivada ou velocidade instantânea de crescimento ($\text{mm}^2 \text{ dia}^{-1}$) do componente determinístico $f(X)$ é função dos parâmetros α , β e γ ou seja:

$$f'(X) = \frac{df(X)}{dx} = ag \exp[(b - gX) - \exp(b - gX)]$$

A comparação dos parâmetros do modelo de regressão não linear (α , β e γ), foi feita através de análise de variância não paramétrica com aplicação do teste de Kruskal-Wallis. Nos casos em que houve diferença significativa por esse teste, foi aplicado o Teste de Student-Newman-Kuels (SNK) em nível de 5% de significância (Zar, 1996). Nos casos em que dois tratamentos apresentem igualdade estatística entre os parâmetros α , β e γ , significa que possuem velocidades instantâneas iguais, como pode ser observado na expressão anterior referente à derivada. Caso contrário, basta que um dos parâmetros seja diferente, para assegurar a diferença estatística entre as velocidades instantâneas.

6.1.2. Cinética de crescimento miceliano em meio de cultura

Para o estudo da cinética de crescimento miceliano do *L. edodes* em meio de cultura foram feitas as comparações dos parâmetros estatísticos e posteriormente a construção das curvas de velocidades instantâneas.

As comparações dos parâmetros estatísticos α , β e γ , referente à cinética de crescimento miceliano de linhagens de *L.edodes*, segundo os diferentes meios de cultura utilizados (item 5.2) são apresentados nos Quadros 7 a 9.

Quadro 7. Comparações estatísticas do parâmetro alfa do modelo de regressão não linear¹, referente à cinética de crescimento miceliano do *L.edodes*, segundo meio de cultura e linhagem. (pelo teste não paramétrico de Student-Newman-Kills)

Meios de cultura	Linhagens			
	LE 96/17	LE 98/51	LE 98/53	LE 98/56
SDA-20	9,19 ^{a2}	9,38 ^a	9,14 ^a	9,29 ^a
SDA-40	9,06 ^b	9,35 ^b	8,86 ^b	9,12 ^a
SBDA-20	9,24 ^a	9,27 ^c	9,09 ^a	9,13 ^a
SBDA-40	9,09 ^b	9,25 ^c	8,98 ^b	9,19 ^a

$$^1 Y_{ij} = \exp \{ \alpha_j \exp [- \exp (\beta_j - \gamma_j X_{ij})] \} + e_{ij}$$

² Por coluna: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Os meios SDA-20 (156g de serragem (s), 20g de farelo de trigo (ft), 20g de farelo de arroz (fa) e 4g de carbonato de cálcio (cc)) SDA-40 (116g s, 40g ft, 40g fa e 4g cc) SBDA-20 (116g s, 40g bagaço de cana de açúcar, 20g ft, 20g fa e 4g cc) e SBDA-40 (86g s, 30g bagaço de cana de açúcar, 40g ft, 40g fa e 4g cc) em base seca, por litro de água.

Quadro 8. Comparações estatísticas do parâmetro beta do modelo de regressão não linear¹, referente à cinética de crescimento miceliano do *L.edodes*, segundo meio de cultura e linhagem. (pelo teste não paramétrico de Student-Newman-Kills)

Meios de cultura	Linhagens			
	LE 96/17	LE 98/51	LE 98/53	LE 98/56
SDA-20	0,05 ^{b2}	0,05 ^b	0,13 ^a	0,05 ^a
SDA-40	0,16 ^a	0,16 ^a	0,11 ^a	0,16 ^a
SBDA-20	0,07 ^b	0,07 ^a	0,13 ^a	0,07 ^a
SBDA-40	0,15 ^a	0,15 ^a	0,08 ^a	0,15 ^a

$$^1 Y_{ij} = \exp \{ \alpha_j \exp [- \exp (\beta_j - \gamma_j X_{ij})] \} + e_{ij}$$

² Por coluna: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Os meios SDA-20 (156g de serragem (s), 20g de farelo de trigo (ft), 20g de farelo de arroz (fa) e 4g de carbonato de cálcio (cc)) SDA-40 (116g s, 40g ft, 40g fa e 4g cc) SBDA-20 (116g s, 40g bagaço de cana de açúcar, 20g ft, 20g fa e 4g cc) e SBDA-40 (86g s, 30g bagaço de cana de açúcar, 40g ft, 40g fa e 4g cc) em base seca, por litro de água.

Quadro 9. Comparações estatísticas do parâmetro gama do modelo de regressão não linear¹, referente à cinética de crescimento miceliano do *L.edodes*, segundo meio de cultura e linhagem. (pelo teste não paramétrico de Student-Newman-Kills)

Meios de cultura	Linhagens			
	LE 96/17	LE 98/51	LE 98/53	LE 98/56
SDA-20	0,240 ^{a2}	0,218 ^a	0,244 ^a	0,224 ^b
SDA-40	0,233 ^a	0,217 ^a	0,243 ^a	0,216 ^b
SBDA-20	0,226 ^a	0,225 ^a	0,245 ^a	0,241 ^a
SBDA-40	0,239 ^a	0,221 ^a	0,234 ^a	0,211 ^b

$$1 \ Y_{ij} = \exp \{ \alpha_j \exp [- \exp (\beta_j - \gamma_j X_{ij})] \} + e_{ij}$$

² Por coluna: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Os meios SDA-20 (156g de serragem (s), 20g de farelo de trigo (ft), 20g de farelo de arroz (fa) e 4g de carbonato de cálcio (cc)) SDA-40 (116g s, 40g ft, 40g fa e 4g cc) SBDA-20 (116g s, 40g bagaço de cana de açúcar, 20g ft, 20g fa e 4g cc) e SBDA-40 (86g s, 30g bagaço de cana de açúcar, 40g ft, 40g fa e 4g cc) em base seca, por litro de água.

O crescimento micelial foi determinado pelos parâmetros alfa, beta e gama que interagiram durante a colonização do meio de cultura, desencadeando comportamentos distintos entre as linhagens em razão do meio de cultura, o que também foi observado por Regina (2001), estudando a cinética de crescimento miceliano do *L. edodes* em meio de cultura à base de serragem ou bagaço de cana-de-açúcar enriquecidos com farelos em diversas proporções.

Para a LE 96/17 nas comparações entre meios de cultura SDA-20 e SBDA-20 (Figura 1), não ocorreram diferença significativa (Quadro 7, 8 e 9), sendo portanto construídos em uma única curva de velocidade instantânea de crescimento, o que também ocorreu entre os meios SDA-40 e SBDA-40. Para a LE 96/17, observou-se maiores velocidades instantâneas, ao longo do tempo, nos meios SDA-20 e SBDA-20, sendo as menores velocidades instantâneas nos meios SDA-40 e SBDA-40. A maior quantidade de farelos, na LE 96/17, diminuiu a velocidade instantânea de crescimento.

Para a LE 98/51 na comparação entre os meios de cultura (Figura 2), o SDA-20 foi o que apresentou a maior velocidade instantânea de crescimento, no decorrer do tempo, seguida pela SDA-40 que apresentou velocidade instantânea final superior aos meios SBDA-20 e SBDA-40, que não apresentaram diferença significativa entre si (Quadro 7, 8 e 9), sendo portanto construídos em uma única curva de velocidade instantânea de crescimento. No entanto, os meios SBDA-20 e SBDA-40 apresentaram velocidade instantânea superior entre o 1º e o 8º dia, tendo apresentado comportamento semelhante entre o 4º e o 6º dia, porém inferior ao SDA-40 somente no último dia. Nesta linhagem, a adição de bagaço de cana reduziu a velocidade instantânea de crescimento.

Em relação à linhagem LE 98/53, na comparação entre os meios de cultura (Figura 3), SDA-20 e SBDA-20 não apresentaram diferença significativa (Quadro 7, 8 e 9), sendo portanto construídos em uma única curva de velocidade instantânea de crescimento, o que também ocorreu entre os meios SDA-40 e SBDA-40. Este mesmo comportamento, foi verificado com a LE 96/17, onde a maior quantidade de farelos, diminuiu a velocidade instantânea de crescimento.

Para a LE 98/56, na comparação entre os meios de cultura (Figura 4), não ocorreu diferença significativa (Quadro 7, 8 e 9), entre os meios SDA-20, SDA-40 e SBDA-40, sendo portanto construídos em uma única curva de velocidade instantânea de crescimento. Nesta linhagem, a menor quantidade de farelos e a presença do bagaço, aumentou a velocidade instantânea.

As curvas de velocidades instantâneas de cada linhagem de *L. edodes* (item 5.1) em função dos diferentes meios de cultura, são apresentadas nas Figuras 1 a 4.

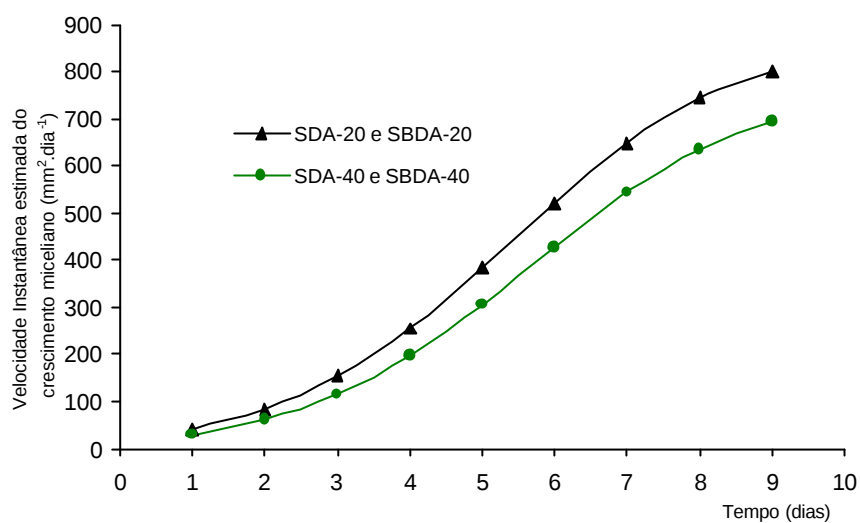


Figura 1. Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano da linhagem LE 96/17 nos meios de cultura SDA-20, SDA-40, SBDA-20 e SBDA-40 (crescimento radial em placas de Petri).

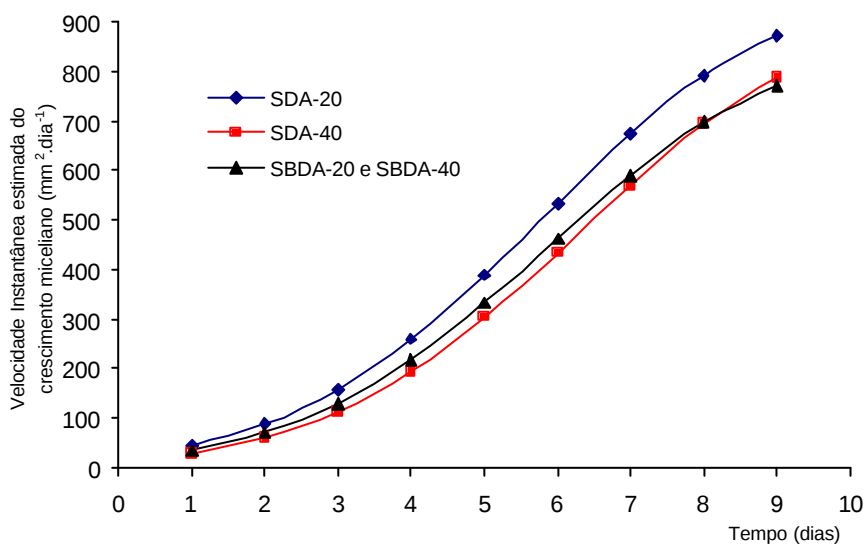


Figura 2. Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano da linhagem LE 98/51 nos meios de cultura SDA-20, SDA-40, SBDA-20 e SBDA-40 (crescimento radial em placas de Petri).

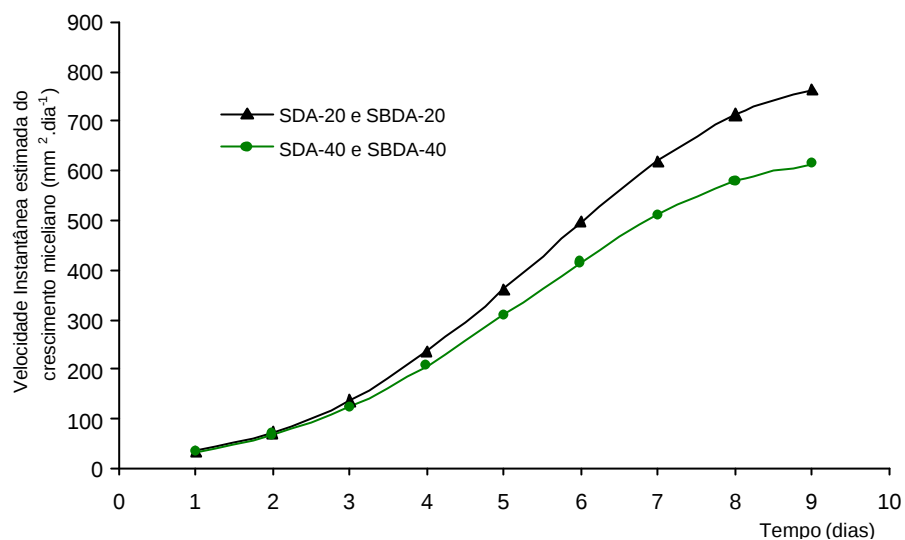


Figura 3. Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano da linhagem LE 98/53 nos meios de cultura SDA-20, SDA-40, SBDA-20 e SBDA-40 (crescimento radial em placas de Petri).

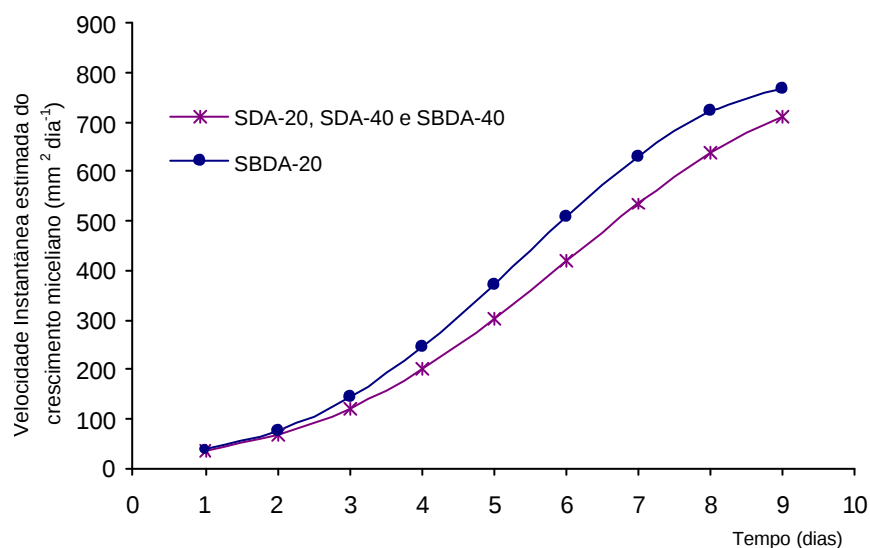


Figura 4. Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano da linhagem LE 98/56 nos meios de cultura SDA-20, SDA-40, SBDA-20 e SBDA-40 (crescimento radial em placas de Petri).

Analisando-se comparativamente, as curvas de velocidades instantâneas de crescimento micelial, de todas as linhagens em função dos meios de cultura (Figuras 1 a 4), pode-se observar que a LE 98/51 apresentou velocidades instantâneas maiores no meio SDA-20, ao longo do tempo, seguida pela linhagem LE 96/17 nos meios SDA-20 e SBDA-20 que não apresentaram diferenças estatísticas entre si, conforme o apresentado nos Quadros 7, 8 e 9. Por outro lado, as linhagens LE 96/17 e LE 98/53 apresentaram comparativamente, velocidades instantâneas inferiores nos meios SDA-40 e SBDA-40. Boyle (1998), estudando os fatores que limitam o crescimento de *L.edodes*, verificou que ocorreram variações na velocidade de crescimento em função da linhagem. Efeitos da linhagem foram relatados também por Worral & Yang (1992) e Royse & Bahler (1986), no estudo da interação entre linhagens de *L. edodes* e constituintes dos meios de cultivos. Tan & Moore (1992) comparando a produção de biomassa em meio líquido, verificou diferenças em função das linhagens. As diferenças metabólicas entre linhagens de uma mesma espécie podem causar grandes diferenças na habilidade de utilização do nitrogênio (Kurtzman & Zadrazil, 1982). O nitrogênio é um fator limitante no crescimento miceliano de *L.edodes* (Boyle, 1998), possuindo entretanto um limite máximo, após o qual ocorre uma diminuição do crescimento (Song et al., 1987).

As comparações dos parâmetros estatísticos α , β e γ , referente à cinética de crescimento miceliano do *L.edodes*, segundo as diferentes linhagens utilizadas (item 5.1), são apresentados nos Quadros 10 a 12.

Quadro 10. Comparações estatísticas do parâmetro alfa do modelo de regressão não linear*, referente à cinética de crescimento miceliano do *L.edodes*, segundo linhagem e meio de cultura. (pelo teste não paramétrico de Student-Newman-Kills)

Linhagens	Meios de cultura			
	SDA-20	SDA-40	SBDA-20	SBDA-40
LE 96/17	9,19 ^{c**}	9,06 ^b	9,24 ^a	9,09 ^b
LE 98/51	9,38 ^a	9,35 ^a	9,27 ^a	9,25 ^a
LE 98/53	9,14 ^c	8,86 ^c	9,09 ^b	8,98 ^c
LE 98/56	9,29 ^b	9,12 ^b	9,13 ^b	9,19 ^a

$$* Y_{ij} = \exp \{ \alpha_j \exp [- \exp (\beta_j - \gamma_j X_{ij})] \} + e_{ij}$$

** Por coluna: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Os meios SDA-20 (156g de serragem (s), 20g de farelo de trigo (ft), 20g de farelo de arroz (fa) e 4g de carbonato de cálcio (cc)) SDA-40 (116g s, 40g ft, 40g fa e 4g cc) SBDA-20 (116g s, 40g bagaço de cana de açúcar, 20g ft, 20g fa e 4g cc) e SBDA-40 (86g s, 30g bagaço de cana de açúcar, 40g ft, 40g fa e 4g cc) em base seca, por litro de água.

Quadro 11. Comparações estatísticas do parâmetro beta do modelo de regressão não linear*, referente à cinética de crescimento miceliano do *L.edodes*, segundo linhagem e meio de cultura. (pelo teste não paramétrico de Student-Newman-Kills)

Linhagens	Meios de cultura			
	SDA-20	SDA-40	SBDA-20	SBDA-40
LE 96/17	0,05 ^{c**}	0,16 ^a	0,07 ^a	0,15 ^a
LE 98/51	0,05 ^b	0,16 ^a	0,07 ^a	0,15 ^b
LE 98/53	0,13 ^a	0,11 ^b	0,13 ^a	0,08 ^b
LE 98/56	0,05 ^c	0,16 ^b	0,07 ^a	0,15 ^b

$$* Y_{ij} = \exp \{ \alpha_j \exp [- \exp (\beta_j - \gamma_j X_{ij})] \} + e_{ij}$$

** Por coluna: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Os meios SDA-20 (156g de serragem (s), 20g de farelo de trigo (ft), 20g de farelo de arroz (fa) e 4g de carbonato de cálcio (cc)) SDA-40 (116g s, 40g ft, 40g fa e 4g cc) SBDA-20 (116g s, 40g bagaço de cana de açúcar, 20g ft, 20g fa e 4g cc) e SBDA-40 (86g s, 30g bagaço de cana de açúcar, 40g ft, 40g fa e 4g cc) em base seca, por litro de água.

Quadro 12. Comparações estatísticas do parâmetro gama do modelo de regressão não linear*, referente à cinética de crescimento miceliano do *L.edodes*, segundo linhagem e meio de cultura. (pelo teste não paramétrico de Student-Newman-Kills)

Linhagens	Meios de cultura			
	SDA-20	SDA-40	SBDA-20	SBDA-40
LE 96/17	0,240 ^{b**}	0,233 ^b	0,226 ^b	0,239 ^a
LE 98/51	0,218 ^{ac}	0,217 ^c	0,225 ^b	0,221 ^b
LE 98/53	0,244 ^a	0,243 ^a	0,245 ^a	0,234 ^a
LE 98/56	0,224 ^c	0,216 ^c	0,241 ^a	0,211 ^b

$$* Y_{ij} = \exp \{ \alpha_j \exp [- \exp (\beta_j - \gamma_j X_{ij})] \} + e_{ij}$$

** Por coluna: medianas seguidas de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Os meios SDA-20 (156g de serragem (s), 20g de farelo de trigo (ft), 20g de farelo de arroz (fa) e 4g de carbonato de cálcio (cc)) SDA-40 (116g s, 40g ft, 40g fa e 4g cc) SBDA-20 (116g s, 40g bagaço de cana de açúcar, 20g ft, 20g fa e 4g cc) e SBDA-40 (86g s, 30g bagaço de cana de açúcar, 40g ft, 40g fa e 4g cc) em base seca, por litro de água.

Na análise da cinética de crescimento miceliano no meio SDA-20 (Figura 5), observou-se diferença entre as linhagens, tendo a LE 98/51 apresentado a maior velocidade instantânea, seguida pela LE 98/56, que apesar de possuir velocidade final inferior, apresentou maior velocidade, comparativamente à LE 98/51, entre o 3º e o 7º dia. A LE 96/17 apresentou a terceira maior velocidade final, porém, entre o 4º e o 7º dia, foi a LE 98/53 que apresentou os melhores resultados, entretanto, finalizou com a menor velocidade.

No meio SDA-40 (Figura 6), ocorreu diferença entre as linhagens, entretanto, entre o 1º e o 4º dia todas apresentaram desenvolvimento semelhante. Após o 5º dia as diferenças acentuaram-se, sendo que a LE 98/51 apresentou a maior velocidade instantânea, seguida pelas LE 96/17, 98/56 e 98/53, respectivamente. A LE 98/53 apesar de possuir a menor velocidade final, entre o 5º e o 7º dia, teve desempenho superior a LE 98/56.

Para o meio SBDA-20, as linhagens LE 96/17 e 98/51 não apresentaram diferença significativa (Quadros 10, 11 e 12), sendo portanto unidas em uma única curva de velocidade instantânea de crescimento (Figura 7), o que também ocorreu entre a LE 98/53 e 98/56. Até o 4º dia, as linhagens apresentaram desenvolvimento semelhante, sendo que, entre o 4º e o 7º dia as LE 98/53 e 98/56 apresentaram maior velocidade instantânea, entretanto, após o 8º as LE 96/17 e 98/51 obtiveram desempenho superior, resultando em maior velocidade final.

No meio SBDA-40 (Figura 8), observou-se diferença entre as linhagens, tendo a LE 98/51 apresentado a maior velocidade instantânea, seguida pela LE 96/17. Apesar da LE 98/53 possuir velocidade superior entre o 2º e o 7º dia em relação a LE 98/56, esta apresentou a terceira maior velocidade final, ficando a LE 98/53 com a menor velocidade final.

As curvas de velocidades instantâneas de cada meio de cultura (item 5.2), em função das diferentes linhagens de *L. edodes*, são apresentadas nas Figuras 5 a 8.

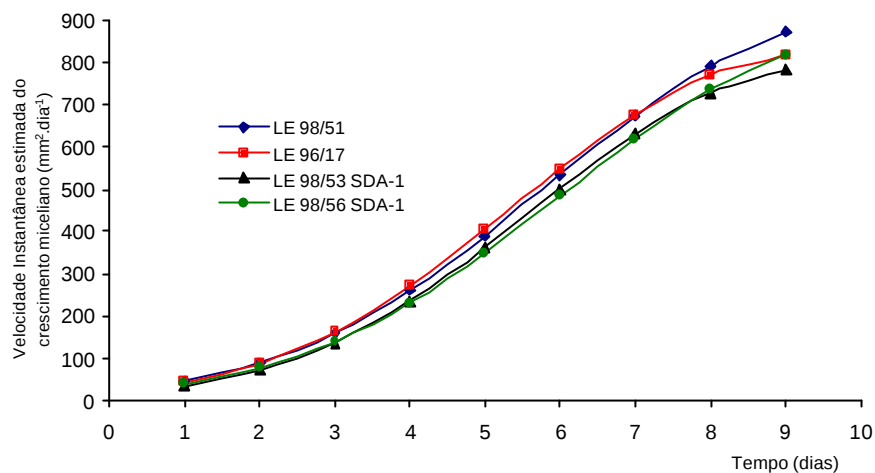


Figura 5. Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano das linhagens LE 96/17, LE 98/51, LE 98/53 e LE 98/56 em meio de cultura SDA-20 (crescimento radial em placas de Petri).

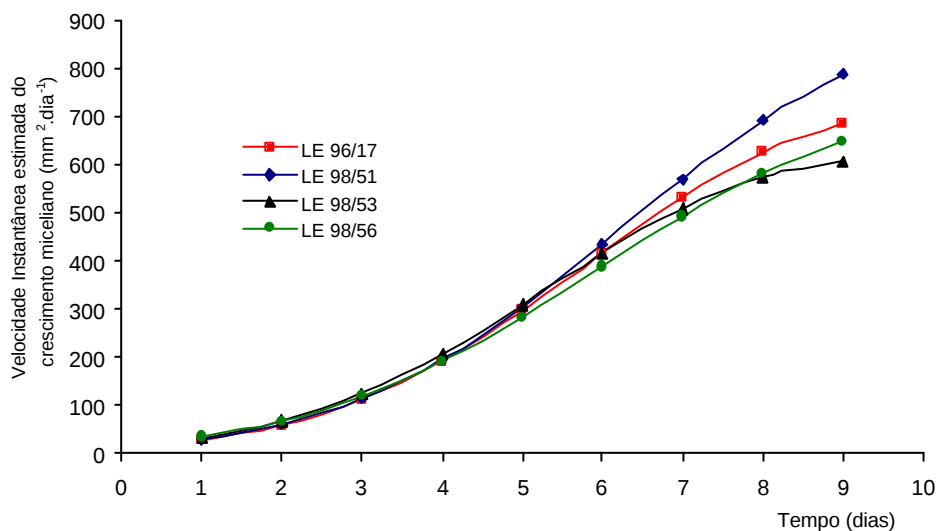


Figura 6. Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano das linhagens LE 96/17, LE 98/51, LE 98/53 e LE 98/56 em meio de cultura SDA-40 (crescimento radial em placas de Petri).

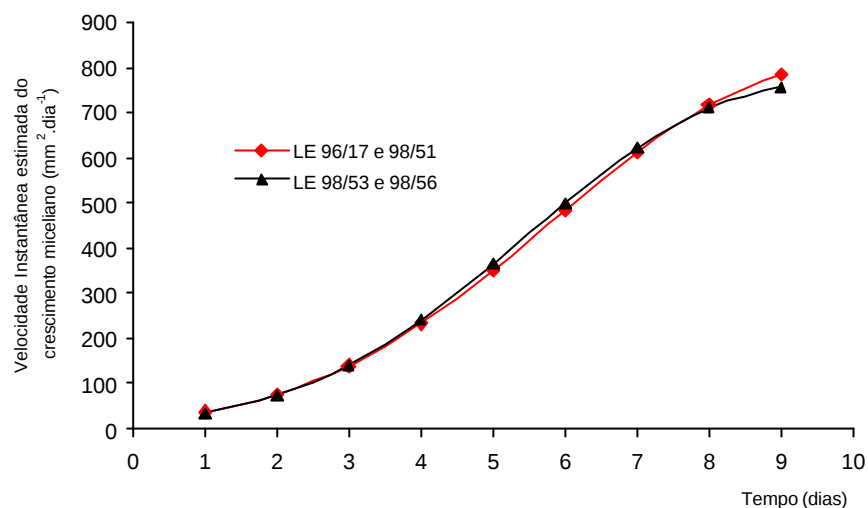


Figura 7. Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano das linhagens LE 96/17, LE 98/51, LE 98/53 e LE 98/56 em meio de cultura SBDA-20 (crescimento radial em placas de Petri).

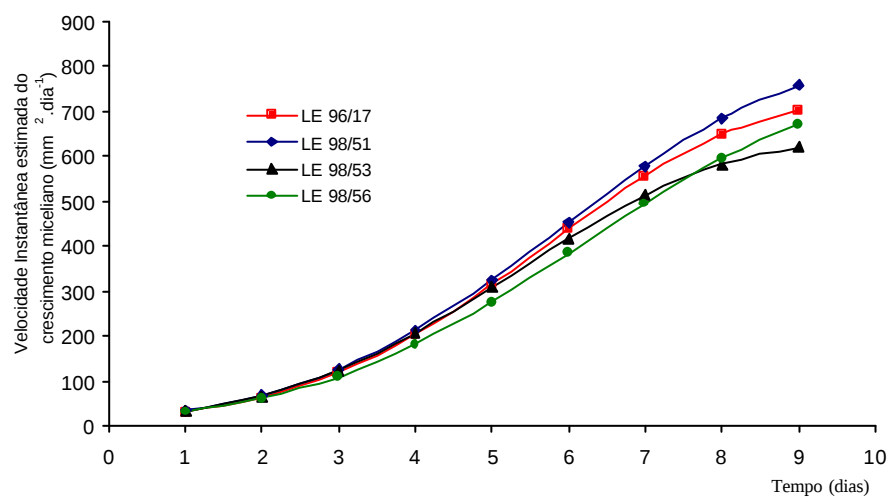


Figura 8. Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano das linhagens LE 96/17, LE 98/51, LE 98/53 e LE 98/56 em meio de cultura SBDA-40 (crescimento radial em placas de Petri).

Analisando-se as curvas das velocidades instantâneas de crescimento micelial, em todos os meios de cultura e em função das linhagens (Figuras 5 a 8) observa-se que, no meio SDA-20, a velocidade instantânea final foi diferente para as linhagens LE 98/51 (melhor desempenho), 98/56 (2º melhor desempenho) e 96/17 (3º melhor desempenho). Por outro lado, analisando-se as velocidades instantâneas finais inferiores, foi observado o pior desempenho no meio SDA-40 com a LE 98/53, seguida em ordem crescente, porém com desempenho pouco superior as linhagens LE 98/53 (SBDA-40); LE 98/56 (SDA-40); LE 98/56 (SBDA-40); LE 96/17 (SDA-40) e LE 96/17 (SBDA-40), respectivamente. As demais linhagens apresentaram desempenho intermediário.

Baseados na análise dos resultados obtidos, observou-se desempenhos superiores no meio de cultura (SDA-20) com quantidades menores de farelos de arroz e trigo e ausência de bagaço de cana-de-açúcar. Regina (2001), estudando o efeito da adição de farelos na velocidade instantânea de crescimento, também observou a maior velocidade de crescimento da LE 96/17, no meio de cultura com a mesma composição do SDA-20. As velocidades instantâneas inferiores, foram verificadas nos meios de cultura (SDA-40 e SBDA-40) constituídos com quantidades maiores de farelos de trigo e arroz. Em relação ao efeito do bagaço de cana, os resultados indicam que sua influência foi dependente do grau de suplementação com farelos.

A análise dos meios de cultura (Quadro 2) revela que, à medida que as quantidades de farelos aumentaram (item 5.2.5), também aumentaram os teores de carbono, nitrogênio, potássio, fósforo, magnésio e enxofre. Assim, há uma relação inversa entre os teores destes elementos e o crescimento miceliano do *L. edodes*, quanto à velocidade de crescimento. Esses resultados serão também comparados quanto ao vigor. Contudo, para o

presente experimento, não se pode inferir qual elemento ou combinação que seria limitante. Esse efeito limitante também foi relatado por Rossi (1999) e Kamra & Zadrazil (1988).

Analisando-se os teores de nitrogênio e carbono totais nos meios de cultura (Quadro 2, item 5.2.5) verifica-se que, a relação C:N permaneceu inalterada. Esta observação pode explicar certa discordância entre os vários autores e revela que os teores de carbono e nitrogênio devem ser sempre indicados. Sinch & Verma (1996), observaram que a relação C:N de 25 :1 foi fator limitante no crescimento de *L. lateritia*. Além desses autores, Rossi (1999) constatou que relações C:N de 45:1 e 38:1 também limitaram o crescimento micelial de *L. edodes*, quando comparadas com relações maiores 64:1 e 74:1. Entretanto, Song et al. (1987) relataram que o maior crescimento miceliano ocorreu quando a relação C:N foi de 30:1, e a menor para a C:N de 5:1. Em trabalho subsequente, Song (1989) obteve maior crescimento micelial quando a relação C:N também foi de 30:1, sendo que, à medida em que diminuía ou aumentava a concentração de N, obtiveram menores taxas de crescimento.

Deve-se ressaltar que a forma com que os nutrientes são apresentados, também influencia o crescimento microbiano. Neste sentido, Boyle (1998) observou que a utilização de formas mais complexas de N (farelos) ocasionou um crescimento maior em *L. edodes*. A disponibilidade de nitrogênio é um fator limitante no crescimento miceliano de *L. edodes* (Boyle, 1998), possuindo entretanto um limite máximo, após o qual ocorre redução do crescimento miceliano (Song et al., 1987).

Segundo Oei (1991) e Przybylowicz & Donoghue (1990) os farelos são utilizados como suplementos nutricionais, sendo compostos de proteína, carboidratos e gorduras. A sua adição objetiva, principalmente, o aumento dos níveis de nitrogênio e carboidratos disponíveis. Royse et al. (1990), citaram maior crescimento em substrato

enriquecido com farelo de arroz entre 10 a 40%. Eira & Minhoni (1997), relataram que o cultivo axênico de *L. edodes* pode ser feito em serragem acrescentada de 20% de farelos e outros nutrientes. Rossi (1999) verificou que as proporções de farelo de arroz entre 25 e 30% acrescentados ao bagaço de cana, promoveram as produções mais elevadas de basidiocarpos de *L. edodes*.

6.2. ESTUDO DO VIGOR DO *L. EDODES* EM MEIO DE CULTURA.

A terminologia "vigor" está sendo proposta e quantificada digitalmente neste trabalho, embora já seja utilizada por diversos autores (Tan & Chang, 1989; Marino, 1997; Rossi, 1999) mas analisada pelo critério subjetivo de notas. Assim, propõe-se exprimir uma grandeza digitalizável com base na densidade micelial (que traduz diretamente a biomassa) e na idade do micélio. A idade do micélio pode ser expressa em função das mudanças na sua tonalidade no decorrer do tempo que, frequentemente não é visível a olho nú, mas pode ser detectada pela análise digital.

O vigor, avaliado através do valor médio dos pontos (pixels) na escala de cinza ou seja, a tonalidade média do micélio, denotou um comportamento semelhante entre as linhagens (Figuras 9 a 12). No primeiro dia, os valores da tonalidade média do micélio foram os mais baixos, provavelmente devido à área de cor amarronzada presente no verso do disco (item 5.4.), utilizado para inocular o meio de cultura com o *L. edodes*. A partir do 2º dia observou-se aumento progressivo no valor médio, ocorrendo seu valor máximo entre o 4º e o 5º dia variando em função do meio de cultura utilizado, exceção apenas para a linhagem LE 98/53 no meio SDA-20, na qual o valor máximo ocorreu no 6º dia. Após alcançarem o valor máximo da tonalidade média do micélio, verificou-se o declínio dos valores até o último dia. O intervalo de confiança para μ à 95% ($IC_{\mu 95\%}$) evidenciou a amplitude entre os valores das repetições, inicialmente maiores, porém, diminuindo até alcançarem o valor máximo da tonalidade média do micélio, mantendo-se então, até o final das leituras.

Os resultados permitiram verificar que as linhagens, à medida que se desenvolvem, aumentam o vigor (aumento da tonalidade do micélio). Entretanto, este aumento foi limitado, provavelmente, pelo envelhecimento do micélio no centro da colônia que, muda o

metabolismo do fungo, levando à ocorrência de vaculos (Stanier et al., 1969) e à presença de exudados (Griffin, 1994). Estes fatos, podem causar mudanças na tonalidade do micélio, que apesar de não ser visível a olho nú, foi detectada pela análise digital.

O estudo do vigor do *L. edodes* em meio de cultura, através dessa nova metodologia proposta (item 5.4.1.2), encontra-se nas Figuras 9 a 12.

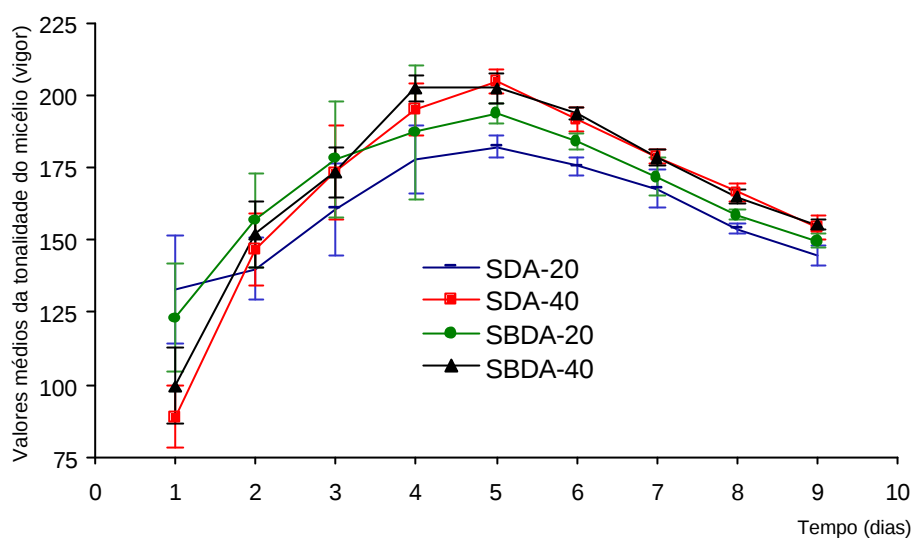


Figura 9. Valores médios com os respectivos intervalos de confiança à 95% da tonalidade do micélio (vigor), em escala de cinza, do crescimento miceliano da linhagem LE 96/17 em função dos meios de cultura (sendo o valor 0 referente à cor preta e o 255 à cor branca).

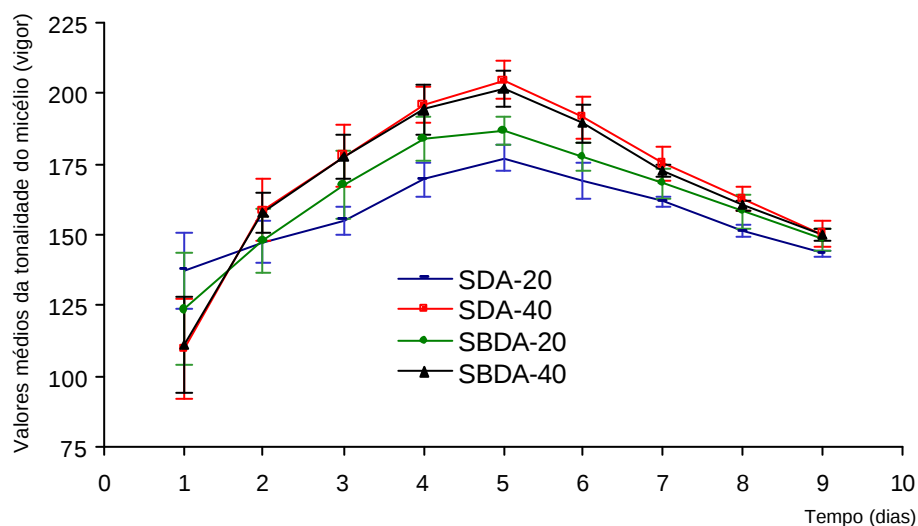


Figura 10. Valores médios com os respectivos intervalos de confiança à 95% da tonalidade do micélio (vigor), em escala de cinza, do crescimento miceliano da LE 98/51 em função dos meios de cultura (sendo o valor 0 referente à cor preta e o 255 à cor branca).

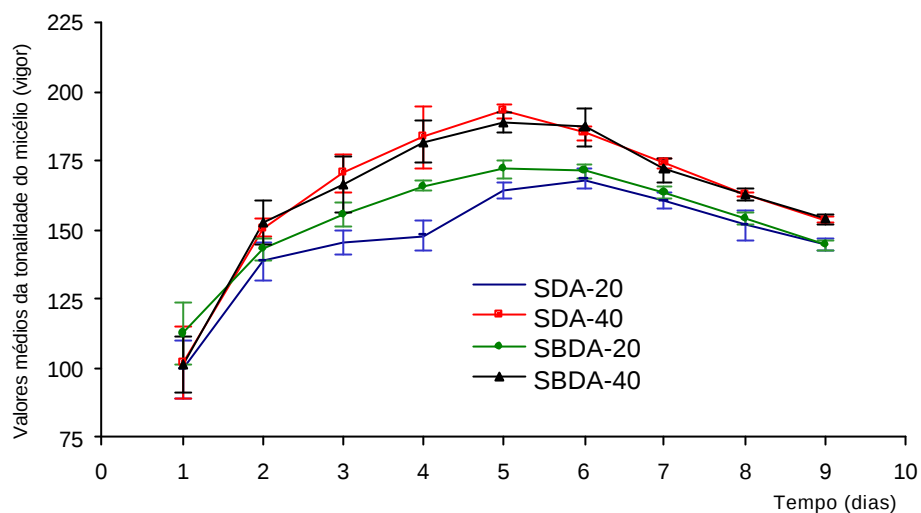


Figura 11. Valores médios com os respectivos intervalos de confiança à 95% da tonalidade do micélio (vigor), em escala de cinza, do crescimento miceliano da LE 98/53 em função dos meios de cultura (sendo o valor 0 referente à cor preta e o 255 à cor branca).

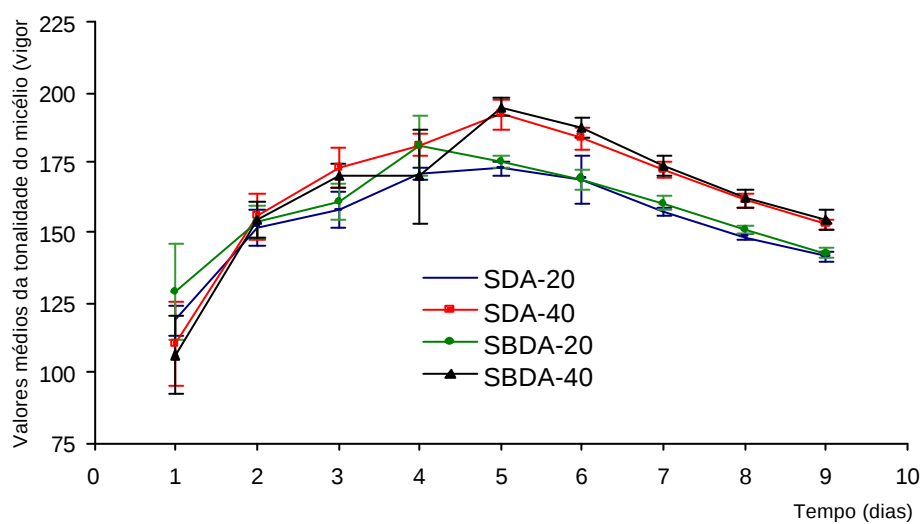


Figura 12. Valores médios com os respectivos intervalos de confiança à 95% da tonalidade do micélio (vigor), em escala de cinza, do crescimento miceliano da LE 98/56 em função dos meios de cultura (sendo o valor 0 referente à cor preta e o 255 à cor branca).

Neste estudo do vigor, optou-se pela comparação dos valores máximos dos pontos (pixels) na escala de cinza ou seja, a tonalidade máxima do micélio, independentemente do dia de ocorrência, com base nos fatos anteriormente relatados.

O Quadro 13 apresenta as comparações entre as medianas dos valores de tonalidade máxima do micélio, segundo linhagem e meio de cultura.

Quadro 13. Comparação estatística entre medianas dos valores de tonalidade máxima do micélio, pelo teste de Student-Newman-Kills (SNK), segundo linhagem e meio de cultura.

Linhagens	Meios de cultura			
	SDA-20	SDA-40	SBDA-20	SBDA-40
LE 96/17	182 ^{*aB}	206 ^{aA}	196 ^{aA}	204 ^{aA}
LE 98/51	175 ^{bC}	206 ^{aA}	191 ^{bB}	200 ^{aA}
LE 98/53	168 ^{cC}	193 ^{bA}	173 ^{cB}	190 ^{bA}
LE 98/56	173 ^{bC}	189 ^{bA}	178 ^{dB}	196 ^{bA}

* Letras maiúsculas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de SNK. Letras minúsculas: para cada substrato, linhagens representados pela mediana, seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de SNK. Medianas referentes a 7 repetições. Os meios SDA-20 (156g de serragem (s), 20g de farelo de trigo (ft), 20g de farelo de arroz (fa) e 4g de carbonato de cálcio (cc)) SDA-40 (116g s, 40g ft, 40g fa e 4g cc) SBDA-20 (116g s, 40g bagaço de cana de açúcar, 20g ft, 20g fa e 4g cc) e SBDA-40 (86g s, 30g bagaço de cana de açúcar, 40g ft, 40g fa e 4g cc) em base seca, por litro de água.

Nas comparações entre linhagens (Quadro 13), as LE 96/17 e 98/51 apresentaram os maiores valores da tonalidade máxima do micélio, independentemente do meio, porém, a linhagem LE 98/51 não diferiu significativamente da LE 98/56, no meio SDA-20. O maior valor de tonalidade máxima do micélio foi verificado com a LE 96/17 e 98/51, que não diferiram significativamente no substrato SDA-40. A ocorrência de respostas diferenciadas em razão das linhagens, também foi observada por Tan & Moore (1992), quando compararam a biomassa produzida entre linhagens em diferentes meios de cultura. Estes mesmos autores, utilizaram como critério para a seleção inicial das linhagens, o vigor (avaliação visual) e velocidade de crescimento, em placas de Petri.

A utilização da análise digital, permite uma comparação menos subjetiva do vigor de crescimento das linhagens. Além da avaliação de crescimento em placa de Petri, a análise digital também poderia ser utilizada, na avaliação do crescimento em serragem. Este alias, tem sido associado a boas colheitas de basidiocarpos de *L. edodes* (Tan & Chang, 1989).

Nas comparações entre meios de cultura (Quadro 13), observou-se que a tonalidade máxima do micélio, foi verificada nos meios com maiores quantidades de farelos de trigo e de arroz, independentemente das linhagens, exceto para os meios SDA-40, SBDA-20 e SBDA-40 com a linhagem LE 96/17, pois não diferiram estatisticamente. Os meios SDA-40 e SBDA-40, que não diferiram significativamente para as linhagens LE 98/51, 98/53 e 98/56, indicam que a porcentagem dos farelos na composição dos substratos exerceu maior influência. De forma semelhante, Straatsma (1991) verificaram que os meios nutricionalmente mais ricos, promoveram a formação de um micélio mais vigoroso, quando comparado com meios pobres. Este fato, pode ser explicado de forma inversa (Dix & Webster, 1995) observando-se que, quando as condições nutricionais ao redor do micélio são insuficientes, o crescimento é direcionado para as hifas principais (extremidades), possibilitando um crescimento mais acelerado (maior velocidade de expansão linear), ao invés da produção de biomassa.

6.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BASIDIOCARPOS DE *L. EDODE* SEM CULTIVO AXÊNICO

Os resultados de produção deste experimento, foram obtidos apenas para o primeiro fluxo de frutificação, como os relatados por Badham (1988), sendo apresentados e discutidos a seguir.

A fase de indução de primórdios e frutificação é uma das fases em que o controle do ambiente é crítica e um fator decisivo para a obtenção de boas colheitas segundo diversos autores (Kalberer, 1995 e 2000; Rinker, 1991). O controle do ambiente em câmaras climatizadas possui um custo elevado e é, em sua maioria, dependente do uso de quantidade substancial de energia elétrica. Períodos de colheitas, maiores que 2 meses, são citados em inúmeros trabalhos (Royse, 1985; Royse et al., 1990; Delpech & Olivier, 1991), sem, no entanto, levar-se em conta o custo. Por outro lado, a análise dos trabalhos de Royse et al. (1990) e Delpech & Olivier (1991) permite verificar que, dependendo da linhagem e da técnica de cultivo utilizada, mais da metade da EB ocorre nos primeiros 10 dias de colheita. A permanência do substrato no ambiente de frutificação, também propicia o desenvolvimento de contaminantes, que podem causar queda na produtividade, como verificado por Andrade (1999), no cultivo em toras e por Mata et al. (1998), Kalberer (1995) no cultivo em substrato. Kalberer (1995), enfatiza que períodos menores de colheita minimizam as contaminações.

Com relação à aeração, durante o período de incubação, observou-se que o algodão utilizado no selamento do saco, não foi suficiente para as trocas gasosas necessárias. Em decorrência deste fato foi injetado oxigênio nos sacos, com o intuito de melhorar a aeração para formação da capa micelial.

A avaliação da produção (Quadro 14 a 18 e Figuras 13 a 17) das linhagens LE 98/51 e 98/53, inferior às demais linhagens, sugere que as condições do presente

experimento, não foram favoráveis à expressão dos seus potenciais produtivos ou que, essas linhagens, podem ter perdido genes de frutificação. Provavelmente, essas linhagens possuam maior necessidade de trocas gasosas (Donoghue & Denison, 1995), e/ou apresentem sensibilidade à presença de metabólitos secundários (Prosser, 1994), evidenciando a necessidade da utilização de linhagens diferentes, para comparação entre diferentes técnicas de cultivo. Segundo Przybylowicz & Donoghue (1990), Stamets & Chilton (1983) e Teixeira & Machado (1997), ocorre produção de basidiocarpos devido a estímulos, tais como: mudança na temperatura e umidade do substrato, disponibilidade de nutrientes entre outros. Entretanto, as respostas a esses estímulos e também à sua intensidade, podem diferir em relação às linhagens.

A linhagem LE 98/51 no substrato S20, não produziu basidiocarpos nas 19 repetições, sendo portanto, excluída da comparação dos tratamentos na avaliação da produtividade de basidiocarpos de *L.edodes*. Este aspecto também demonstra que não ocorreu correlação entre os estudos realizados "in vitro" (cujas velocidades de crescimento e vigor miceliano, foram semelhantes ao das demais linhagens) e a produção de basidiocarpos, ao contrário do relatado por Tan & Chang (1989).

6.3.1. Massa Fresca de Cogumelos (MFC) em função das linhagens e substratos

Nas comparações entre linhagens (Quadro 14, Figura 13), LE 96/17 e 98/56 apresentaram as maiores MFCs, independentemente do substrato. O maior valor de MFC foi verificado com a LE 98/56 no substrato S20, a qual não diferiu significativamente do substrato SB20. Nos substratos S40 e SB40, a LE 98/56 também não diferiu. Para a LE 96/17 a maior MFC ocorreu no substrato SB20, que diferiu significativamente dos demais. O desempenho inferior das demais linhagens, indica que as condições utilizadas, foram desfavoráveis à MFC.

Os resultados (Quadro 14, Figura 13) evidenciaram que, as diferenças entre linhagens (Nascimento, 2001) influenciaram significativamente na MFC. A ocorrência de respostas diferenciadas em função das linhagens, também foi observada por Han et al. (1981), quando compararam 8 linhagens de *L.edodes* inoculadas em substratos com serragens de diferentes espécies de madeiras, adicionadas a 10% de farelo de arroz obtendo, comparativamente, produções entre 24g a 205,2g Kg⁻¹ de cogumelos. Em experimento subsequente, das 25 linhagens testadas, 23 produziram basidiocarpos, sendo que, nas duas restantes não houve produção. Dentre os relatos de diversos autores (apenas no cultivo em substrato axênico de *L.edodes*) foi possível verificar, que fatores como: temperatura (Han et al., 1981), fórmula do substrato (Przybyłowicz & Donoghue, 1990), inóculo líquido ou sólido (Kirchhoff & Lelley, 1991), período de corrida de micélio (Royse, 1985), tratamento térmico (Diehle & Royse, 1991; Rinker, 1991), fontes de nitrogênio, carbono e suas proporções (Han et al., 1981; Royse et al., 1990), resultaram em diferentes respostas decorrentes das características genéticas de cada linhagem.

Nas comparações entre substratos (Quadro 14, Figura 13), observou-se que as maiores MFCs, ocorreram nos substratos que possuíam as relações C:N maiores (Quadro 4, item 5.3.1). Segundo Sinch & Verma (1996), a relação C:N pode afetar a produção de *L.edodes*, sendo dependente da linhagem do cogumelo cultivado. Rossi (1999), constatou que relações C:N de 49:1 e 45:1, obtidas com proporções de 25 e 30% de farelo de arroz com bagaço de cana, proporcionaram produções mais altas. Entretanto, Tokimoto & Kawai (1975), relataram que a produção não foi afetada pela relação C:N.

A discordância entre os vários atores, sobre a relação C:N, sugere que a análise baseada apenas nesta relação, pode levar a conclusões discutíveis. Por tratar-se de uma relação, os valores de nitrogênio e carbono totais podem diferir, entretanto a relação C:N pode permanecer inalterada.

Quadro 14. Comparação estatística entre medianas da massa fresca de cogumelos ($\text{g } 1,2\text{kg}^{-1}$), pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, Dunn's e estatísticas, segundo linhagem e substrato.

Linhagens		Fórmula dos substratos			
		S20 ¹	S40	SB20	SB40
LE 96/17	Mediana	119,30^{Bb*}	106,8^{Ba}	174,2^{Aa}	83,5^{Ba}
	Interquartil**	56,7	111,0	50,1	53,5
	Média	116,7	119,5	164,5	88,8
	C.V. (%)	32,7	57,6	32,8	48,1
LE 98/51	Mediana	-	0^{Ab}	0^{Ac}	0^{Ab}
	Interquartil	-	0	3,1	17,4
	Média	-	6,2	8,1	19,0
	C.V. (%)	-	214,9	228,0	214,0
LE 98/53	Mediana	40,7^{Bc}	0^{Cb}	110,4^{Ab}	0^{Cb}
	Interquartil	63,4	0	71,7	0
	Média	45,3	4,4	106,1	9,1
	C.V. (%)	94,7	519,6	45,3	519,6
LE 98/56	Mediana	194,9^{Aa}	91,0^{Ba}	163,1^{Aa}	67,5^{Ba}
	Interquartil	75,3	58,6	48,9	99,6
	Média	178,7	99,2	160,9	86,6
	C.V. (%)	40,9	47,6	23,4	71,8

* Letras maiúsculas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Dunn's. Letras maiúsculas sublinhadas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis. Letras minúsculas: para cada substrato, linhagens representados pela mediana, seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Dunn's. ¹Os substratos S20, S40, SB20 e SB40 foram compostos pela mistura (base seca), respectivamente, de: 78% de serragem (sr), 10% de farelo de trigo (ft), 10% de farelo de arroz (fa) e 2% de carbonato de cálcio (cc); 58% de sr, 20% de ft, 20% de fa e 2% de cc; 58% de sr, 20% bagaço de cana de açúcar (bc), 10% de ft, 10% de fa e 2% de cc e 43% de sr, 15% bc, 20% de ft, 20% de fa e 2% de cc.

**Interquartil= percentil 75- percentil 25 (medida de variabilidade).

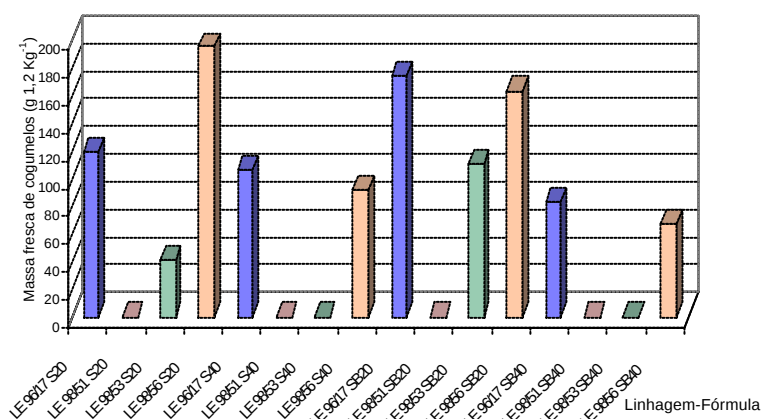


Figura 13. Produção de massa fresca de cogumelos entre quatro linhagens de *L. edodes* (LE 96/17, 98/51, 98/53e 98/56) e quatro substratos (S20, S40, SB20 e SB40) em cultivo axênico.

6.3.2. Eficiência Biológica (EB) em função das linhagens e substratos

Na avaliação da interação entre linhagens e substratos pela EB, as comparações estabelecidas entre linhagens e substratos foram idênticas às ocorridas no parâmetro massa fresca de cogumelos (item 6.3.1).

Os resultados evidenciaram que, as diferenças entre as linhagens (Nascimento et al., 2001) influenciaram significativamente na EB. A ocorrência de respostas diferenciadas em função das linhagens, também foi observada por Rinker (1991), que comparou diferentes técnicas para o cultivo de *L.edodes*. Triratana & Tantikanjana (1989) estudando a influência dos fatores ambientais na morfologia e produtividade desse cogumelo, verificaram que as respostas diferiram em função das linhagens. Savoie et al. (1995), afirmaram que a adaptação de fungos saprófitas ao substrato é definida pelo tipo e número de enzimas que atuam em reações catalíticas. Essas atividades são necessárias para a degradação do substrato e na competitividade do micélio, sendo a produção dessas enzimas induzida pelos derivados da lignina. A taxa de indução, necessária para obtenção de atividade máxima, varia entre linhagens distintas. As diferenças metabólicas entre linhagens de uma mesma espécie também podem causar variações na habilidade de utilização do nitrogênio (Kurtzman & Zadrzil, 1982).

Nas comparações entre substratos (Quadro 15, Figura 14), observou-se que as maiores EBs ocorreram com os substratos que possuíam as menores proporções de farelos (10% de farelos de arroz e de trigo), exceto para os substratos S20 e SB20 com as linhagens LE 96/17 e LE 98/51, respectivamente, pois não diferiram significativamente dos substratos com maiores proporções de farelos. Tanto a presença quanto a ausência do bagaço

sugerem que, provavelmente, a porcentagem de farelos na composição dos substratos foi o que exerceu maior influência na EB, pois apenas no substrato SB20 com a LE 96/17, ocorreu diferença significativa em comparação com os demais substratos.

Dessa forma, ficou evidente que a adição de farelos de arroz e de trigo na proporção de 10 %, resultou em boa produtividade, quando comparada, sob condições semelhantes, com as de outros pesquisadores. Rinker (1991), utilizando 10% de farelo de trigo e 10 % de painço na suplementação da serragem, obteve, na avaliação entre 10 diferentes linhagens, EBs entre 0,6% a 32,1%. Royse (1985), ao suplementar serragem com 20% de farelo de trigo, obteve EB de 62,4%, após 3 meses de colheita. Em trabalho subsequente, Royse et al. (1990) utilizando serragem adicionada de 10% de farelo de trigo e de painço, obteve EB de 41,2%, após 2 meses de colheita, semelhante à maior EB deste experimento. É importante salientar, que no presente experimento o período de colheita foi de apenas 14 dias, ou seja, aproximadamente 1/6 e 1/4 do período utilizado pelo autor, no primeiro e segundo ensaios, respectivamente. Ainda, em relação à EB, Kirchhoff & Lelley (1991) ao suplementarem serragem com 20 % de farelo de trigo, obtiveram EBs entre 43,2 a 54 %. Ho (1989), utilizando 10% de farelo de arroz na suplementação da serragem, obteve, em 3 colheitas, 43% de EB. Royse et al. (1985) e Ikegaya (1997) relataram EBs em torno de 130 a 145% em serragem com altas proporções de farelos e/ou grãos. Os valores de EB, relatados por estes autores, referem-se a várias colheitas. Entretanto, Przybylonicz & Donoghue (1990) observaram que, em produções comerciais, as EBs normalmente variam entre 50 a 80 %, obtidos entre 2 a 5 colheitas durante um período de 3 a 6 meses.

A boa produtividade das LE 96/17 e 98/56 quando comparada com as de outros pesquisadores e, por outro lado, o desempenho inferior das demais, sugerem a

necessidade da utilização de mais de uma linhagem, para comparação de diferentes substratos de cultivo.

Assim, ficou evidente que a adição de maiores proporções de farelos (20% de arroz e 20% de trigo), inibiu a produção de basidiocarpos. Este fato pode ser devido ao aumento do teor de nitrogênio, que é um fator limitante no crescimento miceliano de *L.edodes* (Boyle, 1998) entretanto, teores elevados causam uma diminuição do crescimento miceliano (Han et al., 1981; Song et al., 1987). A adição dos farelos objetivou, principalmente, o aumento dos níveis de nitrogênio e carboidratos disponíveis. Estes, aumentam a velocidade de colonização e a degradação do meio, reduzindo o tempo até a frutificação. O micélio aumenta a produção ao converter estes nutrientes em reservas para a frutificação. Porém, níveis muito altos de carboidratos resultam em um pequeno período de vida do micélio, resultando em micélio pouco denso que produzem cogumelos de baixa qualidade (Oei, 1991).

Quadro 15. Comparação estatística entre medianas da eficiência biológica (%), pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, Dunn's e estatísticas, segundo linhagem e substrato.

Linhagens		Fórmulas dos substratos			
		S20 ¹	S40	SB20	SB40
LE 96/17	Mediana	24,7^{Bb*}	20,4^{Ba}	33,3^{Aa}	16,0^{Ba}
	Interquartil**	11,7	21,2	9,6	10,3
	Média	24,1	22,8	31,4	17,0
	C.V. (%)	32,7	57,6	32,8	48,1
LE 98/51	Mediana	-	0^{Ab}	0^{Ac}	0^{Ab}
	Interquartil	-	0	0,6	3,3
	Média	-	1,2	1,6	3,6
	C.V. (%)	-	214,9	228,0	214,0
LE 98/53	Mediana	8,4^{Bc}	0^{Cb}	21,1^{Ab}	0^{Cb}
	Interquartil	13,1	0	13,7	0
	Média	9,4	0,8	20,3	1,7
	C.V. (%)	94,7	519,6	45,3	519,6
LE 98/56	Mediana	40,3^{Aa}	17,4^{Ba}	31,2^{Aa}	13,0^{Ba}
	Interquartil	15,6	11,2	9,3	19,1
	Média	37,0	18,9	30,8	16,6
	C.V. (%)	40,9	47,6	23,4	71,8

Letras maiúsculas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Dunn's. Letras maiúsculas sublinhadas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis. Letras minúsculas: para cada substrato, linhagens representados pela mediana, seguidas de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Dunn's. ¹Os substratos S20, S40, SB20 e SB40 foram compostos pela mistura (base seca), respectivamente, de: 78% de serragem (sr), 10% de farelo de trigo (ft), 10% de farelo de arroz (fa) e 2% de carbonato de cálcio (cc); 58% de sr, 20% de ft, 20% de fa e 2% de cc; 58% de sr, 20% bagaço de cana de açúcar (bc), 10% de ft, 10% de fa e 2% de cc e 43% de sr, 15% bc, 20% de ft, 20% de fa e 2% de cc.

**Interquartil= percentil 75- percentil 25 (medida de variabilidade).

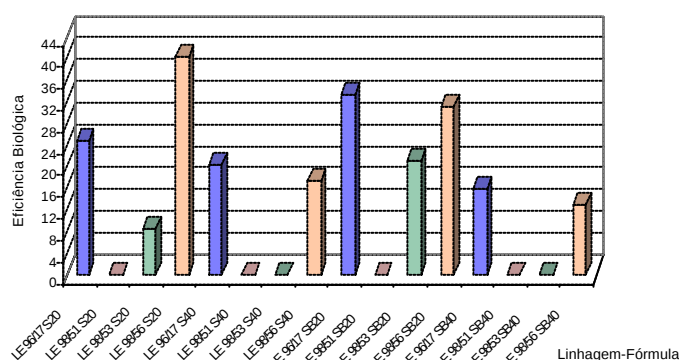


Figura 14. Eficiência biológica (%) entre quatro linhagens de *L. edodes* (LE 96/17, 98/51, 98/53 e 98/56) e quatro substratos (S20, S40, SB20 e SB40) em cultivo axênico.

6.3.3. Massa Fresca Média por Cogumelo (MFMC) em função das linhagens e substratos

Nas comparações entre linhagens (Quadro 16, Figura 15), a LE 98/53 apresentou a maior MFMC. Uma constatação interessante, é que, a menor EB (diferente de zero) também foi verificada com esta linhagem, no mesmo substrato. Royse et al. (1990) e Donoghue & Denison (1996) relatam que, de maneira geral, obtêm-se cogumelos com maior massa quando observadas EBs menores. Esta relação inversa, não foi verificada nas demais linhagens. Dentre as linhagens que apresentaram as maiores produtividades (EB), a LE 96/17 foi a que apresentou valores maiores de MFMC, quando comparada a LE 98/56, porém, no substrato SB40, não diferiram significativamente. Estes fatos sugerem que, a LE 96/17 produza cogumelos maiores. Entretanto, no cultivo em toras, Teixeira (2000) observou que a LE 96/17 produziu cogumelos pequeno e píleos de contexto fino. Diferenças entre linhagens na MFMC, foram verificadas por Han et al. (1981) na produção do *L. edodes* em serragem, e também, por Triratana & Tantikanjana (1989), na comparação entre diferentes temperaturas de frutificação. Os resultados evidenciaram que, as diferenças entre as linhagens (Nascimento, 2001) também influenciaram significativamente a MFMC.

Nas comparações entre substratos (Quadro 16, Figura 15), observou-se que as maiores MFMC, ocorreram nos substratos que possuíam as menores proporções de farelos (10% de arroz e 10% de trigo), sendo o inverso também verdadeiro. De forma semelhante, Royse (1996) verificou a queda de 50% na massa dos cogumelos, na primeira colheita, quando dobrou a proporção de 17 para 34% de painço no substrato.

Ainda, nas comparações entre substratos, observou-se que as maiores MFMC ocorreram nos substratos que possuíam as relações C:N (50:1 e 41:1) maiores (Quadro 4, item 5.3.1). Kalberer (2000), observou o aumento no tamanho do basidiocarpo e na espessura do contexto do píleo, quando aumentou a quantidade de N disponível no substrato de cultivo. Ainda, segundo este autor, a relação C:N ideal depende da disponibilidade e concentração das fontes de carbono e nitrogênio no substrato, da linhagem e das condições de cultivo. Entretanto, Rossi (1999) constatou que, relações C:N (49:1 e 45:1), obtidas com proporções de 25 e 30% de farelo de arroz com bagaço de cana, proporcionaram menor MFMC. Novamente, verifica-se a discordância entre os vários autores, sobre a relação C:N, sugerindo que a análise baseada apenas nesta relação, sem os valores de nitrogênio total e carbono total, pode levar a conclusões discutíveis.

Quadro 16. Comparação estatística entre medianas da massa fresca média por cogumelo (g), pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, Dunn's e estatísticas, segundo linhagem e substrato.

Linhagens		Fórmula dos substratos			
		S20 ¹	S40	SB20	SB40
LE 96/17	Mediana	9,7^{Ba}	8,7^{Ba}	13,3^{Aa}	5,5^{Ca}
	Interquartil**	3,0	3,6	4,7	2,1
	Média	10,2	8,9	14,0	6,0
	C.V. (%)	39,7	25,2	26,8	46,7
LE 98/51	Mediana	-	0^{Ab}	0^{Ac}	0^{Ab}
	Interquartil	-	0	1,1	10,9
	Média	-	3,5	2,4	5,3
	C.V. (%)	-	228,3	196,5	152,2
LE 98/53	Mediana	15,9^{Aa}	0^{Bb}	12,5^{Aab}	0^{Bc}
	Interquartil	21,8	0	7,0	0
	Média	13,8	0,5	13,8	0,3
	C.V. (%)	75,7	519,6	31,5	519,6
LE 98/56	Mediana	9,6^{Aa}	5,0^{Ba}	10,3^{Ab}	3,3^{Bab}
	Interquartil	3,0	0,9	4,8	2,1
	Média	10,0	5,2	10,8	3,9
	C.V. (%)	43,4	25,1	29,7	51,3

* Letras maiúsculas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Dunn's. Letras maiúsculas sublinhadas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis. Letras minúsculas: para cada substrato, linhagens representados pela mediana, seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Dunn's. Letras minúsculas sublinhadas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis. ¹Os substratos S20, S40, SB20 e SB40 foram compostos pela mistura (base seca), respectivamente, de: 78% de serragem (sr), 10% de farelo de trigo (ft), 10% de farelo de arroz (fa) e 2% de carbonato de cálcio (cc); 58% de sr, 20% de ft, 20% de fa e 2% de cc; 58% de sr, 20% bagaço de cana de açúcar (bc), 10% de ft, 10% de fa e 2% de cc e 43% de sr, 15% bc, 20% de ft, 20% de fa e 2% de cc.

**Interquartil= percentil 75- percentil 25 (medida de variabilidade).

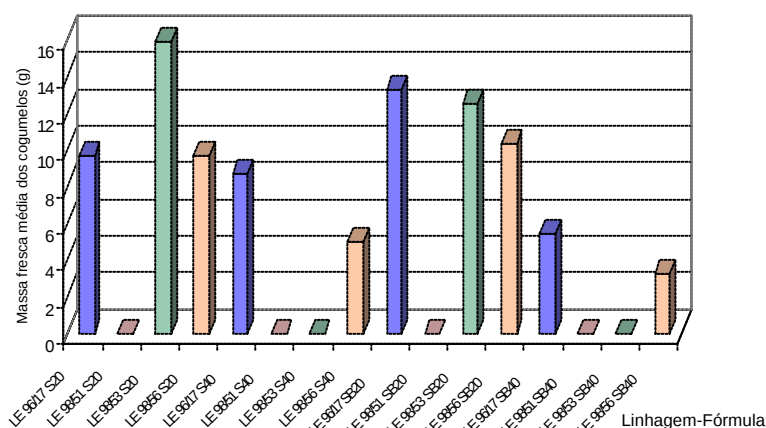


Figura 15. Massa fresca média por cogumelo, entre quatro linhagens de *L. edodes* (LE 96/17, 98/51, 98/53e 98/56) e quatro substratos (S20, S40, SB20 e SB40) em cultivo axênico.

6.3.4. Número de Cogumelos (NC) em função das linhagens e substratos

Nas comparações entre linhagens (Quadro 17, Figura 16), as LE 96/17 e 98/56 apresentaram maior NC. A linhagem LE 98/53, não diferiu significativamente da LE 96/17 no substrato SB20. O maior valor de NC foi verificado com a LE 98/56, a qual não diferiu significativamente da LE 96/17, ambas no substrato SB40.

Na comparação entre substratos, as diferenças nas medianas, das LE 96/17, 98/51 e 98/56, não foram significativas. Estes fatos sugerem que os substratos utilizados, para essas linhagens, provavelmente não influenciaram o NC. Apenas a linhagem LE 98/53 apresentou interação significativa com os substratos, tendo ocorrido seu maior valor no substrato SB20, com menores proporções de farelos (10% de arroz e 10% de trigo), seguido pelo S20. Rossi (1999), observou que as proporções de 25 e 30% de farelo de arroz em bagaço de cana, proporcionaram os maiores NCs. Porém, os substratos que possuíam maiores proporções de farelos (S40 e SB40), inibiram a produção de basidiocarpos e, consequentemente, o NC.

Quadro 17. Comparação estatística entre medianas do número de cogumelos, pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, Dunn's e estatísticas, segundo linhagem e substrato.

Linhagens		Fórmula dos substratos			
		S20	S40	SB20	SB40
LE 96/17	Mediana	13,0^{Ab*}	13,0^{Aa}	12,0^{Ab}	15,0^{Aa}
	Interquartil**	5,0	13,5	6,0	10,5
	Média	12,3	14,1	12,2	16,7
	C.V. (%)	35,0	59,0	37,5	49,9
LE 98/51	Mediana	-	0^{Ab}	0^{Ac}	0^{Ab}
	Interquartil	-	0,4	0,3	1,0
	Média	-	0	1,1	1,4
	C.V. (%)	-	237,9	264,3	246,1
LE 98/53	Mediana	2,0^{Ac}	0^{Bb}	7,0^{Ab}	0^{Bb}
	Interquartil	5,3	0	6,0	0
	Média	3,0	0,3	8,6	1,1
	C.V. (%)	119,2	519,6	60,	519,6
LE 98/56	Mediana	19,5^{Aa}	17,5^{Aa}	17,0^{Aa}	21,0^{Aa}
	Interquartil	11,3	13,3	10,0	48,0
	Média	19,1	19,5	16,5	31,4
	C.V. (%)	51,6	48,2	37,9	85,4

* Letras maiúsculas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Dunn's. Letras maiúsculas sublinhadas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis. Letras minúsculas: para cada substrato, linhagens representados pela mediana, seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Dunn's. ¹Os substratos S20, S40, SB20 e SB40 foram compostos pela mistura (base seca), respectivamente, de: 78% de serragem (sr), 10% de farelo de trigo (ft), 10% de farelo de arroz (fa) e 2% de carbonato de cálcio (cc); 58% de sr, 20% de ft, 20% de fa e 2% de cc; 58% de sr, 20% bagaço de cana de açúcar (bc), 10% de ft, 10% de fa e 2% de cc e 43% de sr, 15% bc, 20% de ft, 20% de fa e 2% de cc.

**Interquartil= percentil 75- percentil 25 (medida de variabilidade).

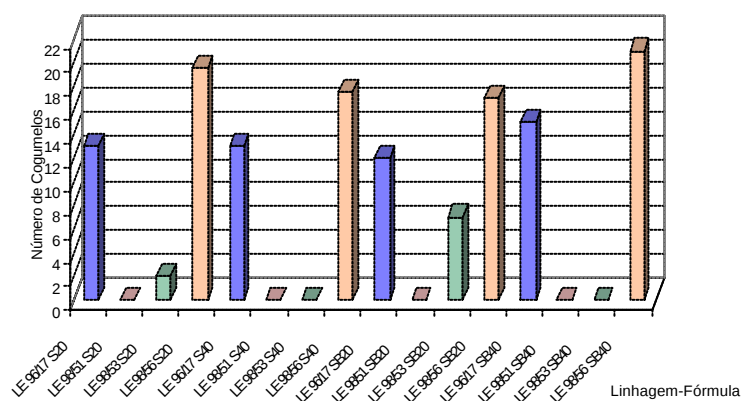


Figura 16. Número de cogumelos entre quatro linhagens de *L. edodes* (LE 96/17, 98/51, 98/53e 98/56) e quatro substratos (S20, S40, SB20 e SB40) em cultivo axênico.

6.3.5. Massa Seca (MS) em função das linhagens e substratos

O parâmetro MS (Quadro 18, Figura 17) apresentou comportamento semelhante à massa fresca de cogumelos, onde as maiores produções também apresentaram as maiores massas secas, sendo o inverso verdadeiro. Rossi (1999), observou, de maneira genérica, que à medida em que elevou-se a proporção de farelo no substrato, tendo como base bagaço de cana, a MSC dos cogumelos produzidos foi maior. Porém, as maiores proporções utilizadas por este autor resultaram em relação C:N de 49:1 e 45:1, próximas portanto, das relações dos substratos S20 (50:1) e SB20 (41:1). Baseado nas comparações entre os valores de MS, as maiores proporções de farelos (20% de arroz e 20% de trigo), também influenciaram negativamente a MSC. Eul & Schwantes (1984) citados por Kalberer (2000), relatam que relações C:N muito baixas impedem a frutificação.

Quadro 18. Comparação estatística entre medianas da massa seca dos cogumelos, pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, Dunn's e estatísticas, segundo linhagem e substrato.

Linhagens		Fórmula dos substratos			
		S20	S40	SB20	SB40
LE 96/17	Mediana	8,9^{Bb}	10,2^{Ba}	12,5^{Aab}	8,1^{Ba}
	Interquartil**	3,5	7,3	3,4	7,2
	Média	8,8	10,4	11,7	9,1
	C.V. (%)	30,8	52,5	32,2	54,0
LE 98/51	Mediana	-	0^{Ab}	0^A	0^{Ab}
	Interquartil	-	0	0,3	1,5
	Média	-	0,6	0,7	1,8
	C.V. (%)	-	216,3	230,7	212,8
LE 98/53	Mediana	3,2^{Bc}	0^{Cb}	9,4^{Ab}	0^{Cb}
	Interquartil	5,6	0	4,8	0
	Média	3,9	0,4	8,7	0,8
	C.V. (%)	96,9	519,6	44,1	519,6
LE 98/56	Mediana	17,9^{Ba}	8,6^{Aa}	13,2^{Ba}	5,6^{Aa}
	Interquartil	5,8	4,1	4,5	9,9
	Média	16,1	8,9	13,4	8,0
	C.V. (%)	38,9	53,0	23,9	78,1

* Letras maiúsculas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Dunn's. Letras maiúsculas sublinhadas: para cada linhagem, substratos representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente em nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis. Letras minúsculas: para cada substrato, linhagens representados pela mediana, seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Dunn's. ¹Os substratos S20, S40, SB20 e SB40 foram compostos pela mistura (base seca), respectivamente, de: 78% de serragem (sr), 10% de farelo de trigo (ft), 10% de farelo de arroz (fa) e 2% de carbonato de cálcio (cc); 58% de sr, 20% de ft, 20% de fa e 2% de cc; 58% de sr, 20% bagaço de cana de açúcar (bc), 10% de ft, 10% de fa e 2% de cc e 43% de sr, 15% bc, 20% de ft, 20% de fa e 2% de cc.

**Interquartil= percentil 75- percentil 25 (medida de variabilidade).

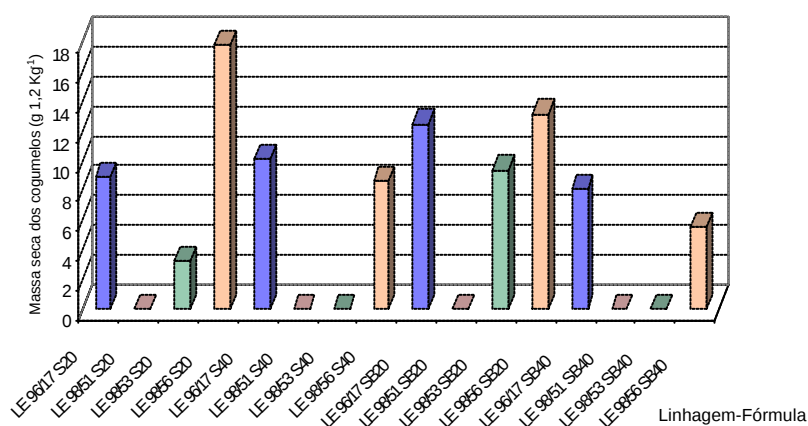


Figura 17. Massa seca dos cogumelos entre quatro linhagens de *L. edodes* (LE 96/17, 98/51, 98/53e 98/56) e quatro substratos (S20, S40, SB20 e SB40) em cultivo axênico.

7. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, nas condições experimentais deste trabalho, conclui-se que:

- ✓ A cinética de crescimento miceliano em superfície (área), independentemente das linhagens e substratos, tem como componente determinístico a exponencial de uma função Gompertz.
- ✓ O vigor das linhagens de *L. edodes*, determinado "in vitro" por análise de imagens digitalizadas, diminui a partir do quinto dia de incubação, independentemente das linhagens e meios de cultura.
- ✓ A velocidade de crescimento das linhagens de *L.edodes* foi menor em meios de cultura mais enriquecidos e o vigor maior e, o inverso foi verdadeiro.
- ✓ Houve diferença significativa de produtividade em função das linhagens de *L. edodes*.
- ✓ As maiores produções das linhagens LE 96/17, 98/53 e 98/56 foram obtidas com as menores proporções de farelos (10% de farelo de trigo e de arroz) com ou sem bagaço de cana de açúcar.

- ✓ As linhagens LE 96/17 e 98/56 apresentaram as maiores produções de basidiocarpos (174,2 e 145,2 g kg⁻¹, respectivamente) e as maiores EBs (40,3 e 33,3%, respectivamente) em apenas 14 dias de produção sendo, portanto, maiores que muitos relatos da literatura.
- ✓ Não houve correlação entre os estudos "in vitro" de velocidade de crescimento e vigor, com a produtividade em cultivo axênico

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS²

- ABE, E. *O binômio temperatura/tempo na pasteurização de composto para cultivo de *Pleorotus ostreatus* (Jacquim ex Fries) Kummer*. Botucatu, 1990. 30p. (Monografia apresentada ao Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas).
- ABE, E., EIRA, A. F., MINHONI, M. T. A. Relações entre temperatura de pasteurização e contaminações do composto durante o cultivo de *Pleorotus ostreatus* (Jacquim ex Fries) Kummer. *Científica (São Paulo)*, v.20, p.423-33, 1992.
- ABE, Y. Effect of moisture on the colonization by *Lentinus edodes* and *Hypoxylon truncatum* in wood. *Eur. J. For. Pathol.*, v.19, p.423-34, 1989.
- ALVES DE LIMA, P.L., DELMANTO, R.D., SUGUI, M.M., EIRA, A.F., SALVADORI, D.M.F., SPEIT, G., RIBEIRO, L.R. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (shiitake) modulates the mutagenic effects induced by alkylating agents in vivo. *Mutat. Res.*, 2001. (no prelo)
- ANDO, M. Fruit-body formation of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. On the artificial media. *Mushroom Sci.*, v.12, p. 415-22, 1974.

² UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Faculdade de Ciências Agrônomicas. Normas para a elaboração de dissertações e teses. Botucatu, 1997. 35p.

- ANDRADE, F.A. *Efeitos de fungos contaminantes na produção de shiitake (Lentinula edodes (Berk) Pegler) em toras de Eucalyptus saligna Sm.* Botucatu, 1999. 62p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.
- BADHAM, E.R. Influence of water potencial on grow of Shiitake mycelium. *Mycologia*, v. 81, p.464-8, 1989.
- BADHAM, E.R. Is Autoclaving Shiitake substrate necessary? *Mushroom Tropics.*, v. 8, p. 129-36, 1988.
- BANO, Z., RAJARATHNAM, S. *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 27, p.87-158, 1988.
- BONONI, V.L.R., CAPELARI, M., MAZIERO, TRUFEM, S.F.B R. *Cultivo de cogumelos comestíveis.* São Paulo: Icone, 1995. 206p.
- BONONI, V.L.R., TRUFEM, S.F.B. *Cogumelos comestíveis.* 3.ed. São Paulo: Icone, 1986. 86p.
- BOYLE, C. D. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. *Soil Biol. Biochem.*, v.30, p.817-23, 1998.
- BURGI, R. *Produção de cana de açúcar auto-hidrolisado e avaliação do seu teor nutritivo para ruminantes.* Piracicaba, 1985. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal e Pastagem) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BUSSELLI, M. *Tudo sobre fotografia.* 5.ed. São Paulo: Pioneira, 1990. 224p.

- CAPELARI, M. *Atividade biodegradadora e cultivo de três espécies comestíveis de basidiomicetos: Pleurotus spp e Agrocybe perfecta (Rick) Sing.* São Paulo, 1996. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- CELSO, P.G. *Interações entre Agaricus bisporus e microrganismos termófilos isolados do substrato de cultivo do cogumelo.* Araraquara, 1999. 84p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.
- CHANG, K.S.S. Antiviral and anti tumor activities induced by lenthinan and their possible mechanisms. *Int. J. Immunopharmacol.*, v. 4, n. 4, p. 267, 1982.
- CHANG, S.T. Cultivated mushrooms. In: ARORA, D.K., MUKERJI, K.G., MARTH, E.H. *Handbook of applied mycology.* New York: Marcel Dekker, 1991. v.3, p.221-40.
- CHANG, S.T., MILES, P.G. A new look at cultivated mushrooms. *Bioscience*, v.3, p.358-62, 1984.
- CHANG, S.T., MILES, P.G. *Edible mushrooms and their cultivation?* Florida: Boca Raton, 1989. p.189-223.
- CHIHARA, G. Antitumor and immunological properties of polysaccharides from fungal origin. *Mushroom Sci.*, v.9, p.797-814, 1978.
- CHIHARA, G., HAMURO, J., MAEDA, Y.Y., ARAI, Y., FUKUOKA, F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.*, v.30, p.2776-81, 1970.
- CHIHARA, G., HAMURO, J., MAEDA, Y.Y., SHIIO, T., SUGA, T., TAKASUKA, N., SASAKI, T. Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an

- immunomodulator: An overview. *Cancer Detect. Prev. Suppl.*, v.1, p.423-43, 1987.
- COCHRAN, K.W. Medical effects. In: CHANG, S. T., HAYES, W. A. *The biology and cultivation of edible mushroom*. New York: Academic Press, 1978. p.169-87.
- COLAUTO, N. B. *Efeito dos recipientes de contenção do substrato em termos de densidade, superfície, volume, massa e profundidade na produtividade de Pleurotus sajor-caju*. Botucatu, 1994. 93p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.
- DELPECH, P., OLIVIER, J.M. Cultivation of shiitake based pasteurised substrates. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 13, 1991, Dublin. *Proceedings...* Rotterdam: Balkema, 1991. p.523-8.
- DENNERT, G., TUCKER, D. Antitumor polysaccharide lentinan-a T cell adjuvant. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.51, p.1727-9, 1973.
- DIEHLE, D.A., ROYSE, D.J. Shiitake cultivation on sawdust: evaluation of selected genotypes for biological efficiency and mushroom size. *Mycologia*, v.78, p.929-33, 1986.
- DIEHLE, D.A., ROYSE, D.J. Effect of substrate heat treatment on biological efficiency (be) and size of a selected line of *Lentinula edodes*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 13, 1991, Dublin. *Proceedings...* Rotterdam: Balkema, 1991. p.517-21.
- DIX, J.N., WEBSTER, J. The mycelium and substrates for growth. In: *Fungal ecology*. London: Chapman & Hall, 1995. p.12-26.
- DONOGHUE, J.D., DENISON, W.C. Shiitake cultivation: gas phase during incubation influences productivity. *Mycologia*, v.87, n.2, p.239-44, 1995

- EIRA, A. F., MINHONI, M. T. A. *Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis*. 2.ed. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1997. 115p.
- EIRA, A.F., MONTINI, R.M.C. *Manual teórico prático de cultivo do cogumelo Shiitake*. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1997. 115p.
- EIRA, A.F., PINTO, A.V.F.S., FONTANARI, L.M., SANTOS, S.A., BARBISAN, A.L.T.S., LORENZO, J.S.F., FRANTZ, F.G., KANENO, R. Efeitos da temperatura de preparação, sobre ação antitumoral, de extratos de cogumelos comestíveis. In: WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DE BOTUCATU, 4, 2000, Botucatu. *Anais...Botucatu: Grupo de Estudos de Plantas Mediciniais UNESP, 2000. p.39.*
- EUL, J., SCHWANTES, H.O. Zum Einfluss der Stickstoffversorgung auf das fruktifikationsverhalten des basidiomyceten *Lentinus tigrinus*. *Angew. Bot.*, v.58, p.381-99, 1984.
- FONTANARI, L.M., FRANTZ, F.G., PINTO, A.V.F.S., LORENZO, J.S.F., BARBISAN, A.L.T.S., EIRA, A.F., KANENO, R. Efeito supressor do extrato aquoso de *Lentinus edodes* sobre a atividade linfoproliferativa de camundongos portadores de tumor de Ehrlich. In: WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DE BOTUCATU, 4, 2000, Botucatu. *Anais...Botucatu: Grupo de Estudos de Plantas Mediciniais UNESP, 2000. p.40.*
- FUJII, T., MAEDA, H., SUZUKI, F., ISHIDA, N. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS2, extracted from culture mycelia of *Lentinula edodes*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, v.31, n.1, p.1079-90, 1978.

GRIFFIN, D.H. Growth. In:_. *Fungal physiology*. 2. ed. New York: Wiley-Liss, 1994.

458p.

HAMURO, J., MAEDA, Y., FUKUOKA, F., CHIHARA, G. Antitumor polysaccharides, lentinan and pachymaran as immunopotentiators. *Mushroom Sci.*, v.9, p.477-87, 1976.

HAN, Y.H., YENG, W.T., CHEN, L.C., CHANG, S. Physiology and ecology of *Lentinus edodes* (Berk). *Mushroom Sci.*, v.11, p.623-58, 1981.

HARRIS, B. *Growing shiitake commercially*. 2. ed. Tennessee: Second Foundation, 1993.

71 p.

HO, M.S. A new technology "plastic bag cultivation method" for growing shiitake mushroom.

In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 12, 1989, Braunschweig. *Proceedings...* Rotterdam: Balkema, 1989. p.303-7.

IKEGAYA, N. Breeding. *Food Ver. Int.*, v. 13, p.335-43, 1997.

IMAZEKI, R. New dietetics, "mycophagism", a proposal of a fungous diet for a healthy and wholesome life. *Rep. Tottori Mycal. Inst.*, v.18, p.231-8, 1980.

ITÄVAARA, M. Problems associated with the liquid cultivation of shiitake, *Lentinula edodes*

(Berk.) Pegler. *Technical Research Centre of Finland*. v. 150, p.1-62, 1993.

JONG, S.C., BIRMINGHAM, J.M. Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom.

Adv.Appl. Microbiol., v. 39, p.153-84, 1993.

KALBERER, P.P. An investigation of the incubation phase of a shiitake (*Lentinus edodes*)

culture. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION

OF EDIBLE FUNGI, 14, 1995, Oxford. *Proceedings...* Rotterdam: Balkema, 1995. p.375-83.

KALBERER, P.P. Influence of urea and ammonium chloride on crop yield and fruit body size of shiitake (*Lentinula edodes*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 15, 2000, Netherlands. *Proceedings...* Rotterdam: Balkema, 2000. p.361-66.

KHAN, S.M., MIRZA, J.H., KHAN, M.A. Studies on shiitake mushrooms (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 13, 1991, Dublin. *Proceedings...* Rotterdam: Balkema, 1991. p.503-8.

KIRCHHOFF, B., LELLEY, J. Investigations of shiitake (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.) bag-log cultivation to increase the yield in germany. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 13, 1991, Dublin. *Proceedings...* Rotterdam: Balkema, 1991. p.509-16.

KLEIN, K. K. Pattern formation and development of the fungal mycelium. In: CHIU, S., MOORE, D. *Patterns ins fungal development*. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p.70-86.

KURTZMAN, J.R., ZADRAZIL, F. Physiological and taxonomic considerations for cultivation of Pleurotus mushrooms. In: CHANG, S.T., QUIMIO, T.H. *Tropical mushrooms: biological nature and cultivation methods*. Hong Kong: The Chinese University Press, 1982. 493p.

LABORATÓRIO NACIONAL de REFERENCIA VEGETAL (LANARV) Ministério da Agricultura. Análise de corretivos fertilizantes e inoculantes. Brasília, 1983. 104p.

- LEATHAM, G. F., STAHMANN, M. A. Effect of light and aeration on fruiting of *Lentinula edodes*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, v.88, n.1, p.9-20, 1987.
- LEATHAM, G.F. Growth and development of *Lentinus edodes* on a chemically defined medium. In: MOORE, D., CASSELTON, L.A., WOOD, D.A., FRANKLAND, J.S. *Developmental biology of higher fungi*. Cambridge: Cambridge Press, 1985. p.403-27.
- LEATHAM, G.F., GRIFFIN, T.J. Adapting liquid spawn *Lentinus edodes* to oak wood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.20, p.360-63, 1984.
- LEATHAM, G. F. Cultivation of shiitake, the Japanese forest mushroom, on logs: a potential industry for the United States. *For. Prod. J.*, v. 32, n.8, p. 29-35, 1982.
- LEVANON, D.; ROTHSCHILD, N., DANAI, O., MASAPHYS, S. Strain Selection For Cultivation of Shiitake Mushrooms (*Lentinus edodes*) on Straw. *Bioresour. Technol.*, v.45, n.1, p.9-12, 1993.
- MARINO, R.H. *Produtividade do Pleurotus sajor-caju (Fr.) Sing. Em função dos métodos de isolamento e produção de inoculantes*. Araraquara, 1997. 134p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.
- MATA, G., GAITÁN-HERNÁNDEZ, R. Avances en el cultivo del shiitake en pulpa de café. *Rev. Iberoamericana Micol.*, v.11, p.90-1, 1994.
- MATA, G., SAVOIE, J.M., DELPECH, P., OLIVIER, J.M. Reductions in the incidence of *Trichoderma* spp. using substrate supplementation with peat and an alternative spawn during cultivation of *Lentinula edodes* on pasteurised wheat straw. *Agric. Environ.*, v.18, p.515-20, 1998.
- MATA, G., SAVOIE, J.M.. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.14, p.513-9, 1998.

MILLER, M.W., JONG, S.C. Commercial cultivation of shiitake in sawdust filled plastic bags.

In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM SCIENTIFIC AND TECHNICAL ASPECTS OF CULTIVATING EDIBLE FUNGI, 1986, Pennsylvania. *Proceedings...* Amsterdam: Elsevier, 1986. p.421-6.

MIZUNO, T. *Antitumor activit and some properties of water-soluble polysacarides from “Himematsutake”, the fruiting body of Agaricus blazei Murill.* Japan: Agricultural and Biological Chemistry, 1990. 10 p.

MOLENA, O. *O moderno cultivo de cogumelos.* São Paulo: Nobel, 1986. 170p.

MONTINI, R.M.C. *Produtividade de shiitake (Lentinula edodes (Berk.) Pegler), no primeiro choque de indução, em função de características das toras do Eucalyptus saligna sm, Variáveis do ambiente e período de incubação.* Botucatu, 1997. 62p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

MORI, K. Cultivated mushrooms in Japan. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM SCIENTIFIC AND TECHNICAL ASPECTS OF CULTIVATING EDIBLE FUNGI, 1986, Pennsylvania. *Proceedings...* Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 455-61.

MOYSON, E., VERACHTERT, H. Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.36, p.421-4, 1991.

NANBA, H., MORI, K., TOYOMASU, T., KURODA, H. Antitumor action of shiitake (*Lentinus edodes*) fruit bodies orally administered to mice. *Chem. Pharm. Bull.(Tokyo)*, v.35, p.2453-8, 1986.

NASCIMENTO, J.S., MARINO, R.H., REGINA, M., KURAMAE, E.E., EIRA, A.F.

Caracterização molecular de linhagens do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.)

- Pegler). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, 2001, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001. P. 350.
- NUSSIO, L.G., BALSALOBRE, M.A.A. Utilização de resíduos fibrosos na industrialização da cana de açúcar na alimentação de bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 5, 1993, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: FEALQ, 1993. p.127-50.
- NUTALAYA, S., PATARAGETVIT, S. Shiitake mushroom cultivation in Thailand. *Mushroom Sci.*, v. 11, p.723-36, 1981.
- OEI, P. *Manual on mushroom cultivation*. Amsterdam: Tool Foundation, 1991. 247p.
- PANDEY, A., SOCCOL, C.R. NIGAM, P., SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresourse Technol.*, v.74, p.69-80, 2000b.
- PANDEY, A., SOCCOL, R.C., MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I - bioprocesses and products. *Process Biochem.*, v. 35, p.1153-69, 2000a.
- PEGLER, D.N. The genus *Lentinula* (*Tricholomataceae* tribe *Collybieae*). *Sydowia*, v. 36, p.227-39, 1983.
- PETTIPHER, G.L. Cultivation of the shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) on lignocellulosic waste. *J. Scie. Food Agric.*, v.42, p.195-8, 1988.
- PINTO, A.V.F.S., LORENZO, J.S.F., FRANTZ, F.G., FONTANARI, L.M., BARBISAN, A.L.T.S., KANENO, R. Ação de extratos de *Lentinus edodes* (shiitake) sobre a atividade "natural killer" de camundongos portadores do tumor de Ehrlich. In: WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DE BOTUCATU, 4, 2000, Botucatu. *Anais...Botucatu: Grupo de Estudos de Plantas Medicinais UNESP*, 2000. p.41.

- PROSSER, J. I.. Kinetics of filamentous growth and branching. In: GOW, A. R., GADD, G.M. *The growing fungus*. London: Chapman & Hall, 1994. p.301-35.
- PRZYBYLOWICZ, P., DONOGHUE, J. *Shiitake growers handbook: the art and science of mushroom cultivation*. Dubuque: Kendall, 1990. 217p.
- QUIMIO, T.H., CHANG, S.T., ROYSE, D.J. *Technical guidelines for mushroom growing in the tropics*. Rome: FAO, 1990. 155 p.
- RAASKA, L. The growth of shiitake (*Lentinula edodes*) mycelium on alder (*Alnus incana*) and birch (*Betula pendula*) wood logs. *Mater. Org. (Berl.)*, v.1, p. 1 - 9, 1992.
- RAJARATHNAM, S., BANO, Z. Pleurotus mushrooms. 3. biotransformations of natural lignocellulosic wastes: commercial applications and implications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.28, p.31-113, 1989.
- RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. Pleurotus mushrooms, 1. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding and cultivation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 26, p. 157-223, 1987.
- RATKOWSKY, D.A. *Handbook of nonlinear regression models*. New York: Marcel Decker, 1990.
- REGINA, M. *Cinética do crescimento miceliano de Lentinula edodes (Berk.) Pegler em bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto*. Botucatu, 2001. 87p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.
- RIGAU, A. *Cultivo de cogumelos e trufas*. Lisboa: Presença, 1980. 140p.
- RINKER, D. L. The influence of heat treatment, genotype and other cultural practices on the production of shiitake mushrooms on sawdust. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON

- THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 13, 1991, Dublin.
- Proceedings...* Rotterdam: Balkema, 1991. p.497-502.
- ROSSI, I.R. *Suplementação de bagaço de cana-de-açúcar para cultivo axênico do cogumelo shiitake [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]*. Jaboticabal, 1999. 129p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- ROYSE D.J. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom. *Mycologia*, v.77, p756-62, 1985.
- ROYSE, D.J., BAHLER, C.C. Effects of genotype, spawn run time and substrate formulation on biological efficiency of shiitake. *Appl.Environ. Microbiol.*, v.52, p.1425-7, 1986.
- ROYSE, D.J.; BAHLER, B.D., BAHLER, C.C. Enhanced yield of shiitake by saccharide amendment of the synthetic substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p.479-82, 1990.
- SAN ANTONIO J.P. Cultivation of the Shiitake mushroom. *Hortic. Sci.*, v.16, p.151-6, 1981.
- SAN ANTONIO, J.P., HANNERS, P.K. Spawn disk inoculation of logs to produce mushrooms. *Horti. Sci.*, v.18, p.708-10, 1983.
- SANT'ANNA, A. *Cultivo do cogumelo shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler em serragem e em toras de eucalipto*. Rio Claro, 1998. 162p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/ Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.
- SAVOIE, J.M., CESBRON, V., DELPECH, P. P.P. Induction of polyphenol-oxidases in the mycelium of *Lentinula edodes*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE

- AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 14, 1995, Oxford. *Proceedings...* Rotterdam: Balkema, 1995. p.787-93.
- SENDO, F., SEIJI, K., FUYAMA, S., WATANABE, S., ARAI, S. Augmentation of natural cell-mediated cytotoxicity by administration of Lentinan in mice. In: AOKI, T. *Manipulation of host defense mechanisms*. Amsterdam: *Excerpta Medica*, 1981. p.178-87. (International Congress Series 576).
- SHUEN, S.K., BUSWELL, J.A. Effect of lignin derived phenols and their methylated derivatives on the growth of *Lentinus* spp. *Appl. Microbiol.*, v.15, p.12-4, 1992.
- SINGH, T.G., VERMA, R.N. Studies on carbon and nitrogen of *Lentinula lateritia* (Berk.) Pegler strains from northeastern India. In: INTERNATIONAL CONFERENCE MUSHROOM BIOLOGY AND MUSHROOM PRODUCTS, 1996, Pennsylvania. *Proceedings...* Pennsylvania, 1996. p.345-54.
- SONG, C.H., CHO, K.Y., NAIR, N.G. A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. *Mycologia*, v.79, p.866-76, 1987.
- SONG, C.H., NAIR, N.G., CHO, K.Y. A Growth stimulation and lipid synthesis in *Lentinus edodes*. *Mycologia*, v.81, p.514-22, 1989.
- SONG, C.H.. Growth stimulation and lipid synthesis in *Lentinus edodes*. *Mycologia*, v.81, p.514-22, 1989.
- STAMETS, P., CHILTON, J.S. *The mushroom cultivator a practical guide to growing mushrooms at home*. Washington: Agarikon Press, 1983, 415p.
- STANIER, R.Y., DOUDOROFF, M., ADELBERG, E. A. *O mundo dos micróbios*. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1969. 741p.

- STRAATAMA, G. Population dynamics of *Scytalidium thermophilum* in mushroom compost and stimulatory effects on growth rate and yield of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.*, n.135, p.751-9, 1989.
- SUZUKI, S., OHSHIMA, S. Influence of shii-ta-ke (*Lentinus edodes*) on human serum cholesterol. *Mushroom Sci.*, v.9, p. 463 - 7, 1974.
- TAN, Y.H., CHANG, S.T. Effect of growth regulators, enzyme inhibitors and stimulatory additives on the vegetative development and frutification of *Lentinus edodes*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 12, 1987, Braunschweig. *Proceedings...* Rotterdam: Balkema, 1989. p.267-77.
- TAN, Y.H., MOORE, D. Convenient and effective methods for in vitro cultivation of mycelium and fruiting bodies of *Lentinus edodes*. *Mycol. Res.*, v.96, p.1077-84, 1992.
- TEIXEIRA, E.M. *Caracterização izoenzimática e molecular de Lentinula edodes e avaliação da produção em função da espécie de eucalipto e clima*. Araraquara, 2000. 123p. Tese (Doutorado em Biotecnologia/ Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.
- TEIXEIRA, E.M., MACHADO, J.O. *O cultivo do cogumelo shiitake em cepos*. Jaboticabal: FUNEP, 1997. 61p.
- TOKIMOTO, K. KAWAI, A. Nutritional aspects on fruit-body development in replacement culture of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Rep. Tottori Mycol. Inst.*, v.12, p.25-30, 1975.
- TRIRATANA, S., TANTIKANJANA, T. Effects of some enviromental factors on morfology and yield of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM SCIENTIFIC AND TECHNICAL ASPECTS OF CULTIVATING EDIBLE FUNGI, 1986, Pennsylvania. *Proceedings...* Amsterdam: Elsevier, 1987. p.455-61.

- VAN, H., COTTER, T, FLYNN, T. Evaluation of Shiitake log inoculation techniques. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 12, 1989, Braunschweig. *Proceedings...* Rotterdam: Balkema, 1989. p. 293-301.
- WANG, H.Z., ZHANG, C.K. Humidity control for cultivation of *Lentinus edodes* in cave. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MUSHROOM BIOLOGY AND MUSHROOM PRODUCTS, 1, 1993, Hong Kong. *Proceedings...* UNESCO/MIRCENS, 1993. p.120.
- WORRAL, J. J., YANG, C. S. Shiitake and oyster mushroom production on apple pomace and sawdust. *HortScience*, v.27, p.1131-3, 1992.
- YAMAMURA, Y., COCHRAN, K.W. Chronic hypocholesterolemic effect of *Lentinus edodes* in mice and absence of effect on scrapie. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 9, 1974. *Proceedings...* Rotterdam: Balkema, 1974. p.489-93.
- ZAR, J.H. *Bioestatistical Analysis*. 3.ed. New Jersey: Pretice Hall, 1996. 718p.

APÊNDICE

Para efeito ilustrativo, as figuras a seguir mostram os estágios de crescimento do *L. edodes* nos blocos de substratos, durante a produção em câmara de cultivo com controle ambiental.

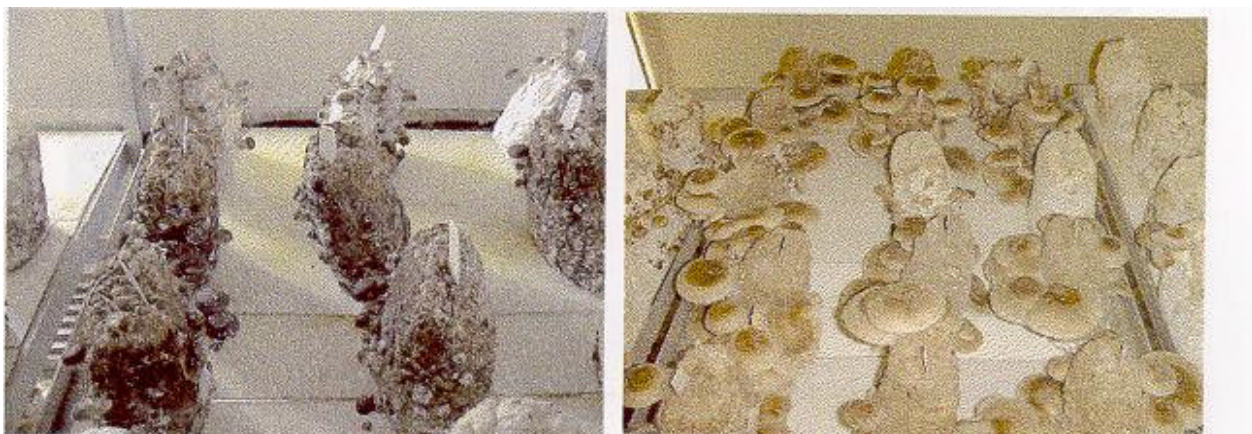


Figura 18- Formação dos primórdios de *L. edodes* (à esquerda) e blocos em fase de frutificação (à direita).



Figura 19-Formação de basidiocarpos de *L. edodes* (à esquerda linhagem LE 98/56 e à direita linhagem LE 96/51)

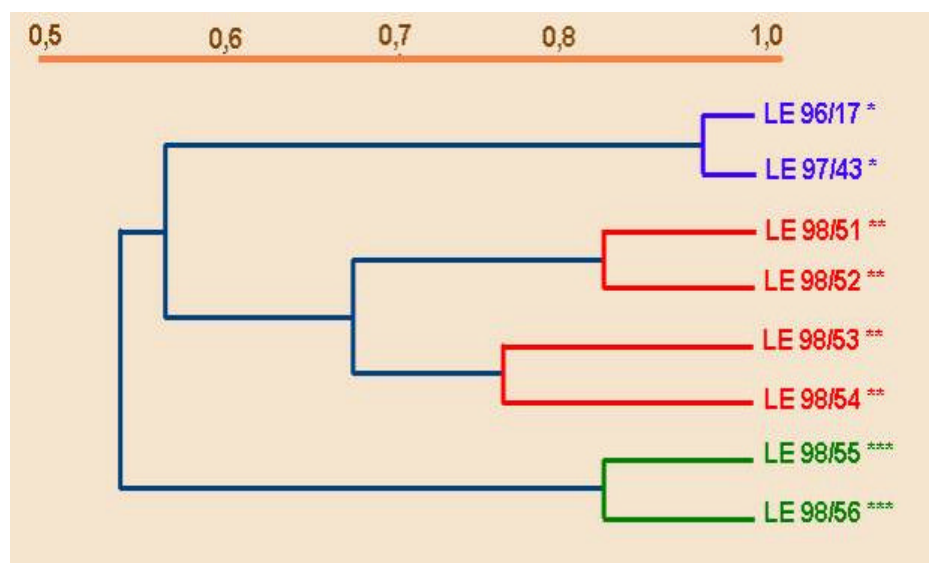


Figura 20-Formação de basidiocarpos de *L. edodes* (à esquerda linhagem LE 98/53 e à direita linhagem LE 96/17)



Figura 21- Vista interior da câmara de cultivo com controle ambiental.

Figura 22- Dendograma gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no Coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD com os primers OPA13, OPB10, OPG02 e OPX07, em análises dos isolados de *Lentinula edodes*. Os isolados foram divididos em quatro grupos principais (*). A escala no topo, representa a porcentagem de similaridade.



Quadro 19- Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano da linhagem LE 96/17 nos meios de cultura SDA-20, SDA-40, SBDA-20 e SBDA-40 ($\text{mm}^2 \text{dia}^{-1}$).

Dias	SDA-20 e SBDA-20*	SDA-40 e SBDA-40*
1	41,13	29,17
2	83,29	60,60
3	153,62	115,19
4	255,65	197,79
5	383,58	305,77
6	521,60	427,13
7	648,57	543,50
8	745,32	636,61
9	800,33	694,14

*Tratamentos que não apresentaram diferença estatística, em nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Quadro 20- Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano da linhagem LE 98/51 nos meios de cultura SDA-20, SDA-40, SBDA-20 e SBDA-40 ($\text{mm}^2 \text{dia}^{-1}$).

Dias	SDA-20	SDA-40	SBDA-20 e SBDA-40*
1	45,19	30,55	35,72
2	88,25	61,34	71,21
3	158,63	114,25	130,75
4	260,38	195,19	218,89
5	389,81	304,57	333,29
6	534,21	434,65	462,98
7	674,79	570,30	590,74
8	792,38	693,26	698,46
9	872,89	787,63	772,56

*Tratamentos que não apresentaram diferença estatística, em nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Quadro 21- Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano da linhagem LE 98/53 nos meios de cultura SDA-20, SDA-40, SBDA-20 e SBDA-40 ($\text{mm}^2 \text{dia}^{-1}$).

Dias	SDA-20 e SBDA-20*	SDA-40 e SBDA-40*
1	34,31	33,03
2	72,16	67,26
3	137,68	124,36
4	235,52	206,70
5	360,49	308,50
6	496,35	415,85
7	620,78	511,16
8	713,61	579,56
9	763,29	613,32

*Tratamentos que não apresentaram diferença estatística, em nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Quadro 22- Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano da linhagem LE 98/56 nos meios de cultura SDA-20, SDA-40, SBDA-20 e SBDA-40 ($\text{mm}^2 \text{dia}^{-1}$).

Dias	SDA-20, SDA-40 e SBDA-40*	SBDA-20
1	35,30	36,35
2	68,19	75,99
3	122,08	143,96
4	200,76	244,43
5	302,55	371,42
6	418,84	508,02
7	535,68	631,68
8	637,72	722,54
9	712,64	769,66

*Tratamentos que não apresentaram diferença estatística, em nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Quadro 23- Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano das linhagens LE 96/17, LE 98/51, LE 98/53 e LE 98/56 em meio de cultura SDA-20 ($\text{mm}^2 \text{dia}^{-1}$).

Dias	LE 96/17	LE 98/51	LE 98/53	LE 98/56
1	42,62	45,19	33,90	38,52
2	87,38	88,25	71,49	75,98
3	162,37	158,63	136,94	138,30
4	270,89	260,38	235,39	230,16
5	405,68	389,81	362,23	349,40
6	548,66	534,21	501,53	485,28
7	676,75	674,79	630,70	620,54
8	770,13	792,38	728,83	736,69
9	818,11	872,89	783,39	819,32

Quadro 24- Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano das linhagens LE 96/17, LE 98/51, LE 98/53 e LE 98/56 em meio de cultura SDA-40 ($\text{mm}^2 \text{dia}^{-1}$).

Dias	LE 96/17	LE 98/51	LE 98/53	LE 98/56
1	28,66	30,55	33,19	35,69
2	59,19	61,34	67,62	67,44
3	112,08	114,25	124,98	118,28
4	192,18	195,19	207,46	191,04
5	297,31	304,57	309,03	283,62
6	416,33	434,65	415,51	388,00
7	531,76	570,30	509,31	491,84
8	625,76	693,26	575,76	581,90
9	685,87	787,63	607,49	647,69

Quadro 25- Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano das linhagens LE 96/17, LE 98/51, LE 98/53 e LE 98/56 em meio de cultura SBDA-20 ($\text{mm}^2 \text{dia}^{-1}$).

Dias	LE 96/17 e 98/51*	LE 98/53 e 98/56*
1	38,40	35,53
2	76,53	74,41
3	140,02	141,19
4	232,99	240,04
5	351,91	365,09
6	484,36	499,60
7	611,97	621,26
8	716,38	710,46
9	784,69	756,44

*Linhagens que não apresentaram diferença estatística, em nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Quadro 26- Velocidade instantânea estimada do crescimento miceliano das linhagens LE 96/17, LE 98/51, LE 98/53 e LE 98/56 em meio de cultura SBDA-40 ($\text{mm}^2 \text{dia}^{-1}$).

Dias	LE 96/17	LE 98/51	LE 98/53	LE 98/56
1	29,68	34,25	32,87	31,67
2	62,01	68,53	66,89	61,09
3	118,30	126,30	123,74	109,58
4	203,41	212,23	205,93	181,07
5	314,25	324,27	307,98	274,73
6	437,93	451,82	416,18	383,42
7	555,23	577,93	513,01	494,75
8	647,45	684,65	583,37	594,42
9	702,49	758,42	619,18	670,33

Quadro 27- Valores médios com os respectivos intervalos de confiança à 95% da tonalidade do micélio (vigor), em escala de cinza, do crescimento miceliano da linhagem LE 96/17 em função dos meios de cultura (sendo o valor 0 referente à cor preta e o 255 à cor branca).

Dias	SDA-20	IC _{μ95%}
1	132,71	7,70
2	139,86	3,88
3	160,71	5,68
4	177,71	4,22
5	182,29	1,29
6	175,57	1,07
7	167,71	2,48
8	153,86	0,70
9	144,57	1,29

Quadro 28- Valores médios com os respectivos intervalos de confiança à 95% da tonalidade do micélio (vigor), em escala de cinza, do crescimento miceliano da LE 98/51 em função dos meios de cultura (sendo o valor 0 referente à cor preta e o 255 à cor branca).

Dias	SDA-40	IC _{μ95%}
1	88,86	3,86
2	146,71	4,51
3	173,57	5,85
4	195,00	3,29
5	204,71	1,49
6	191,86	1,52
7	178,86	0,80
8	166,43	1,02
9	154,43	1,43

Quadro 29- Valores médios com os respectivos intervalos de confiança à 95% da tonalidade do micélio (vigor), em escala de cinza, do crescimento miceliano da LE 98/53 em função dos meios de cultura (sendo o valor 0 referente à cor preta e o 255 à cor branca).

Dias	SBDA-20	IC _{μ95%}
1	122,86	6,70
2	156,86	5,87
3	178,00	7,26
4	187,29	8,28
5	193,86	1,28
6	183,86	1,03
7	171,86	2,28
8	158,57	0,69
9	149,57	0,84

Quadro 30- Valores médios com os respectivos intervalos de confiança à 95% da tonalidade do micélio (vigor), em escala de cinza, do crescimento miceliano da LE 98/56 em função dos meios de cultura (sendo o valor 0 referente à cor preta e o 255 à cor branca).

Dias	SBDA-40	IC _{μ95%}
1	99,43	4,72
2	151,86	4,05
3	173,43	3,03
4	202,43	1,56
5	202,57	1,82
6	193,43	0,78
7	178,57	0,95
8	165,00	0,76
9	155,29	0,71