

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

Giulia Morceli

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE INÓCULO NO
CULTIVO DO COGUMELO *AGARICUS SUBRUFESCENS***

Dracena

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

Giulia Morceli

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE INÓCULO NO
CULTIVO DO COGUMELO *AGARICUS SUBRUFESCENS***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Câmpus de Dracena como parte das exigências para graduação em Engenharia Agrônômica.

Orientador: Prof. Dr. Diego Cunha Zied

Dracena

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
UNESP – CÂMPUS DE DRACENA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "Otimização do processo de produção de inóculo no cultivo do cogumelo *Agaricus subrufescens*".

Modalidade: Trabalho de **atividades de pesquisa**.

Autor: Giulia Morceli.

Orientador (a): Prof. Dr. Diego Cunha Zied.

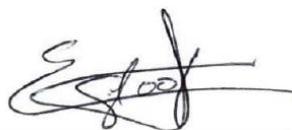
Co-orientador(es):

Número de Créditos: 12

Data da aprovação e correção de acordo com as sugestões da Banca: 06/12/2021



Prof. Dr. Diego Cunha
Zied



Prof. Dr. Etiénne Groot



Ma. Cinthia Elen Cardoso
Caitano

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e à minha irmã, pelos conselhos e todos os esforços diários que me permitiram acreditar e seguir em busca dessa realização.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcos e Soraia, pela dedicação, carinho e apoio que oferece continuamente à família,

À minha irmã gêmea e também unespiana, Beatrice, pelo companheirismo e afeto que temos, e por todos os esforços para se fazer presente durante todos os nossos dias,

Aos meus queridos amigos e colegas de grupo, que fazem parte dessa história, pela companhia e conselhos durante todos os anos da minha graduação,

Ao meu professor e orientador Dr. Diego Cunha Zied, quem me apoiou e me fez descobrir e aprender cada vez mais sobre a Micologia e seus encantos, e por todo conhecimento compartilhado desde o momento que iniciei meus estudos na universidade,

Ao professor Dr. Etiénne Groot, pela dedicação em transmitir seus conhecimentos durante todos esses anos,

À Ma. Cinthia Elen Cardoso Caitano, pelo auxílio durante a condução dos meus experimentos e pela disposição em compartilhar seus aprendizados,

Aos docentes da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena, por fazerem parte da minha caminhada durante esses 5 anos de graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, por ter concedido a bolsa de estudos ao projeto (Processo 2019/19797-2), apoiando sua condução durante todas as suas fases.

RESUMO

O *Agaricus subrufescens*, de origem brasileira, vem sendo relatado como produto com propriedades medicinais, utilizado como complemento alimentar. Devido a escassez de informações e relatos técnico-científicos sobre o processo de produção de inóculo, a presente pesquisa teve como objetivo conhecer as técnicas de inoculação de *Agaricus subrufescens*, de forma a enfatizar este processo, realizado por laboratórios comerciais, os quais as tecnologias envolvidas são minimamente divulgadas atualmente. Dessa maneira avaliou-se durante dois períodos experimentais todo o sistema produtivo, partindo da utilização da linhagem ABL 04/49, isolada em São José do Rio Preto, específica para a produção de cogumelos. O inóculo foi produzido no Centro de Estudos de Cogumelos da Unesp de Dracena, CECOG, sendo confeccionado a base de grãos de sorgo. O experimento constou de um fatorial duplo, sendo aplicadas durante o primeiro período do experimento 4 doses de gesso (0, 1, 2 e 4 %) e 3 doses de carbonato de cálcio (0,5, 1 e 2%), totalizando 12 tratamentos, cada um com 7 repetições. Para o segundo período, utilizou-se 3 doses de gesso (0, 1, 2%) e 4 doses de carbonato de cálcio (0, 1, 2 e 3%), totalizando 12 tratamentos, cada um com 6 repetições, de forma a reavaliar e comparar com os dados obtidos. As variáveis de produtividade (%), massa média (g) e número de cogumelos (unid), foram submetidos à análise de variância, através do programa estatístico Sisvar®, utilizando o teste T sob o nível de 5% de probabilidade. Diante dos resultados, os tratamentos aplicados aos inóculos apresentaram respostas positivas diante das variáveis estudadas, sendo que as doses de 0 a 2% de gesso em associação às doses de 1 a 3% de carbonato de cálcio são indicadas para obtenção de maior produtividade e número de basidiomas. Para a obtenção de maiores resultados de massa média dos basidiomas, as doses entre 0 e 2% de gesso com 1% de carbonato são indicadas para o cultivo do Cogumelo do Sol.

Palavras-chave: Cogumelo do sol. Produção de inóculos. Tecnologia de cultivo. Carbonato de cálcio. Gesso agrícola.

ABSTRACT

Agaricus subrufescens, of natural Brazilian origin, has been reported as a product with medicinal properties, used as a food supplement. Due to the scarcity of information and technical-scientific reports on the spawn production process, this research aimed to know the inoculation techniques of *Agaricus subrufescens*, in order to emphasize this process, carried out by commercial laboratories, which the technologies involved are currently minimally disclosed. Thus, the entire production system was evaluated during two experimental periods, starting from the use of the ABL 04/49 lineage, isolated in São José do Rio Preto, specific for the production of mushrooms. The spawn was produced at the Mushroom Study Center of Unesp in Dracena, CECOG, made from sorghum grains. The experiment consisted of a double factorial, being applied during the first period of the experiment 4 doses of gypsum (0, 1, 2 and 4%) and 3 doses of calcium carbonate (0.5, 1 and 2%), totaling 12 treatments, each with 7 repetitions. For the second period, 3 doses of gypsum (0, 1, 2%) and 4 doses of calcium carbonate (0, 1, 2 and 3%) were used, totaling 12 treatments, each with 6 repetitions, so to reassess and compare with the data obtained. The variables of productivity (%), average mass (g) and number of mushrooms (unit) were submitted to analysis of variance, through the statistical program Sisvar®, using the T test under the level of 5% probability. In view of the results, the treatments applied to the spawn showed positive responses to the variables studied, and the doses of 0 to 2% of gypsum in association with the doses of 1 to 3% of calcium carbonate are indicated to obtain greater productivity and number of basidiomas. In order to obtain greater results for the average mass of the basidiomas, doses between 0 and 2% of gypsum with 1% of carbonate are indicated for the cultivation of almond mushroom.

Keywords: Almond mushroom. Spawn production. Cultivation technology. Calcium carbonate. Gypsum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Meio de cultura CA antes de receber o fragmento do basidioma.....	15
Figura 2. Desenvolvimento do micélio após três e nove dias (A e B) da inoculação do meio de cultura, respectivamente. Fonte: elaborado pela autora.	16
Figura 3. Frasco contendo os grãos de sorgo (matriz terciária) após decorridos 15 dias da inoculação.....	17
Figura 4. Grãos de sorgo após o cozimento.	20
Figura 5. Grãos de sorgo em sacos plásticos após decorrido o período de colonização pelo micélio fúngico.	21
Figura 6. Substrato sendo alocado nas caixas (A) e adição do inóculo ao substrato (B). Erro! Indicador não definido. 22	
Figura 7. Caixa contendo o composto colonizado (A) e após a adição da camada de cobertura (B).	23
Figura 8. Basidiomas em ponto ideal de colheita.....	24
Figura 9. Avaliação da massa média e número de cogumelos em balança digital.	25
Figura 10. Cogumelos após lavagem (A), corte (B) e desidratação (C).....	26
Figura 11. Fluxograma do projeto de pesquisa contendo as principais etapas realizadas...	28
Figura 12. Produtividade (%) entre o primeiro (A) e segundo (B) períodos em função dos tratamentos aplicados com as variações nas doses de carbonato de cálcio (%) e gesso (%).	31
Figura 13. Representação através da análise de regressão entre os valores de produtividade a 0% de carbonato de cálcio (y) em função da variação das doses aplicadas de gesso, no tratamento do inóculo de <i>A. subrufescens</i> . Fonte: Dados da pesquisa.	32
Figura 14. Representação através da análise de regressão entre os valores de produtividade a 1% de carbonato de cálcio (y) em função da variação das doses aplicadas de gesso, no tratamento do inóculo de <i>A. subrufescens</i>	33
Figura 15. Representação através da análise de regressão entre os valores de produtividade a 3% de carbonato de cálcio (y) em função da variação das doses aplicadas de gesso, no tratamento do inóculo de <i>A. subrufescens</i>	34
Figura 16. Número de basidiomas (unid) entre o primeiro (A) e segundo (B) períodos em função dos tratamentos aplicados com as variações nas doses de carbonato de cálcio (%) e gesso (%).	37
Figura 17. Massa média de basidiomas (g) entre o primeiro (A) e segundo (B) períodos em função dos tratamentos aplicados com as variações nas doses de carbonato de cálcio (%) e gesso (%).	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulações utilizadas para a produção do inóculo durante o primeiro período experimental.....	18
Tabela 2. Formulações utilizadas para a produção do inóculo durante o segundo período experimental.....	19
Tabela 3. Produtividade (%) de <i>A. subrufescens</i> sob diferentes doses de Gesso e Carbonato de cálcio aplicadas ao inóculo durante primeira repetição experimental.	29
Tabela 4. Produtividade (%) de <i>A. subrufescens</i> sob diferentes doses de Gesso e Carbonato de cálcio aplicadas ao inóculo durante segunda repetição experimental.	30
Tabela 5. Número de basidiomas (unid) de <i>A. subrufescens</i> sob diferentes doses de gesso e carbonato de cálcio aplicadas ao inóculo durante primeira repetição experimental.	35
Tabela 6. Número de basidiomas (unid) de <i>A. subrufescens</i> sob diferentes doses de gesso e carbonato de cálcio aplicadas ao inóculo durante segunda repetição experimental.	36
Tabela 7. Massa média (g) de <i>A. subrufescens</i> sob diferentes doses de gesso e carbonato de cálcio aplicadas ao inóculo durante primeira repetição experimental.	38
Tabela 8. Massa média (g) de <i>A. subrufescens</i> sob diferentes doses de gesso e carbonato de cálcio aplicadas ao inóculo durante segunda repetição experimental.	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo Geral	11
2.2. Objetivos Específicos.....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1. <i>Agaricus subrufescens</i>	11
3.2. Cultivo de <i>Agaricus subrufescens</i>	12
3.3. Produção de inóculo	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1. Linhagem	14
4.2. Produção do Micélio	14
4.3. Matriz Primária	14
4.4. Matriz Secundária	16
4.5. Matriz Terciária	16
4.6. <i>Spawn</i>	17
4.7. Preparo do substrato de cultivo	21
4.8. Inoculação e corrida do micélio.....	21
4.9. Camada de Cobertura	22
4.10.Cultivo.....	23
4.11.Colheita dos basidiomas.....	24
4.12.Variáveis analisadas.....	26
4.13.Desenho experimental.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
5.1. Produtividade	29

5.2. Número de basidiomas	35
5.3. Massa média de basidiomas.....	38
6. CONCLUSÃO	41
7. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

O cogumelo *Agaricus subrufescens*, sinônimo de *Agaricus blazei* e *Agaricus brasiliensis* é conhecido popularmente como Cogumelo do Sol[®] ou cogumelo medicinal, sendo de origem brasileira, o que facilita o cultivo em condições de clima tropical, podendo ser uma excelente alternativa de renda ao pequeno produtor brasileiro (FIRENZUOLI *et al.* 2008).

Ademais de uma fonte de renda alternativa os cogumelos se destacam por possuírem elevada atividade metabólica e bioconversão, o que permite serem cultivados em diversos resíduos agroindustriais, em pequenos espaços físicos, num curto período de tempo, durante praticamente o ano todo, proporcionando um produto final de elevada qualidade nutricional, superior aos obtidos por fontes de proteínas de origem animal e vegetal (WANG *et al.* 2014).

Ainda neste sentido os cogumelos são ricos em proteínas, água, minerais, aminoácidos essenciais e não-essenciais, carboidratos, polissacarídeos e outras biomoléculas, o que proporciona sua utilização como alimento funcional, de grande valor para prevenção e tratamento de diversas doenças (GYAWALI & IBRAHIM 2014), devido seus efeitos antitumorais, imune estimulantes, anti-inflamatório, hepatoprotetor, entre outros (KOHNO *et al.* 2008).

Diante do exposto, os cogumelos representam um produto de alta expressividade no mercado externo, possuindo elevado valor comercial, apresentando características organolépticas diferenciadas, tais como textura, sabor e odor (GUILLAMÓN *et al.* 2010). No entanto, esse mercado é restrito e pouco estudado no Brasil, principalmente no que se refere a espécies de origem nativa, a qual vem chamando a atenção da comunidade internacional devido suas propriedades farmacológicas e medicinais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar o efeito da adição de gesso e carbonato de cálcio para a produção do inóculo e seus respectivos efeitos no comportamento agronômico de *Agaricus subrufescens*.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Caracterizar as quantidades de gesso e carbonato de cálcio que devem ser utilizados para a produção do inóculo;
- b) Comparar os efeitos obtidos entre os distintos tratamentos dados aos inóculos;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Agaricus subrufescens*

Cogumelos comestíveis e medicinais de grande importância atualmente cultivados são pertencentes ao gênero *Agaricus*. Entre eles está o Cogumelo do Sol, anteriormente conhecido como *Agaricus blazei Murrill*. Na década de 2000, dois novos nomes de espécies, *Agaricus subrufescens* (KERRIGAN, 2005) e *Agaricus brasiliensis* (LISIECKA *et al.*, 2013) foram propostos para este fungo, originário do Brasil (MIZUNO, 1995). Nos dias atuais, muitas publicações referem-se a cultivares brasileiras como *A. blazei* ou *A. brasiliensis*. Recentemente, *A. subrufescens* foi declarado o nome correto (WISITRASSAMEEWONG *et al.*, 2012), sendo produzido em escala comercial no Brasil desde o início da década de 1990 (BRAGA, 2006) e exportado para diversos países.

De acordo com Gregori *et al.* (2008), atualmente o Cogumelo do Sol também é cultivado em nível industrial no Japão, China, Taiwan e Coréia. Essas culturas dependem de substratos à base de resíduos agroindustriais locais, e dessa forma, as

matérias-primas comumente usadas para preparar o substrato são bagaço de cana-de-açúcar, gramíneas (por exemplo, *Brachiaria spp.*, *Cynodon dactylon*, *Panicum maximum*), palha de cereal (*Triticum aestivum*, *Avena sativa*, *Oryza sativa*) e esterco suplementado com fontes de nitrogênio (soja, trigo, milho e farelo de algodão, uréia, sulfato de amônio) e fontes de fósforo e cálcio (ZIED *et al.*, 2011). Experimentos realizados na China mostraram a possível utilização de cascas de sementes de algodão, cascas de arroz, palha de aspargos e torta de soja (WANG *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2010). A produção eficiente de *A. subrufescens* foi também obtida com composições de substrato mais próximas às utilizadas para o cultivo do cogumelo “champignon de Paris” (*Agaricus bisporus*) em países de clima temperado, como composto de cama bovina, serragem, farelo de cereais (POKHREL & OHGA, 2007) e esterco de galinha, palha de trigo (GREGORI *et al.*, 2008). Solos locais, com ou sem adição de carvão vegetal, são também uma alternativa à turfa de musgo na camada de cobertura utilizada para o cultivo de *A. subrufescens* (CAVALCANTE *et al.*, 2008; ZIED *et al.*, 2010).

3.2. Cultivo de *Agaricus subrufescens*

Sendo caracterizada como uma espécie de cultivo recente no Brasil, a produção do cogumelo *A. subrufescens* ainda é praticada de forma empírica pela maioria dos produtores (BRAGA & EIRA, 1999; BRAGA *et al.*, 1998), baseando-se na tecnologia de produção do *Agaricus bisporus*. Contudo, são necessários estudos para o desenvolvimento de uma tecnologia de produção própria para o *A. subrufescens*, adequada à realidade dos produtores brasileiros e às condições climáticas do Brasil.

A sua produção, assim como do *A. bisporus*, envolve as seguintes etapas: produção do inóculo, preparo do substrato de cultivo (compostagem e pasteurização); inoculação; colonização do substrato; adição da camada de cobertura; produção e processamento.

Segundo Silva (2007), dentre as etapas de cultivo, a indução da frutificação merece destaque, uma vez que é considerada indispensável para o cultivo desse tipo de cogumelo e afeta diretamente a produtividade. A indução da frutificação é a etapa do cultivo em que se adiciona materiais como a turfa, sobre o substrato colonizado. O

termo "camada de cobertura" é utilizado em referência ao material utilizado sobre o substrato com o objetivo de induzir a frutificação (COLAUTO & EIRA, 1998).

As funções básicas da camada de cobertura são: proteger o substrato colonizado contra a perda de umidade, promover microclima úmido para a formação e desenvolvimento dos primórdios, suporte físico (KURTZMAN, 1995), permitir trocas gasosas (KURTZMAN, 1995; WUEST & BEYER, 1996), favorecer o desenvolvimento de microrganismos benéficos à frutificação (HAYES, 1978; REDDY & PATRICK, 1990) e proteger o substrato de microrganismos patogênicos ou competidores.

Diante do reportado na literatura, a etapa que envolve a produção de inóculo vem sendo deixado de lado, uma vez que esta etapa é sempre realizada pelos grandes laboratórios comerciais que não divulgam sua tecnologia para obter o melhor substrato possível, estes sempre a base de grãos de cereais.

3.3. Produção de inóculo

A obtenção de micélios de cogumelos pode ocorrer através de dois distintos processos, denominados "assexuado" e "sexuado". O primeiro corresponde ao método amplamente utilizado em cultivos comerciais, no qual o micélio dicariótico é produzido a partir de fragmentos do basidioma. O método sexuado, mais utilizado em pesquisas referentes ao melhoramento genético da espécie, ocorre a partir de esporos do fungo, levando ao desenvolvimento de micélios monocarióticos (MINHONI *et al.*, 2005). Para a produção de micélio, as principais etapas envolvem a produção da matriz primária, matriz secundária, matriz terciária e *spawn* ("semente" ou inóculo). Estas etapas, realizadas durante o período vigente para elaboração do relatório, serão caracterizadas e detalhadas em tópicos posteriores.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT – Câmpus de Dracena), Universidade Estadual Paulista

(UNESP), nas instalações do Centro de Estudos em Cogumelos – CECOG. Este foi realizado em dois diferentes períodos, nos quais o experimento foi realizado com a alteração de alguns tratamentos considerados pertinentes de serem aplicados, conforme descrito detalhadamente nos itens abaixo.

4.1. Linhagem

Utilizou-se em ambos os períodos do experimento a linhagem ABL 04/49, isolada em São José do Rio Preto, caracterizada por produzir basidiomas de tamanho médio a grande, textura forte, rendimento médio a alto e alta temperatura de produção (± 28 °C), conforme reportada por Zied *et al.* (2014).

4.2. Produção do Micélio

O método adotado para a produção do micélio seguiu as seguintes etapas: confecção da i) matriz primária; ii) matriz secundária; iii) matriz terciária; e finalmente iv) *spawn* ou inóculo, conforme metodologia apresentada por Andrade *et al.* (2007). Brevemente, o meio de cultura utilizado para a produção da matriz primária e secundária foi o composto-ágar (CA). Já a matriz terciária foi produzida utilizando sorgo, como grão base, o qual será acrescido de 2% de carbonato de cálcio.

4.3. Matriz Primária

A matriz primária é instituída primeiramente pelo preparo do meio de cultura através do desenvolvimento e isolamento do micélio fúngico. Segundo Minhoni *et al.* (2005), meios como BDA (batata-dextrose-ágar), arroz-dextrose-ágar, trigo-dextrose-ágar, dentre outros, estão entre os meios de cultura mais utilizados. No entanto, utilizou-se o meio de cultura composto-ágar (CA), com a finalidade de evitar a seleção de mutantes nutricionais do cogumelo devido a inadaptação aos meios ricos, mencionados anteriormente (Figura 1).

Figura 1. Meio de cultura composto-ágar antes de receber o fragmento do basidioma.



Fonte: acervo pessoal.

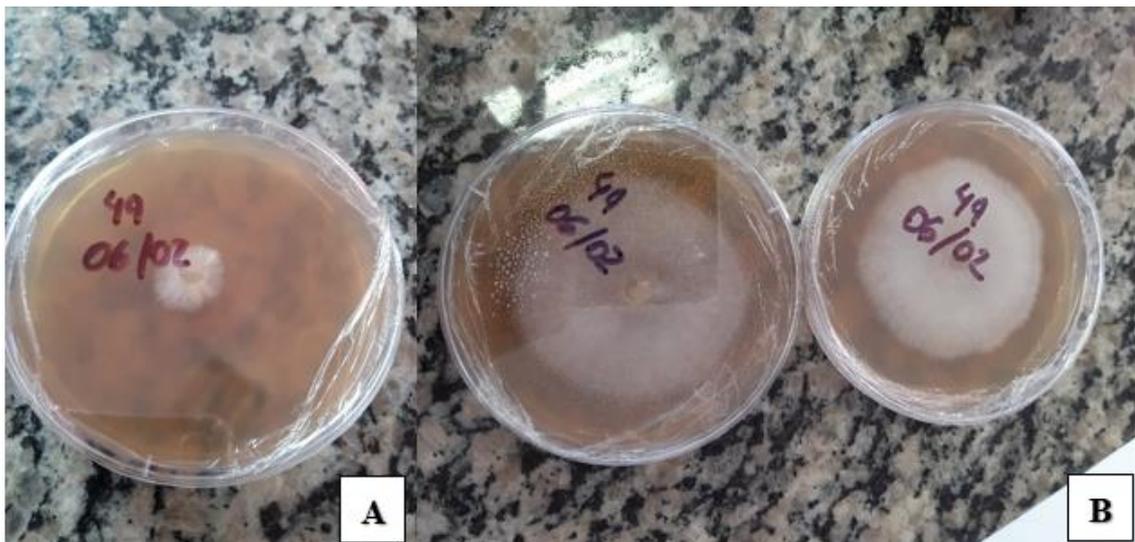
A etapa seguinte constituiu-se da inoculação do meio de cultura mediante a coleta de um basidioma maduro, sadio, sem manchas e de linhagem produtiva. Efetuou-se o corte da base do estípite, seguida de uma limpeza do cogumelo em álcool 70% para desinfecção. Em seguida sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, segmentou-se com as mãos o basidioma, separando-se com o auxílio de uma alça de platina em “L”, previamente flambada, um fragmento do seu tecido interno. Este, foi transferido para uma placa de petri contendo o meio de cultura produzido.

Em sequência à inoculação dos fragmentos do basidioma, sucede-se a incubação das placas de petri a 28°C por 10 dias, período no qual o micélio ocupou cerca de $\frac{3}{4}$ da superfície do meio de cultura.

4.4. Matriz Secundária

Os processos para o preparo da matriz secundária são similares aos efetuados para a primária. A distinção reside na inoculação do meio de cultura, o qual neste momento recebeu discos da matriz primária, transferidos para o centro de outra placa de Petri contendo o mesmo meio CA. Posteriormente, as placas foram vedadas com filme de PVC e transferidas para uma BOD e mantidas a 28°C, por 10 dias para colonização de $\frac{3}{4}$ da placa (KOPYTOWSKI FILHO, 2006). A seguir (Figura 2), pode-se verificar o desenvolvimento micelial nas placas de petri ao decorrer dos dias mencionados.

Figura 2. Desenvolvimento do micélio após três e nove dias (A e B) da inoculação do meio de cultura, respectivamente. Fonte: elaborado pela autora.



Fonte: acervo pessoal.

4.5. Matriz Terciária

Para a produção de matriz terciária, utilizou-se substrato à base de cereais, no qual o sorgo foi a matéria prima escolhida. O preparo da matriz consistiu no cozimento dos grãos de sorgo por aproximadamente 40 minutos em água fervente, seguido do escorrimento do excesso de água e adição de 2% de carbonato de cálcio, funcional para a correção do pH em torno de 6,5 a 7 (MINHONI *et al.*, 2005; ZIED, 2008; ZIED

et al., 2018). Posteriormente à homogeneização, o substrato foi transferido para frascos de vidro recém autoclavados e secos, em cerca de $\frac{3}{4}$ do volume destes. Na sequência, faz-se a esterilização em autoclave do conjunto.

Após a esterilização e resfriamento do substrato, efetua-se a inoculação no meio de grãos utilizando os micélios do fungo desenvolvidos na matriz secundária. O meio de cultura das matrizes foram divididos em oito segmentos triangulares, os quais foram adicionados nos frascos constituídos pelo substrato á 28°C durante aproximadamente 15 dias (Figura 3), período necessário para completa colonização do meio, caracterizando desta forma, a matriz terciária (KOPYTOWSKI FILHO, 2006).

Figura 3. Frasco contendo os grãos de sorgo (matriz terciária) após decorridos 15 dias da inoculação.



Fonte: acervo pessoal.

4.6. Spawn

O preparo do meio de grãos para a produção do *Spawn* (“semente” ou inóculo) é similar ao preparado para a obtenção da matriz terciária, sendo que para este foram utilizados sacos transparentes de PEAD (polietileno de alta densidade). De acordo com Zied *et al.* (2010), posteriormente ao armazenamento do substrato contidos nesses sacos, realiza-se a esterilização em autoclave a 121°C, em torno de 3 horas.

A inoculação dos grãos em sacos de PEAD é efetuada após o resfriamento em temperatura ambiente do conjunto, utilizando a matriz terciária previamente desenvolvida, sendo selados em seguida.

Portanto, mediante o objetivo central do trabalho, o inóculo foi confeccionado utilizando duas fontes de variação, o gesso e o carbonato de cálcio, sendo que para realização da sequência experimental deste projeto e consolidação dos resultados obtidos, o projeto foi desenvolvido em dois períodos distintos, seguindo a mesma metodologia em ambos, sendo que os tratamentos aplicados ao inóculo foram diferenciados com o objetivo final de comparar os dados entre eles em busca da formulação ideal para recomendação das quantidades de gesso e carbonato de cálcio que devem ser utilizados para a produção do inóculo de *Agaricus subrufescens*. Para o primeiro período de desenvolvimento do projeto, 12 tratamentos foram aplicados aos inóculos, sendo compostos pelas doses de 0, 1, 2 e 4% de gesso, e 0,5, 1 e 2% de carbonato de cálcio em referência a quantidade de grãos de sorgo utilizada para a produção do inóculo (Tabela 1). Durante o segundo período do projeto, as doses foram ajustadas para que fossem comparados os resultados diante das distintas dosagens utilizadas nos tratamentos, sendo para gesso as doses de 0, 1 e 2%, e para carbonato de cálcio 0, 1, 2, e 3% (Tabela 2).

Tabela 1. Formulações utilizadas para a produção do inóculo durante o primeiro período experimental.

Tratamento(s)	Sorgo, %	Gesso, %	Carbonato de cálcio, %
1	99,5	0	0,5
2	98,5	1,0	0,5
3	97,5	2,0	0,5
4	95,5	4,0	0,5
5	99,0	0	1,0
6	98,0	1,0	1,0
7	97,0	2,0	1,0

8	95,0	4,0	1,0
9	98,0	0	2,0
10	97,0	1,0	2,0
11	96,0	2,0	2,0
12	94,0	4,0	2,0

Fonte: Dados da própria autora.

Tabela 2. Formulações utilizadas para a produção do inóculo durante o segundo período experimental.

Tratamento(s)	Sorgo, %	Gesso, %	Carbonato de cálcio, %
1	100,0	0	0
2	98,0	1,0	1,0
3	96,0	2,0	2,0
4	97,0	0	3,0
5	99,0	1,0	0
6	97,0	2,0	1,0
7	98,0	0	2,0
8	96,0	1,0	3,0
9	98,0	2,0	0
10	99,0	0	1,0
11	97,0	1,0	2,0
12	95,0	2,0	3,0

Fonte: Dados da própria autora.

Inicialmente, separou-se 6 kg de sorgo que foram levados para o cozimento, por 40 minutos, em água sob fervura. Assim decorrido, os grãos foram mantidos em repouso por 40 minutos para escoamento do excesso de água. Pode-se verificar o ganho de aproximadamente 40% em peso úmido dos grãos, obtendo-se portanto, ao final da fervura cerca de 8,4 kg de sorgo (Figura 4). Desta quantidade de grãos mensurada, separou-se 700 g para cada tratamento, nos quais adicionou-se o gesso e o carbonato conforme apresentados previamente (Tabela 1). Deve-se destacar que os valores representados em %, correspondem à massa úmida dos grãos de sorgo cozidos e escorridos. Logo a homogeneização foi realizada até a total uniformidade do substrato.

Figura 4. Grãos de sorgo após o cozimento.



Fonte: acervo pessoal.

Finalmente o substrato foi acomodado em sacos plásticos (PEAD), com filtro na parte superior, a qual permite as trocas gasosas decorrentes da respiração do fungo. A seguir, o substrato foi esterilizado por 4 horas a 121°C e posteriormente inoculado com porções de matriz terciária, onde foram calculadas para cada tratamento, 14 g dos grãos da referida matriz, representando dessa maneira a totalidade de 4% do peso úmido dos grãos de sorgo. Logo os sacos plásticos foram

incubados por 18 dias a 28°C, até a total colonização do substrato pelo micélio fúngico (Figura 5).

Figura 5. Grãos de sorgo em sacos plásticos após decorrido o período de colonização pelo micélio fúngico.



Fonte: acervo pessoal.

4.7. Preparo do substrato de cultivo

Utilizou-se para os tratamentos aplicados no experimento, um total de 108 kg do substrato comercial disponibilizado pela empresa Compobras[®], situada na cidade de Castro/PR. O composto foi preparado à base de bagaço de cana de açúcar, palha de trigo, esterco de galinha, ureia, calcário e gesso, seguindo a metodologia apresentada por Kopytowski (2006).

4.8. Inoculação e corrida do micélio

O inóculo foi adicionado em camadas alternadas com o substrato comercial; sendo que para ambos os períodos de desenvolvimento do experimento, cada vaso recebeu 1,5 kg de composto fresco e inóculo na dose de 1,5% de massa fresca de

composto, sendo portanto, 22,5 g de inóculo por caixa. Dessa maneira, os inóculos com seus respectivos tratamentos e repetições foram adicionados ao substrato e homogeneizados (Figura 6). Após a inoculação, a superfície superior dos compostos foram revestidas com o filme plástico, evitando-se assim o ressecamento do mesmo e possíveis contaminações advindas de esporos presentes no ar. Os vasos foram acomodadas, ao acaso, em câmara climatizada, para a incubação a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura do composto), por 15 dias.

Figura 6. Substrato sendo alocado nas caixas (A) e adição do inóculo ao substrato (B).



Fonte: acervo pessoal.

4.9. Camada de Cobertura

Após decorridos 15 dias da inoculação, para ambos os períodos do experimento, uma camada de cobertura a base de turfa de musgo foi adicionada sobre o composto colonizado (Figura 7) até a mesma atingir 3 cm de altura, totalizando 54 kg de turfa, sendo 750g para cada repetição dos tratamentos. Após esse procedimento, os vasos foram irrigados até que atingissem cerca de $70 \pm 5\%$ de umidade.

Figura 7. Caixa contendo o composto colonizado (A) e após a adição da camada de cobertura (B).



Fonte: acervo pessoal.

4.10. Cultivo

Com a camada de cobertura, os vasos contendo o composto foram mantidas na câmara de produção onde permaneceram por aproximadamente 90 dias, a uma temperatura de $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $85\pm 5\%$. Foram obtidos 5 fluxos de colheita em ambos os experimentos (Figura 8), considerando o manejo das variáveis ambientais (temperatura, umidade relativa e aeração) seguindo a metodologia apresentada por Zied (2009).

O ciclo de cultivo referente ao primeiro período experimental durou 81 dias desde o dia da inoculação até o dia da última colheita. O primeiro fluxo ocorreu 14 dias após a adição da camada de cobertura (30º dia de cultivo), o segundo fluxo ocorreu em 26 dias (42º dia de cultivo), o terceiro fluxo aos 39 dias (55º dia de cultivo), o quarto fluxo aos 52 dias (68º dia de cultivo) e o quinto fluxo se deu aos 65 dias (81º dia de cultivo).

Comparativamente, o ciclo de cultivo no segundo período do experimento durou 90 dias. O primeiro fluxo de colheita dos basidiomas ocorreu 18 dias após a adição da

camada de cobertura (37º dia de cultivo), o segundo fluxo ocorreu 31 dias após a adição da camada de cobertura (51º dia de cultivo), o terceiro fluxo aos 45 dias após a adição da camada de cobertura (66º dia de cultivo), o quarto fluxo aos 57 dias após a adição da camada de cobertura (80º dia de cultivo) e o quinto fluxo se deu aos 70 dias após a adição da camada de cobertura (90º dia de cultivo). Durante o período de colheita, a massa dos cogumelos foi mensurada em balança digital de precisão.

Figura 8. Basidiomas em ponto ideal de colheita.



Fonte: acervo pessoal.

4.11. Colheita dos basidiomas

A colheita foi realizada manualmente, seguida de uma pré-limpeza dos basidiomas através de raspagem da base do estipe, para se retirar resíduos de material da camada de cobertura. Os cogumelos coletados foram colocados em saco plástico, com a identificação do vaso de onde foram colhidos; após os mesmos foram pesados e contados para avaliação de produtividade, eficiência biológica, precocidade, massa e número de basidiomas (Figura 9). Em seguida os mesmos foram lavados, cortados em longitudinal e desidratados (Figura 10).

Figura 9. Avaliação da massa média e número de cogumelos em balança digital.



Fonte: acervo pessoal.

Figura 10. Cogumelos após lavagem (A), corte (B) e desidratação (C).



Fonte: acervo pessoal.

4.12. Variáveis analisadas

Em ambos os períodos do experimento, foram avaliadas as seguintes variáveis relacionadas ao comportamento agrônômico do *A. subrufescens*:

Produtividade (base úmida)

A produtividade (Pd) foi calculada pela relação entre a massa fresca de basidiomas (MFB) e a massa fresca do composto (MFC), segundo a equação:

$$Pd = MFB / MFC \times 100 (\%).$$

Número de basidiomas

O número de basidiomas (NB) foi determinado diariamente durante a fase de colheita, apenas com a contagem de cogumelos por repetição. Onde r1 a r7 representam as repetições (tratamentos), as quais os cogumelos colhidos nas respectivas caixas eram contados.

$$NB = r1 + r2 + r3 + r4 + r5 + r6 + r7 (g)$$

Massa de basidiomas

A massa fresca de basidiomas (MC) foi obtida pela pesagem dos cogumelos (produção – P) e dividida pelo número de basidiomas (NB):

$$MC = P / NB (g)$$

OBS: Foram aplicados análise de variância com esquema fatorial duplo 3 x 4 (doses de gesso x doses de carbonato) e, em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico Sisvar© versão 5.4, utilizando o teste Tukey para comparar as médias sob o nível de 5% de probabilidade.

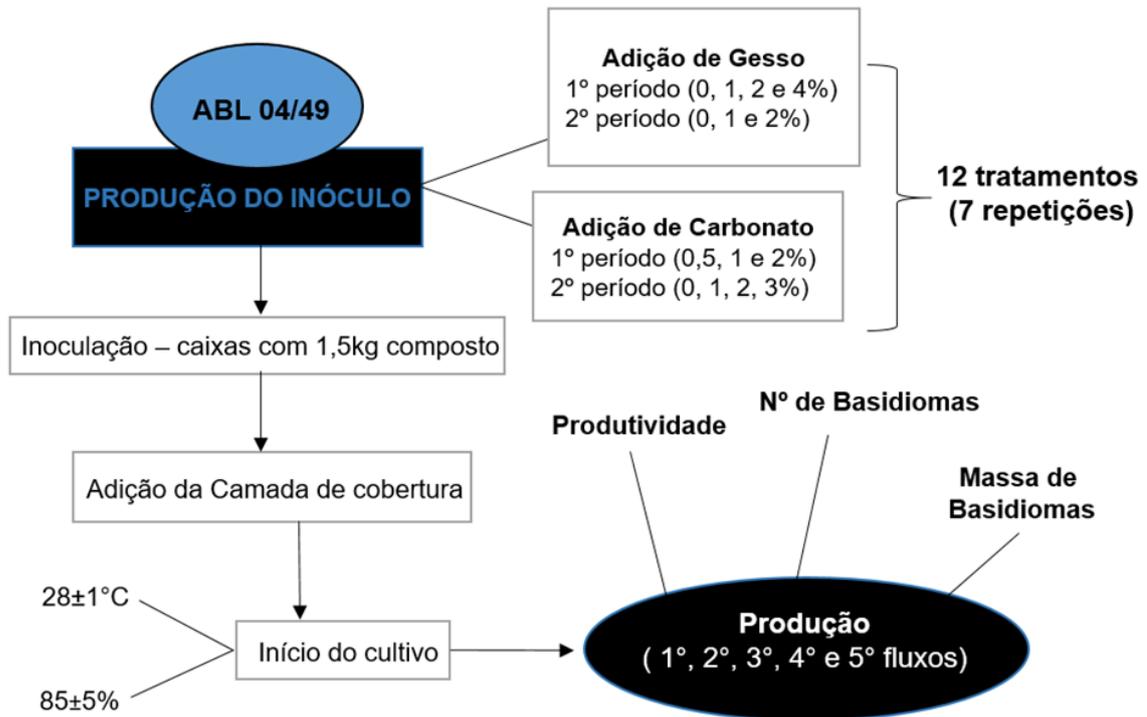
Para a análise de regressão, os dados foram analisados usando o programa *OriginPro 8.5*©, sendo que no teste o nível de significância adotado foi de p<0,05%. Com a aplicação do programa *GraphPad Prism9*©, realizou-se a comparação intergrupo, no qual foram atribuídos os gráficos, comparando todas as dosagens de carbonato de cálcio com as de gesso nos experimentos realizados.

4.13. Desenho experimental

O experimento constituiu-se de um fatorial duplo, sendo para o primeiro período 4 doses de gesso (0, 1, 2 e 4%) e 3 doses de carbonato de cálcio (0,5, 1 e 2%) sob a quantidade de inóculo; e para o segundo período foram 3 doses de gesso (0, 1 e 2%) e 4 doses de carbonato de cálcio (0,1, 2 e 3%), totalizando 12 tratamentos, cada um com 7 repetições. A repetição foi representada por uma caixa plástica contendo 1,5 kg de composto, de modo que cada experimento foi elaborado com 84 unidades

experimentais (n). De maneira exemplificada, a figura 11 ilustra as etapas que foram realizadas no projeto.

Figura 11. Fluxograma do projeto de pesquisa contendo as principais etapas realizadas.



Fonte: elaborado pela autora.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Produtividade

Durante o primeiro período do experimento, os diferentes tratamentos aplicados ao inóculo com distintas doses de gesso e carbonato de cálcio, não proporcionaram resultados significativos no aumento de produtividade, como pode ser verificado a seguir (Tabela 3). No entanto, quando comparado aos tratamentos realizados no segundo período (Tabela 4), nota-se um aumento na porcentagem de produtividade entre eles, confirmando a hipótese que as novas doses aplicadas na última fase do experimento seriam promissoras.

Tabela 3. Produtividade (%) de *A. subrufescens* sob diferentes doses de Gesso e Carbonato de cálcio aplicadas ao inóculo durante primeira repetição experimental.

Gesso	Carbonato de cálcio			
	0,5%	1%	2%	\bar{x}
0%	6,42	7,93	9,02	7,79
1%	7,00	6,35	4,88	6,08
2%	9,10	9,23	4,50	7,61
4%	6,33	5,33	9,28	6,98
\bar{x}	7,12	7,21	6,92	
CV (%)	60,32			

Valores seguidos pela ausência de letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 4. Produtividade (%) de *A. subrufescens* sob diferentes doses de Gesso e Carbonato de cálcio aplicadas ao inóculo durante segunda repetição experimental.

Gesso	Carbonato de cálcio				
	0%	1%	2%	3%	\bar{x}
0%	8,81	11,02	10,68	9,31	9,95
1%	9,65	5,40	7,08	9,21	7,83
2%	9,63	11,35	8,29	12,51	10,44
\bar{x}	9,36	9,26	8,68	10,34	
CV (%)	47,50				

Valores seguidos pela ausência de letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: dados da pesquisa, 2021.

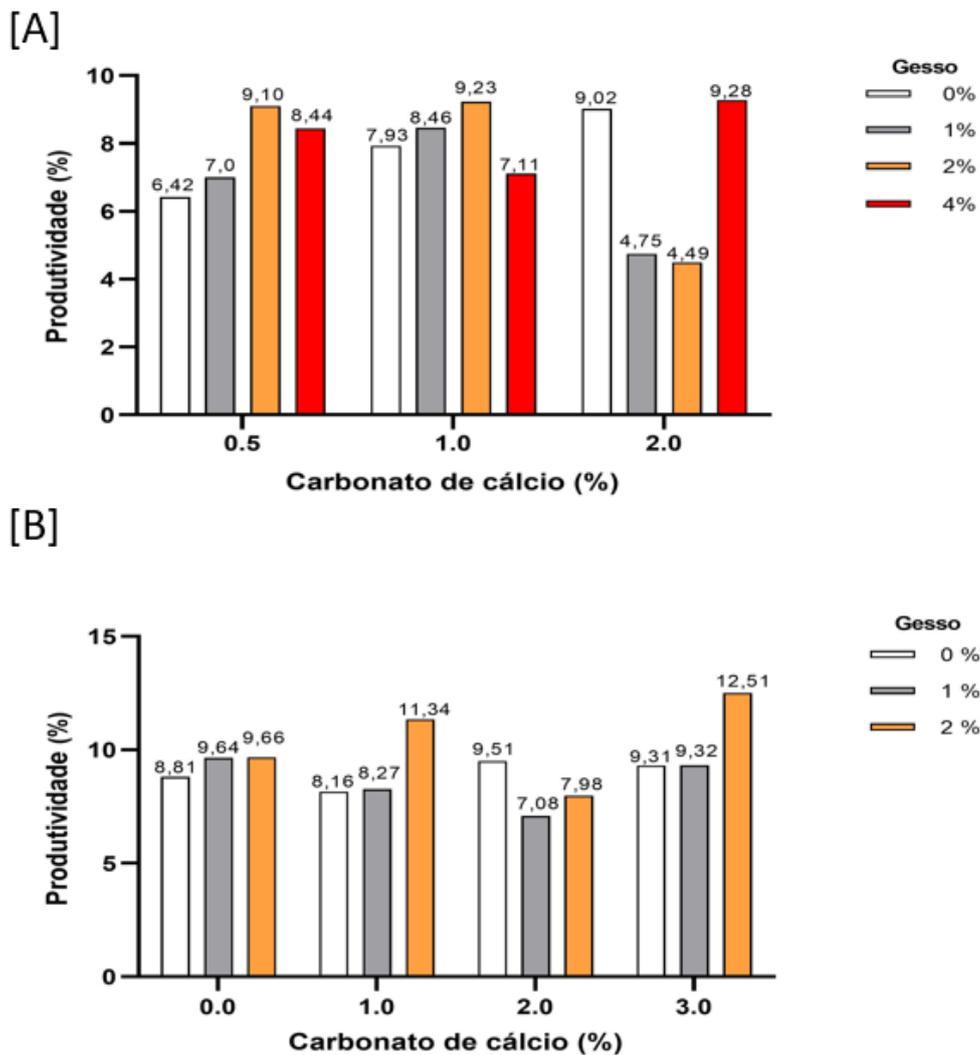
Fonte: Dados da pesquisa.

Sob análise dos resultados obtidos no segundo período de repetição do experimento (Tabela 4), verificou-se que as médias de produtividade (%) aumentaram significativamente, variando de 7,83% a 10,44%, sendo considerados dessa forma, valores de produção relevantes quando comparados aos obtidos no primeiro período de análise (Tabela 3), no qual os valores médios variaram entre 6,08% a 7,79%. Esses dados confirmam a hipótese de que a substituição das doses utilizadas nos tratamentos dos inóculos do primeiro experimento agregariam na resposta do fator produtividade durante o segundo período experimental, visto que os resultados obtidos com a utilização de doses menores de gesso (0,1 e 2%) apresentaram-se positivos em relação ao aumento da produção dos basidiomas, visto que a adição de 4% de gesso ao inóculo durante o primeiro experimento, promoveu um decréscimo na produtividade deles.

A seguir pode-se verificar a diferença entre ambos os dados obtidos durante os dois períodos de estudos (Figura 12), sendo possível observar que as menores doses de carbonato de cálcio (0,5% e 1,0%) aplicadas ao inóculo durante o primeiro período (A), associadas à maior dose de gesso (4%) apresentaram decréscimo em produtividade, sendo possível inferir que a combinação entre elas geram resultados negativos quando comparados ao tratamento em que utilizou-se a maior dose de carbonato de cálcio (2%) em associação a dose máxima de gesso, na qual foi

observada uma tendência no aumento da produção dos basidiomas. Visto que houve um aumento na produtividade, optou-se por acrescentar ao segundo experimento (B) maiores doses de carbonato (a 3%), comprovando que a combinação de maiores doses de ambos os tratamentos seriam promissoras.

Figura 12. Produtividade (%) entre o primeiro (A) e segundo (B) períodos em função dos tratamentos aplicados com as variações nas doses de carbonato de cálcio (%) e gesso (%).

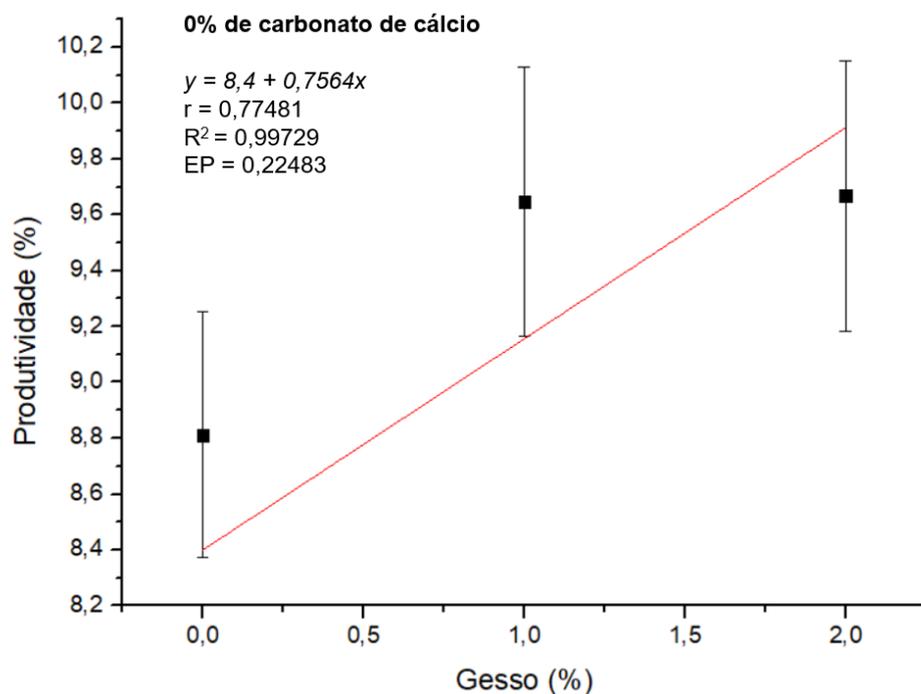


Fonte: dados da pesquisa.

Diante dos resultados mencionados, optou-se por analisar os valores de produtividade obtidos através da análise de regressão das médias entre as doses de carbonato de cálcio e gesso. Como resultado da análise (Figura 13), o gráfico apresenta através da equação $y = 8,4 + 0,7564x$, a variabilidade do fator produtividade na dose aplicada de 0% de carbonato de cálcio, onde y representa a produtividade

(%) dos tratamentos; e x as doses aplicadas de gesso (0%, 1% e 2%) ao inóculo. O coeficiente de correlação com o valor de 0,77481, indica uma relação linear positiva entre as variáveis, pois como sendo um valor alto (próximo de 1,0) e positivo, pode-se afirmar que a 0% de carbonato de cálcio, quanto maior a dose de gesso adicionada ao tratamento, maior será a produtividade dele. Ao observar o valor de R-quadrado (R^2), entende-se que o modelo explica em 99,729% a variabilidade dos dados de resposta obtidos com os distintos tratamentos aplicados de gesso aos inóculos tratados sem a adição de carbonato (dose 0%). Analisando o erro padrão da média (EP), de 0,22483, entende-se que dentro dos intervalos de doses de gesso adicionadas, o valor de produtividade entre os tratamentos pode variar até no máximo o valor de EP, conforme a equação se comporta quando utiliza-se os valores da porcentagem de gesso dentro do intervalo utilizado de 0% a 2%, conforme indicado abaixo.

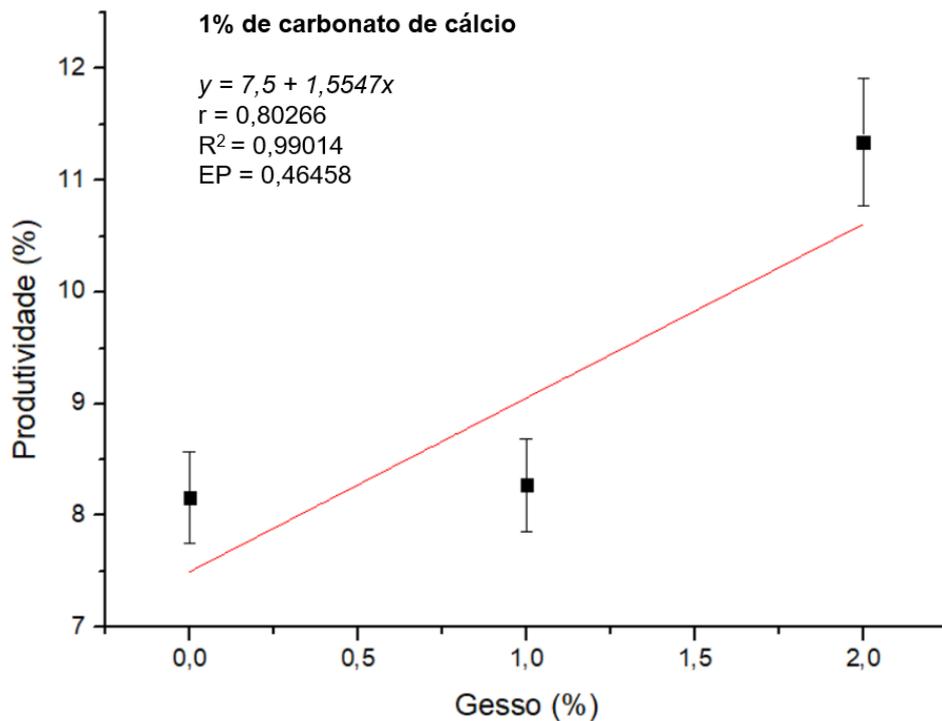
Figura 13. Representação através da análise de regressão entre os valores de produtividade a 0% de carbonato de cálcio (y) em função da variação das doses aplicadas de gesso, no tratamento do inóculo de *A. subrufescens*. Fonte: Dados da pesquisa.



Sob análise dos valores obtidos com a dose aplicada de 1% de carbonato de cálcio (Figura 14), estima-se através da equação $y = 7,5 + 1,5547x$, a tendência de ganho em produtividade (%) com a aplicação de maiores doses de gesso ao inóculo.

O valor de R^2 indica que a equação obtida explica 99,014% a variabilidade nos valores de produtividade com a aplicação da dose de 1% nos tratamentos com as doses de 0% a 2% de gesso, representado dessa forma a proximidade dos dados à linha de regressão ajustada. Dessa forma, o coeficiente de correlação (r) em 0,80266 explica uma relação relativamente forte entre as variáveis, visto que o valor positivo do coeficiente demonstra que com a utilização de 1% de carbonato de cálcio aos tratamentos dos inóculos, o aumento das porcentagens de gesso aplicadas promoverá o aumento considerável da produtividade. Dessa forma, pode-se afirmar que a aplicação de maiores doses de gesso ao inóculo, associadas ao tratamento com 1% de carbonato, responde de forma positiva quando pretende-se alcançar maiores valores ao fator produtividade ao cultivo de *Agaricus subrufescens*.

Figura 14. Representação através da análise de regressão entre os valores de produtividade a 1% de carbonato de cálcio (y) em função da variação das doses aplicadas de gesso, no tratamento do inóculo de *A. subrufescens*.

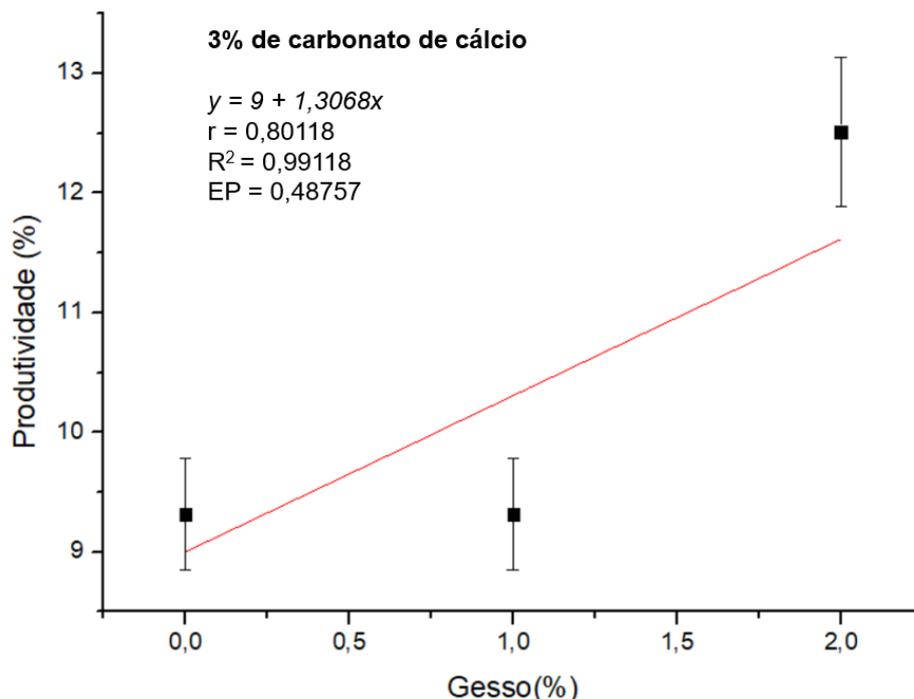


Fonte: dados da pesquisa.

Com a aplicação de 3% de carbonato de cálcio ao inóculo (Figura 15), a equação representada por $y = 9 + 1,3068x$, demonstra que o modelo ajustado explica

através do valor de R^2 igual a 99,118% a variabilidade dos dados, indicando que com a utilização da referente dose de carbonato, o tratamento com a dose máxima de gesso (2%) apresenta-se positivo à obtenção de maiores valores de produtividade dos basidiomas, indicando uma aproximação da tendência de aumento deste fator, assim como nos resultados das análises citadas anteriormente. O coeficiente de correlação (r) em 0,80118 representa a linearidade entre as dosagens estudadas, demonstrando novamente a tendência de obtenção de valores positivos quando faz-se uso de maiores doses de carbonato e gesso ao tratamento dos inóculos para a produção de *A. subrufescens*. O valor de EP igual a 0,48757, demonstra que o modelo se encaixa de forma representativa ao estudo, indicando um valor baixo de erro dentre a distribuição das médias de produtividade obtidas no cultivo dos basidiomas.

Figura 15. Representação através da análise de regressão entre os valores de produtividade a 3% de carbonato de cálcio (y) em função da variação das doses aplicadas de gesso, no tratamento do inóculo de *A. subrufescens*.



Fonte: dados da pesquisa.

Contudo, com a análise entre a aplicação de 3% de carbonato de cálcio nas diferentes doses de gesso aplicadas (Figura 15), verifica-se que quanto maior a dose

de gesso utilizada, maior será o ganho de produtividade (%) no cultivo do Cogumelo do Sol.

5.2. Número de basidiomas

Durante o primeiro período do experimento (Tabela 5), os tratamentos para a produção de inóculo não apresentaram resultados significativos para a variável número de basidiomas. Adiante, observa-se que o tratamento referente à dose aplicada de 2% de gesso e 1% de carbonato de cálcio, destacou-se entre os demais com uma média de 9,0 basidiomas durante os fluxos de colheita, apesar dos resultados similares entre si, o que demonstra que a mesma pode apresentar dados representativos quanto ao número de cogumelos produzidos na próxima repetição deste método.

Tabela 5. Número de basidiomas (unid) de *A. subrufescens* sob diferentes doses de gesso e carbonato de cálcio aplicadas ao inóculo durante primeira repetição experimental.

Gesso	Carbonato de cálcio			\bar{x}
	0,5%	1%	2%	
0%	6,75	5,75	7,00	6,50
1%	6,75	5,75	4,50	5,67
2%	7,50	9,00	5,75	7,42
4%	5,00	4,00	7,25	5,42
\bar{x}	6,50	6,12	6,12	
CV (%)	66,85			

Valores seguidos pela ausência de letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados do segundo período de repetição do experimento (Tabela 6), confirmam a relevância da utilização das doses aplicadas de 2% de gesso e 1% de carbonato de cálcio, destacando-se novamente no fator de números de cogumelos coletados durante os fluxos de produção, com uma média de 9,83 unidades. Em

adição, também é possível observar que o tratamento referente à dose aplicada de 2% de gesso e 3% de carbonato de cálcio, bem como 0% de gesso e 1% de carbonato destacaram-se dentre os demais ao atingir a média de 11,0 cogumelos produzidos. Com isso, pode-se dizer que ao utilizar uma dose mínima de carbonato de cálcio no tratamento, sem adicionar gesso, obtêm-se uma quantidade representativa de cogumelos, o que demonstra não ser necessário maiores gastos com a aplicação de insumos para a produção de um maior número de basidiomas, podendo ser indicado como um tratamento relevante aos produtores de *Agaricus subrufescens*.

Tabela 6. Número de basidiomas (unid) de *A. subrufescens* sob diferentes doses de gesso e carbonato de cálcio aplicadas ao inóculo durante segunda repetição experimental.

Gesso	Carbonato de cálcio				\bar{x}
	0%	1%	2%	3%	
0%	8,67	11,00	10,17	9,83	9,92
1%	9,33	6,50	8,00	10,17	8,50
2%	9,33	9,83	9,67	11,00	9,96
\bar{x}	9,11	9,11	9,28	10,33	
CV (%)	40,26				

Valores seguidos pela ausência de letras não diferem estatisticamente pelo teste T a 5% de probabilidade. Fonte: dados da pesquisa, 2021.

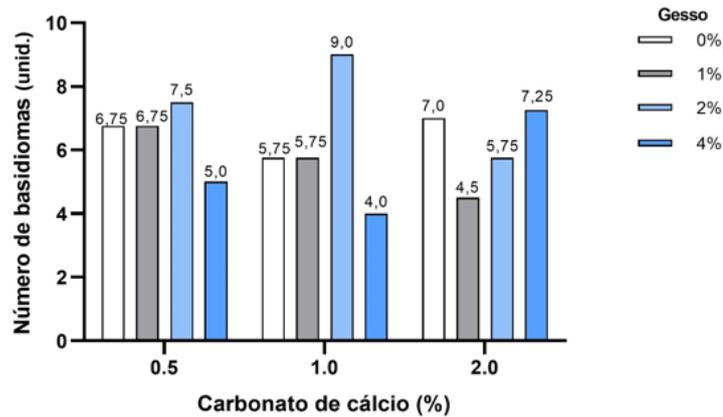
Fonte: Dados da pesquisa.

Adiante, verificam-se os resultados obtidos com as médias de basidiomas (em unidades) por tratamento aplicado em cada período de estudos (Figura 16). Durante o primeiro período experimental (A), constata-se que a aplicação de menores doses de carbonato de cálcio (0,5% e 1,0%) relacionadas a dose de 4% de gesso provoca diminuição do número de cogumelos produzidos, sendo evidenciado que com a dose máxima de 2% de gesso, é possível produzir um maior número de cogumelos (média entre 7,5 a 9,0 unidades), não havendo portanto, necessidade que o produtor possua maiores gastos com a utilização de maiores doses de insumos aplicados ao tratamento dos inóculos. A tendência de maiores médias com a utilização de menores

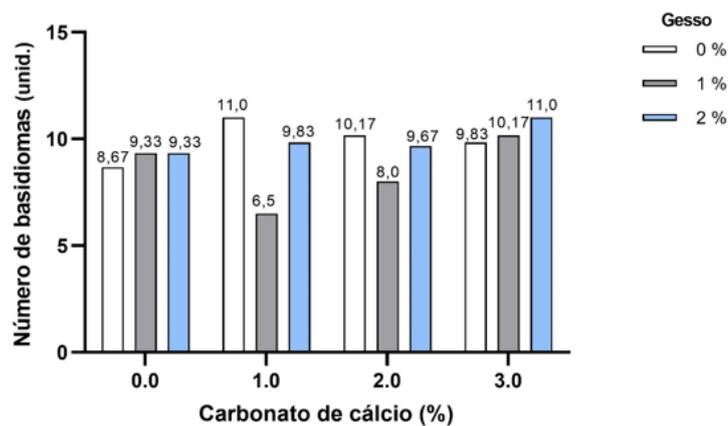
doses de carbonato de cálcio e gesso também foram observadas durante o segundo experimento (B), atingindo o número médio de 11,0 unidades com o tratamento de 0% de gesso e 1,0% de carbonato de cálcio. Com a adição da dose de 3% de carbonato nos tratamentos, verifica-se um aumento gradual na média de cogumelos produzidos, alcançando o número equivalente de 11,0 unidades, sendo assim, pode-se afirmar que a utilização de maiores doses de carbonato de cálcio nos tratamentos dos inóculos não é necessária, visto que, com a aplicação de menores doses, a mesma média é obtida.

Figura 16. Número de basidiomas (unid) entre o primeiro (A) e segundo (B) períodos em função dos tratamentos aplicados com as variações nas doses de carbonato de cálcio (%) e gesso (%).

[A]



[B]



Fonte: dados da pesquisa.

5.3. Massa média de basidiomas

Comparando as dosagens entre si, os tratamentos apresentaram valores significativos para a variável massa média de basidiomas durante ambos os períodos de estudo. Ao analisar os resultados referentes ao primeiro período experimental (Tabela 7), observamos significância nos dados dos tratamentos relativos às doses de 1% e 2% de carbonato de cálcio associada a 0% de gesso, nos quais atingiu-se em média 26,43 a 31,77 gramas, indicando que não há a necessidade da aplicação de gesso quando se tem interesse na produção de cogumelos maiores.

Tabela 7. Massa média (g) de *A. subrufescens* sob diferentes doses de gesso e carbonato de cálcio aplicadas ao inóculo durante primeira repetição experimental.

Gesso	Carbonato de cálcio			\bar{x}
	0,5%	1%	2%	
0%	14,13 B	31,77 a A	26,43 AB	24,11
1%	17,14	13,29 b	17,54	15,99
2%	19,10	15,25 ab	10,67	15,01
4%	16,48	14,29 ab	19,62	16,79
\bar{x}	16,71	18,65	18,56	
CV (%)	51,86			

Letras minúsculas comparam os resultados na mesma coluna e maiúscula na mesma linha; Valores seguidos pela ausência de letras não diferem estatisticamente pelo teste T a 5% de probabilidade, bem como aqueles seguidos por letras iguais.
Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Fonte: Dados da pesquisa.

O segundo período experimental, de forma análoga ao primeiro, apresentou como valores significantes o tratamento com as doses relativas a 1% de carbonato de cálcio associada as demais dosagens de gesso (Tabela 8), demonstrando que a adição de carbonato a 1% nos inóculos deve ser indicada para obtenção de cogumelos maiores, com aproximadamente 17,93 gramas cada, valor acima da média.

Tabela 8. Massa média (g) de *A. subrufescens* sob diferentes doses de gesso e carbonato de cálcio aplicadas ao inóculo durante segunda repetição experimental.

Gesso	Carbonato de cálcio				\bar{x}
	0%	1%	2%	3%	
0%	15,76	13,70 ab	16,34	15,00	15,20
1%	15,06	11,73 b	13,45	13,31	13,39
2%	15,37	17,93 a	12,80	16,61	15,68
\bar{x}	15,40	14,45	14,20	14,97	
CV (%)	24,07				

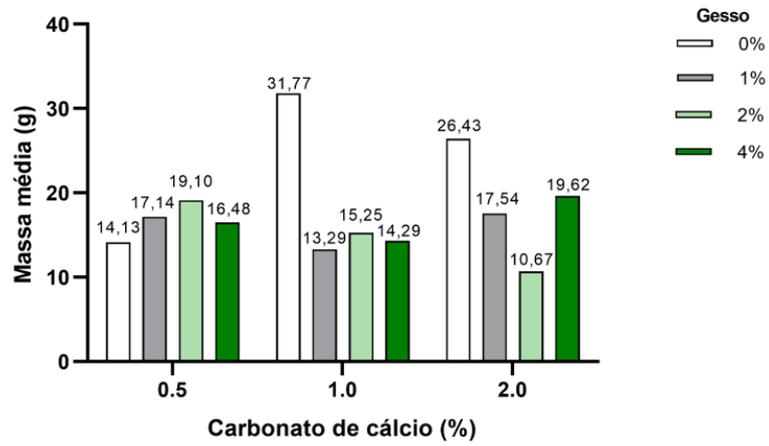
Letras minúsculas comparam os resultados na mesma coluna; Valores seguidos pela ausência de letras não diferem estatisticamente pelo teste T a 5% de probabilidade, bem como aqueles seguidos por letras iguais. Fonte: dados da pesquisa, 2021.

Fonte: Dados da pesquisa.

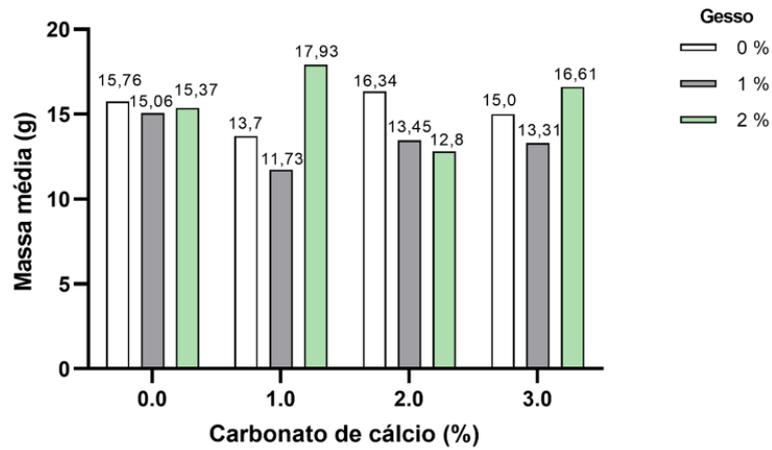
Os resultados relativos à análise da variável massa média (g) podem ser conferidos abaixo (Figura 17), no qual constata-se a relevância da aplicação das doses de 1% e 2% de carbonato de cálcio, sem a necessidade de aplicação de gesso (dose 0%) durante o primeiro período do experimento (A). Em sequência, os dados referentes ao segundo experimento (B) demonstram a importância da utilização da dosagem de 1% de carbonato de cálcio, sendo também possível obter maiores massas médias (g) com a aplicação de 2% de carbonato, variando a utilização de tratamentos com gesso, sendo analisado uma interação positiva quando são associadas as doses máximas de carbonato (a 3%) e gesso (a 2%), a qual apresentou um resultado médio de 16,61 gramas. Dessa forma, é interessante ressaltar que os tratamentos mencionados podem ser recomendados para os produtores que buscam produzir cogumelos maiores.

Figura 17. Massa média de basidiomas (g) entre o primeiro (A) e segundo (B) períodos em função dos tratamentos aplicados com as variações nas doses de carbonato de cálcio (%) e gesso (%).

[A]



[B]



Fonte: dados da pesquisa.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados analisados e da significância dos mesmos, conclui-se que os tratamentos aplicados ao inóculo para a produção e cultivo de *Agaricus subrufescens* podem apresentar-se responsivos ou não em relação a dose de carbonato de cálcio e gesso que são utilizados. No decorrer dos períodos de estudos experimentais em busca da formulação ideal para a recomendação de produção do inóculo, pôde-se inferir que diante das variáveis de produtividade e número de basidiomas, as dosagens de 0 a 2% de gesso associadas a 1%, 2% e 3% de carbonato de cálcio são promissoras, atingindo bons resultados quando comparadas às demais dosagens estudadas. Para a variável massa média, observou-se que a adição de doses de gesso entre 0% a 2%, em associação a 1% de carbonato de cálcio, deve ser indicada para obtenção de cogumelos maiores, sendo um fator interessante aos produtores que visam a comercialização destes.

7. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. C. N.; KOPYTOWSKI FILHO, J. ; MINHONI, M. T. A. ; COUTINHO, L. N. ; FIGUEIREDO, M. B. . Productivity, biological efficiency, and number of *Agaricus blazei* mushrooms grown in compost in the presence of *Trichoderma sp.* and *Chaetomium olivacearum* contaminants. **Brazilian Journal of Microbiology** (Impresso) v. 38, p. 243-247, 2007.
- BRAGA, G. C.; EIRA, A. F. Efeitos da camada de cobertura, da massa do substrato e do ambiente de cultivo, na produtividade de *Agaricus blazei* Murril. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 39-51, 1999.
- BRAGA, G. C.; EIRA, A. F.; CELSO, P. G.; COLAUTO, N. B. Manual do cultivo de *Agaricus blazei* Murril. Cogumelo-do-sol. Botucatu: **Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais**, 1998. 44 p.
- BRAGA, G. C.; MONTINI, R. M. C.; SALIBE, A. B. Parâmetros da produção de *Agaricus blazei* sob diferentes condições ambientais de cultivo. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 5, n. 1, p. 47-56, 2006.
- CAVALCANTE, J. L. R. *et al.* Cultivation of *Agaricus blazei* in the environmental protection area of the Baturité region under three types of casing soils. **Acta Scientiarum**. Agronomy, v. 30, n. 4, p. 513-517, 2008.
- COLAUTO, N. B.; EIRA, A. F. Avaliação quantitativa da comunidade bacteriana na camada de cobertura de *Agaricus bisporus*. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 15-26, 1998.
- FIRENZUOLI, F., GORI, L., & LOMBARDO, G. (2008). The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, 5(1), 3-15.
- GREGORI, Andrej *et al.* Influence of carbon dioxide, inoculum rate, amount and mixing of casing soil on *Agaricus blazei* fruiting bodies yield. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 91, n. 2, p. 371-378, 2008.
- GUILLAMÓN, E., *et al.* (2010). Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. **Fitoterapia**, 81(7), 715-723.
- GYAWALI, R., & IBRAHIM, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. **Foodcontrol**, 46, 412-429.
- HAYES, W. A. Nutrition, substrates and principles of diseases control. In: **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic, 1978. cap. 9, p. 220-237.
- KERRIGAN, Richard W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 12-24, 2005.

- KOHNO, K., *et al.* (2008). Anti-inflammatory and immuno modulatory properties of 2-amino-3H-phenoxazin-3-one. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 31(10), 1938- 1945.
- KOPYTOWSKI FILHO, J. (2006). Produtividade e eficiência biológica de *Agaricus blazei* (Murril) Heinemann, em diferentes condições de cultivo.
- KURTZMAN, R. H. *Agaricus bisporus* (Lge) Imb. casing layer II: porosity, the most important character. **International Journal of Mushroom Science**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 11- 17, 1995.
- LISIECKA, Jolanta *et al.* Almond mushroom *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.)– properties and culture conditions. **Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus**, v. 12, n. 1, p. 27-40, 2013.
- MINHONI, M. T. A.; KOPYTOWSKI FILHO, J.; ANDRADE, M. C. N. Cultivo de *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann. 3. ed. Botucatu: **FEPAF**, 2005. 141p.
- MIZUNO, Takashi. Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murrill: Medicinal and dietary effects. **Food Reviews International**, v. 11, n. 1, p. 167-172, 1995.
- POKHREL, Chandra Prasad; OHGA, Shoji. Cattle bedding waste used as a substrate in the cultivation of *Agaricus blazei* Murrill. **Journal of the Faculty of Agriculture**, Kyushu University, v. 52, n. 2, p. 295-298, 2007.
- REDDY, M. S.; PATRICK, Z. A. Effect of bacteria associated with mushroom compost and casing materials on basidiomata formation in *Agaricus bisporus*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 236-242, 1990.
- SILVA, V. A. *et al.* Isolamento e identificação de bactérias presentes nos solos de cobertura utilizados no cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill. **Ciência e Agrotecnologia**, 2007.
- WANG, Q. *et al.* Yield, dry matter and polysaccharides content of the mushroom *Agaricus blazei* produced on asparagus straw substrate. **Scientia horticulturae**, v. 125, n. 1, p. 16-18, 2010.
- WANG, X. M., *et al.* (2014). A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. **FoodChemistry**, 151, 279-285.
- WISITRASSAMEEWONG, Komsit *et al.* *Agaricus subrufescens*: a review. **Saudi journal of biological sciences**, v. 19, n. 2, p. 131-146, 2012.
- WUEST, P.; BEYER, D. M. Manufactured and recycled materials used as casing in (*Agaricus bisporus*) mushroom production. In: **Mushroom biology and mushroom products**. [S.l.: s.n.], 1996. p. 241-250.
- ZHOU, Quan *et al.* Novel method for cultivating *Agaricus blazei*. **Acta Edulis Fungi**, v. 17, n. 2, p. 39-42, 2010.
- ZIED, Diego Cunha; CAITANO, C. E. C. ; Pardo Giménez, A ; DIAS, E. S. ; ZERAIK, M. L. ; Pardo Gonzalez, J E . Using of Appropriated Strains in the Practice of

Compost Supplementation for *Agaricus subrufescens* Production. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 2, p. 1-8, 2018.

ZIED, Diego Cunha; MINHONI, M. T. A. . Influência do ambiente de cultivo na produção do cogumelo *Agaricus*. **Energia na agricultura** (UNESP. Botucatu. CD-Rom), v. 24, p. 17-34, 2009.

ZIED, Diego Cunha; MINHONI, M. T. A. ; KOPYTOWSKI FILHO, J. ; ANDRADE, M. C. N. . Production of *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) on different casing layers and environments. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 1857-1863, 2010.

ZIED, D. C. *et al.* Medicinal mushroom growth as affected by non-axenic casing soil. **Pedosphere**, v. 21, n. 2, p. 146-153, 2011.

ZIED, Diego Cunha; PARDO GIMÉNEZ, Arturo ; PARDO GONZÁLEZ, Jose Emilio ; SOUZA DIAS, Eustáquio ; CARVALHO, Maiara Andrade ; MINHONI, Marli Teixeira de Almeida . Effect of Cultivation Practices on the β -Glucan Content of *Agaricus subrufescens* Basidiocarps. **JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY**, v. 62, p. 41-49, 2014.