

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS  
DE JABOTICABAL**

**BIOCONVERSÃO DE *SHIITAKE* (*Lentinula edodes*) EM  
PALHA DE ARROZ SOB DIFERENTES FORMULAÇÕES DE  
*SPAWN***

**Isabel Arjonas Fernandes Avila**

Engenheira Agrônoma

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS  
DE JABOTICABAL**

**CULTIVO DE *SHIITAKE* (*Lentinula edodes*) EM PALHA DE ARROZ  
UTILIZANDO DIFERENTES FORMULAÇÕES DE SPAWN**

**Discente: Isabel Arjonas Fernandes Avila**

**Orientador: Prof. Dr. Diego Cunha Zied**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,  
Câmpus de Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Mestre em Microbiologia Agropecuária.**

A958b

Avila, Isabel Arjonas Fernandes

Bioconversão de shiitake (*Lentinula edodes*) em palha de arroz sob diferentes formulações de spawn / Isabel Arjonas Fernandes Avila. -- Jaboticabal, 2023

88 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Diego Cunha Zied

1. Cogumelos cultivo. 2. Cogumelos comestíveis. 3. Fungos morfologia. 4. Micologia. 5. Microbiologia agrícola. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: BIOCONVERSÃO DE *shiitake* (*Lentinula edodes*) EM PALHA DE ARROZ  
SOB DIFERENTES FORMULAÇÕES DE *spawn*

**AUTORA: ISABEL ARJONAS FERNANDES AVILA**

**ORIENTADOR: DIEGO CUNHA ZIED**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Microbiologia  
Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DIEGO CUNHA ZIED (Participação Virtual)  
Departamento de Produção Vegetal / FCAT UNESP Dracena

Documento assinado digitalmente  
**DIEGO CUNHA ZIED**  
Data: 06/06/2023 10:26:44-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. EUSTÁQUIO SOUZA DIAS (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia / UFLA - Lavras/MG

Documento assinado digitalmente  
**EUSTAQUIO SOUZA DIAS**  
Data: 06/06/2023 18:48:45-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. RICARDO LUIZ LOURO BERBARA (Participação Virtual)  
Departamento de Solos / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

Documento assinado digitalmente  
**RICARDO LUIZ LOURO BERBARA**  
Data: 13/06/2023 08:47:30-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 01 de junho de 2023

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**Isabel Arjonas Fernandes Avila** – Nascida em 27 de agosto de 1996, na cidade de Osasco, São Paulo é filha de Vanda Arjonas Fernandes Avila e Antonio Roberto Rino Avila. No ano de 2015 ingressou na graduação em Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), e em 2021 recebeu o título de bacharel em Agronomia. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica desenvolvendo pesquisas na área de microbiologia do solo, no Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LABACVET) sob orientação da Prof. Dr. Irene da Silva Coelho. Em 2021 ingressou no mestrado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP/FCAV Câmpus de Jaboticabal, no programa de Microbiologia Agropecuária como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob orientação do Prof. Dr. Diego Cunha Zied.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Diego Cunha Zied, pelos ensinamentos, apoio e confiança concedidos durante a realização deste projeto.

Também gostaria de expressar minha gratidão ao Centro de Estudo em Cogumelos (CECOG) pelo auxílio na instalação e manutenção dos experimentos. Em especial, agradeço à Cinthia Elen Cardoso Caitano, Wagner Gonçalves Vieira Junior e Lucas da Silva Alves.

Estendo meus agradecimentos à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus Dracena, pela estrutura e equipamentos fornecidos, além de todo o apoio técnico e administrativo.

Sou grata ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP por sua contribuição para a minha formação intelectual e apoio durante a realização deste trabalho.

Também desejo agradecer ao Prof. Dr. Samuel Ferrari pelo fornecimento de material de suma importância para o desenvolvimento e sucesso desta pesquisa.

Minha gratidão se estende à minha família e amigos pelo suporte, carinho e força que me proporcionaram ao longo dessa jornada. E agradeço à mãe natureza, que nos presenteia todos os dias com sua graça e alegria em tudo o que é.

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

## LISTA DE FIGURAS

### Página

|                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura reprodutiva de fungos especializados formada pelo conjunto de hifas.....                                                                                                                                                  | 5  |
| <b>Figura 2.</b> Layout do experimento desenvolvido, em esquema fatorial duplo, com a condução de 2 experimentos, tendo como objetivos definir um padrão de qualidade do inóculo, com emprego de substrato a base de gramíneas e tratamento axênico. | 25 |
| <b>Figura 3.</b> Produção de inóculo de <i>L. edodes</i> .....                                                                                                                                                                                       | 26 |
| <b>Figura 4.</b> Avaliação das características morfológicas de cogumelos de duas linhagens de <i>L. edodes</i> .....                                                                                                                                 | 30 |
| <b>Figura 5.</b> Esquema de obtenção da lentinana de <i>L. edodes</i> através de extração assistida por micro-ondas.....                                                                                                                             | 31 |
| <b>Figura 6.</b> Estado de maturação dos blocos de <i>L. edodes</i> , ao final do período de incubação, onde é possível ver a capa marrom formada e primórdios.....                                                                                  | 32 |
| <b>Figura 7.</b> Gráfico representativo dos grupos <sup>1</sup> de tamanho de basidiomas de duas linhagens de <i>L. edodes</i> , sob 7 formulações de <i>spawn</i> , obtidos após período de incubação de 75 dias.....                               | 37 |
| <b>Figura 8.</b> Gráfico representativo dos grupos <sup>1</sup> de tamanho de basidiomas de duas linhagens de <i>L. edodes</i> , sob 7 formulações de <i>spawn</i> , obtidos após período de incubação de 87 dias.....                               | 37 |
| <b>Figura 9.</b> Espectros de RMN de <sup>13</sup> C das frações T6-PEM da linhagem 20/06 (A) e T1-PEM da linhagem LED 19/11(B), em Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub> a 70°C.....                                                            | 47 |
| <b>Figura 10.</b> Espectro de HSQC-editado das frações T6-PEM da linhagem 20/06 (A) e T1-PEM da linhagem LED 19/11(B), em Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub> a 50°C.....                                                                      | 47 |

## LISTA DE TABELAS

### Página

|                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Tratamentos utilizados para a padronização da qualidade do inóculo.....                                                                                                                                                                              | 27 |
| <b>Tabela 2.</b> Análise química do substrato utilizado anteriormente à autoclavagem.....                                                                                                                                                                             | 27 |
| <b>Tabela 3.</b> Características morfológicas de basidiocarpos de duas linhagens de <i>L. edodes</i> sob diferentes formulações de <i>spawn</i> .....                                                                                                                 | 33 |
| <b>Tabela 4.</b> Distribuição por grupo de tamanho de duas linhagens de <i>L. edodes</i> , sob 7 formulações de <i>spawn</i> em substrato axênico a base de palha de arroz.....                                                                                       | 35 |
| <b>Tabela 5.</b> Análises de variância (ANOVA) para os resultados de produção dos basidiomas colhidos de duas linhagens de <i>Lentinula edodes</i> a partir de substrato axênico a base de palha de arroz, inoculado com diferentes formulações de <i>spawn</i> ..... | 38 |
| <b>Tabela 6.</b> Produção de duas linhagens de <i>Lentinula edodes</i> , sob 7 diferentes formulações de <i>spawn</i> em substrato axênico a base de palha de arroz.....                                                                                              | 39 |
| <b>Tabela 7.</b> Produtividade de duas linhagens de <i>Lentinula edodes</i> , sob 7 diferentes formulações de <i>spawn</i> , em substrato axênico a base de palha de arroz.....                                                                                       | 41 |
| <b>Tabela 8.</b> Dados referentes a produção de duas linhagens de <i>Lentinula edodes</i> sob 7 formulações de <i>spawn</i> .....                                                                                                                                     | 44 |
| <b>Tabela 9.</b> Resultados analíticos do substrato a base de palha de arroz.....                                                                                                                                                                                     | 46 |
| <b>Tabela 10.</b> Teor de $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6), lentinana, obtida das linhagens LED 19/11 e LED 20/06 de <i>L. edodes</i> .....                                                                                                 | 47 |

## SUMÁRIO

|                                                     | Página |
|-----------------------------------------------------|--------|
| 1. Introdução.....                                  | 1      |
| 2. Revisão de Literatura.....                       | 4      |
| 2.1 Macrofungos (ou cogumelos).....                 | 4      |
| 2.2 <i>Lentinula edodes</i> .....                   | 7      |
| 2.3 Cenário de Consumo e Produção.....              | 9      |
| 2.4 Tecnologia de Produção.....                     | 11     |
| 2.4.1 A Utilização de Gramíneas como Substrato..... | 14     |
| 2.4.2 A Escolha da Linhagem.....                    | 17     |
| 2.4.3 Suplementação do <i>spawn</i> .....           | 19     |
| 2.4.3.1 Turfa Negra.....                            | 20     |
| 2.4.3.2 Serragem.....                               | 21     |
| 2.4.4 Estabilidade ou Maturação do Micélio.....     | 22     |
| 2.5.5 Qualidade dos Basidiomas.....                 | 23     |
| 3. Material e Métodos.....                          | 24     |
| 3.1 Inóculo.....                                    | 25     |
| 3.2 Substrato.....                                  | 27     |
| 3.3 Inoculação e Incubação.....                     | 28     |
| 3.4 Maturação.....                                  | 28     |
| 3.5 Frutificação.....                               | 28     |
| 3.6 Colheita.....                                   | 29     |
| 3.7 Variáveis Avaliadas.....                        | 29     |
| 3.7.1 Características Agronômicas.....              | 29     |
| 3.7.2 Caracterização Química do Substrato.....      | 29     |
| 3.7.3 Caracterização Morfológica.....               | 29     |
| 3.7.4 Obtenção do Polissacarídeo Lentinana.....     | 30     |
| 4. Resultados.....                                  | 31     |
| 4.1 Avaliação Morfológica.....                      | 32     |
| 4.2 Avaliação Agronômica.....                       | 37     |
| 4.3 Produção do Polissacarídeo Lentinana.....       | 46     |
| 5. Discussão.....                                   | 48     |
| 6. Conclusão.....                                   | 57     |
| 7. Referências Bibliográficas.....                  | 59     |

## **CULTIVO DO COGUMELO COMESTÍVEL E MEDICINAL *Lentinula edodes* EM PALHA DE ARROZ UTILIZANDO DIFERENTES FORMULAÇÕES DE SPAWN**

**RESUMO** – Com o objetivo de atender à crescente demanda global por cogumelos, é essencial aprimorar a eficiência dos sistemas, a qualidade do produto e reduzir os custos de produção. Convenientemente, este estudo destaca a produção de cogumelos não apenas como fonte de alimentos nutraceuticos, mas também como uma ferramenta para enfrentar o desafio do aumento na geração de resíduos decorrente do crescimento populacional. Para isto, buscou-se otimizar a produção do cogumelo comestível e medicinal *Lentinula edodes* (*shiitake*) utilizando resíduos agrícolas como substrato. A interação entre os dois fatores principais (formulação de *spawn* e linhagem) foi avaliada sob vários parâmetros, com o objetivo de verificar seu efeito no rendimento e composição bioquímica dos basidiomas. O comportamento desses fatores foi avaliado sob dois períodos de incubação. Para a avaliação foram utilizadas duas linhagens (LED 19/11 e LED 20/06) com sete formulações de *spawn* distintas: Controle [C]: Grão de sorgo + 2,5% CaCO<sub>3</sub>; (T2) C + 2,5% serragem; (T3) C + 5% serragem; (T4) C + 2,5% turfa; (T5) C + 5% turfa; (T6) C + 1,25% serragem + 1,25% turfa; (T7) C + 2,5% serragem + 2,5% turfa. Essas formulações foram inoculadas nos blocos de substrato numa proporção de 2% (w/w). O substrato foi formulado com 63% de palha de arroz, 20% serragem, 15% farelo de trigo e 2% CaCO<sub>3</sub>, sendo esterilizado a 121°C por 4h. Os períodos de incubação adotados foram: 87 dias (PI87) e 75 dias (PI75). Em PI75 adicionou-se às formulações de *spawn* 3% de gesso. Foram analisados diversos parâmetros, como eficiência biológica, massa média dos cogumelos, dias necessários para a primeira colheita, período de produção, número de cogumelos colhidos, precocidade e tamanho dos cogumelos colhidos. Como resultado, observou-se dois fluxos de produção em PI87 e quatro fluxos em PI75. Foi observado que a adição de pequenas alíquotas de turfa e serragem ao inóculo forneceu resultados morfológicos significativamente superiores em comparação ao controle, em todas as variáveis analisadas. Os dias necessários para a primeira colheita variaram de 82 a 115 dias e a massa média de basidiomas variou de 6,38 a 37,46g. A produtividade dos tratamentos variou entre 0,75 a 25,2%, destacando-se em PI87 os tratamentos com *spawn* suplementada T5 e T7 para a estirpe LED 19/11 e T4 e T6 para a estirpe LED 20/06. Em PI75, onde o período de incubação foi mais curto, a produtividade da linhagem LED 19/11 não apresentou diferença estatística para as diferentes formulações de *spawn* testadas. Por outro lado, a linhagem LED 20/06 obteve maior produtividade quando associada ao tratamento T3. Conclui-se que a produção de *shiitake* utilizando agroresíduos como a palha, pode ser otimizada por meio da seleção adequada de linhagem, *spawn* e período de incubação. A perfeita combinação entre estes elementos garantirá uma produção mais eficiente e lucrativa.

**Palavras-chave:** Cogumelos cultivo, Cogumelos comestíveis, Fungos morfologia, Micologia, Microbiologia agrícola.

## **GROWING THE EDIBLE AND MEDICINAL MUSHROOM *Lentinula edodes* ON RICE STRAW USING DIFFERENT SPAWN FORMULATIONS**

**ABSTRACT** - In order to attend the growing global demand for mushrooms, it is essential to enhance system efficiency, product quality, and reduce production costs. Conveniently, this study highlights mushroom production not only as a source of nutraceutical food but also as a tool to address the challenge of increased waste generation due to population growth. For this purpose, the optimization of edible and medicinal *Lentinula edodes* (shiitake) mushroom production using agricultural residues as substrates was sought. The interaction between two main factors (spawn formulation and strain) was evaluated across various parameters to assess their effect on yield and biochemical composition of basidiomes. The behavior of these factors was evaluated under two incubation periods. Two strains (LED 19/11 and LED 20/06) were used, along with seven different spawn formulations: Control [C]: Sorghum grain + 2.5% CaCO<sub>3</sub>; (T2) C + 2.5% sawdust; (T3) C + 5% sawdust; (T4) C + 2.5% peat; (T5) C + 5% peat; (T6) C + 1.25% sawdust + 1.25% peat; (T7) C + 2.5% sawdust + 2.5% peat. These formulations were inoculated into substrate blocks at a ratio of 2% (w/w). The substrate was composed of 63% rice straw, 20% sawdust, 15% wheat bran, and 2% CaCO<sub>3</sub>, and sterilized at 121°C for 4 hours. The adopted incubation periods were 87 days (PI87) and 75 days (PI75). In PI75, 3% gypsum was added to the spawn formulations. Various parameters were analyzed, including biological efficiency, average mushroom weight, days to first harvest, production period, number of harvested mushrooms, earliness, and size of harvested mushrooms. The results revealed two production flushes in PI87 and four flushes in PI75. It was observed that the addition of small amounts of peat and sawdust to the inoculum provided significantly superior morphological results compared to the control in all analyzed variables. The days to first harvest ranged from 82 to 115 days, and the average basidiomes weight varied from 6.38 to 37.46 grams. Productivity of the treatments ranged from 0.75 to 25.2%, with T5 and T7 spawn supplements showing the highest productivity for strain LED 19/11 in PI87, and T4 and T6 for strain LED 20/06. In PI75, where the incubation period was shorter, the productivity of strain LED 19/11 did not show statistically significant differences among the different spawn formulations. However, strain LED 20/06 achieved higher productivity when associated with treatment T3. In conclusion, the production of shiitake mushrooms using agro-residues such as rice straw can be optimized through the appropriate selection of strain, spawn, and incubation period. The perfect combination of these elements will ensure a more efficient and profitable production.

**Keywords:** Cultivation mushrooms, Edible mushrooms, Fungi morphology, Mycology, Agricultural microbiology.

## 1. INTRODUÇÃO

*Lentinula edodes* (Chinese Name: *Shian-gu*; Japanese Name: *shiitake*) é o principal cogumelo comestível cultivado no mundo, representando aproximadamente 22% da oferta global (Royse et al., 2017). Sua popularidade é evidenciada pelo seu crescimento no mercado brasileiro. Atualmente, o *shiitake* é produzido em vários estados do Brasil, incluindo São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Bahia e Goiás. No entanto, muitos consumidores encontram o produto apenas na forma desidratada, o que pode limitar seu uso culinário (Dias, 2010). A média global de consumo é de aproximadamente 5 kg de cogumelos por pessoa por ano, e espera-se que o consumo per capita continue a aumentar à medida que os consumidores se conscientizam cada vez mais dos benefícios de incorporar cogumelos em sua dieta (Royse et al., 2017).

Os cogumelos são considerados alimentos altamente nutritivos e versáteis, sendo utilizados como tônicos, medicamentos e ingredientes dietéticos em todo o mundo. Eles são ricos em proteínas (35%), fibras alimentares (19%), vitaminas, carboidratos e minerais, além de apresentarem baixo teor de gordura e calorias, o que os torna uma ótima opção para pessoas que sofrem de diabetes, hipertensão arterial e outras condições de saúde. Os cogumelos também adicionam sabor aos alimentos e frequentemente são adotados como substitutos legítimos para a proteína animal, tornando-se alimentos valiosos por si só (Lakhanpal & Rana, 2005; Cheung, 2010; Thakur, 2020).

O *shiitake* é considerado um alimento nutracêutico, devido à presença de compostos biologicamente ativos, responsáveis por suas propriedades medicinais. Entre estas substâncias destacam-se os polissacarídeos, lentinana, ergotioneína, vitamina D, ergosterol, ácidos graxos poli-insaturados e polifenóis. Esses compostos têm demonstrado potenciais benefícios para a saúde humana em diversos estudos (Roszczyk et al., 2022; Finimundy et al., 2013; López-Cauce et al., 2022; Roman et al., 2013; Smith et al., 2019; Di Pierro et al., 2020; Ito et al., 2014; Eliuz et al., 2022). Desde tempos antigos, os cogumelos têm sido valorizados em diferentes culturas ao redor do mundo por suas propriedades nutricionais e medicinais, sendo considerados símbolos de vitalidade, longevidade e sabedoria (Daba et al., 2008).

Devido à capacidade degradativa da espécie, o cultivo de *shiitake* pode ser realizado utilizando diversos materiais lignocelulósicos, o que torna viabiliza o uso de

agroresíduos como substrato (Zied et al., 2016; Gaitán-Hernández et al., 2017; ShiFeng et al., 2017; Gao et al., 2020). Essa prática é considerada sustentável e tem sido amplamente adotada na produção de cogumelos comestíveis (Urban, 2017). A utilização de agroresíduos como substrato para o cultivo do *shiitake* não apenas auxilia na redução do impacto ambiental gerado pelo descarte inadequado desses materiais, como também diminui os custos de produção e resulta em cogumelos de alta qualidade e valor nutricional (ShiFeng et al., 2017; Gao et al., 2020). Além disso, a prática pode beneficiar a economia local, uma vez que estes resíduos agroindustriais são gerados em pequenas propriedades rurais (Grimm & Wösten, 2018). Aumentar a produção de cogumelos é importante para torná-los um alimento acessível a toda a população e uma alternativa de combate à desnutrição, considerando sua elevada qualidade nutricional (Grimm & Wösten, 2018).

A palha de arroz é um dos agroresíduos mais abundantes no mundo. De acordo com o Instituto Internacional de pesquisas em arroz (IIRRI, 2023), a proporção de palha gerada para arroz em casca produzido varia entre 0,7 a 1,4% dependendo da variedade e das condições de crescimento. De acordo com dados do USDA (2022), estima-se que a produção global de arroz seja de cerca de 518 milhões de toneladas anualmente. É interessante observar que a Ásia é responsável por mais de 90% da produção global de arroz (Vivek et al., 2019) e, responsável por mais de 95% da produção mundial de cogumelos comestíveis (FAO, 2020). No Brasil, há uma grande disponibilidade desse agroresíduo, pois, de acordo com o relatório da Companhia Nacional de Abastecimento CONAB (2023), a produção anual brasileira de arroz é de aproximadamente 10,17 milhões de toneladas. Devido ao curto tempo de produção do arroz, a quantidade de palha de arroz gerada se acumula rapidamente. No entanto, o IRRI (2023) aponta que, a incorporação dessa palha no solo para fertilização em sistemas intensivos não é viável devido ao ciclo curto, com duas a três safras por ano. Isso ocorre porque o tempo de decomposição é curto, resultando em fertilização deficiente do solo, que pode dificultar o estabelecimento das culturas agrícolas.

Nos últimos anos, a produção global de arroz tem experimentado um considerável aumento (Vivek et al., 2019), e de acordo com dados da FAO (2022), espera-se que a demanda por esse cereal aumente em 28% até 2050, devido ao crescimento da população mundial. Nesse contexto, a utilização da palha de arroz como substrato para a produção de cogumelos revela-se uma prática interessante.

Além de agregar valor a esse material, essa abordagem proporciona uma fonte adicional de renda aos produtores, contribui para a redução de impactos ambientais decorrentes do descarte inadequado da palha e resulta na produção de um alimento altamente nutritivo e benéfico para a saúde (Kosre, 2021).

A adaptação da metodologia de produção de *shiitake* é crucial devido às diferenças químicas e estruturais dos substratos de cultivo, que têm um impacto significativo na nutrição, crescimento e metabolismo do fungo (Zied et al., 2016). A seleção adequada da linhagem para o cultivo comercial é essencial, para garantir uma produção bem-sucedida. Diferentes linhagens podem apresentar perfis distintos de degradação do substrato, com variações em fatores como taxa de crescimento micelial, reprodução, temperatura de cultivo e requisitos nutricionais (Gbolagade et al., 2006; Llarena-Hernandez et al., 2014; Pardo-Giménez et al., 2020). A escolha da linhagem também pode afetar a qualidade dos cogumelos produzidos, incluindo seu tamanho, textura e teor de nutrientes (Reverberi et al., 2004).

A contaminação do substrato representa um desafio significativo na produção de cogumelos, especialmente ao utilizar substratos lignocelulósicos. Nesse sentido, a utilização de *spawn* suplementado tem se mostrado eficaz na redução dessa contaminação. O *spawn* suplementado é preparado com nutrientes extras, visando pré-adaptar o micélio e potencializar sua capacidade de colonização do substrato, o que contribui para sua maior competitividade frente à organismos fungos oportunistas. O vigor do micélio no *spawn* determinará a capacidade do fungo de utilizar (degradar) os substratos lignocelulósicos, podendo potencializado por meio da suplementação nutricional (Gaitán-Hernández & Cortés, 2014). Dessa forma, a utilização de *spawn* suplementado pode proporcionar maior eficiência e produtividade na produção de cogumelos.

Além dos benefícios em termos de produtividade, a escolha criteriosa da linhagem e formulação do substrato também pode exercer influência sobre a composição dos cogumelos produzidos. Um estudo conduzido por Reverberi et al. (2004) revelou que esses fatores podem afetar a presença de moléculas específicas nos cogumelos, como a lentinana, uma molécula importante isolada de *L. edodes* por suas propriedades imunomoduladoras (Roszczyk et al., 2022). A adoção de práticas de cultivo que estimulem o aumento na quantidade de lentinana presente nos cogumelos contribui para aprimorar sua qualidade, conferindo-lhes maior valor

nutricional, benefícios para a saúde humana e uma maior valorização no mercado (Zhang et al., 2011).

Neste estudo, foi formulada a hipótese de que a utilização de *spawn* suplementado pode aprimorar a eficiência da bioconversão da palha de arroz por *L. edodes*, resultando em uma melhor produção e qualidade dos basidiomas. Os objetivos deste estudo foram os seguintes: i) investigar como o período de incubação pode afetar o desempenho agrônomico e a qualidade dos basidiomas de diferentes linhagens de *L. edodes*; ii) avaliar o desempenho agrônomico e a qualidade dos cogumelos quando cultivados com *spawn*/linhagens apropriadas, e iii) examinar a composição bioquímica de duas linhagens de *L. edodes* em diferentes formulações suplementadas de *spawn*.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 MACROFUNGOS (OU COGUMELOS)**

Os fungos desempenham papel fundamental em diversas áreas, como alimentação, medicina, ecologia e indústria. São também importantes para a biotecnologia, na produção de enzimas, ácidos orgânicos, corantes e outros produtos (Corrêa et al., 2014). Além disso, sua capacidade de degradação de materiais orgânicos pode ser explorada em processos de biorremediação, para o tratamento de contaminantes ambientais (Deshmukh et al., 2016). Algumas espécies de fungos são conhecidas por promover a resistência das plantas contra herbívoros e patógenos, enquanto outras podem ser patogênicas, causando doenças em plantas, animais e seres humanos (Ganley et al., 2008; Köhler et al., 2014).

Os fungos são fundamentais para a manutenção e equilíbrio dos ecossistemas, pois promovem a ciclagem de nutrientes, operando como “elo” de ligação entre os componentes bióticos e abióticos do meio ambiente (Santos, 2015). Utilizam como fonte de energia, diversas fontes de carbono, como polissacarídeos, lignina, glicose, manose, frutose, óleos e ácidos orgânicos (Singer & Harris, 1987; Zanetti & Ranal, 1997). São organismos eucarióticos, heterotróficos, que obtém nutrientes por absorção e armazenam energia na forma de glicogênio.

Em termos de diversidade morfológica e fisiológica, os fungos apresentam ampla variedade, com diferentes formas de crescimento e reprodução. Possuem quitina em sua parede celular, ergosterol na membrana celular e passam grande parte de seu ciclo de vida em um estado dicariótico. Os cogumelos são estruturas

reprodutivas macroscópicas formadas por fungos especializados, compostos por um conjunto de hifas, que podem crescer acima ou abaixo do solo (Tortora, 2016).

Entre os cogumelos comestíveis mais consumidos, destacam-se os fungos de podridão branca, que se alimentam de substâncias orgânicas provenientes de matéria em decomposição. Estes fungos têm a capacidade de decompor completamente os componentes de madeira, incluindo a lignina (Chang & Miles, 2004). Para tal degradação, estes organismos secretam enzimas oxidativas extracelulares, como a celulase, xilanase e lacase, superando desafios como a escassez de nitrogênio e a presença de compostos tóxicos e antibióticos (Martínez, 2005).

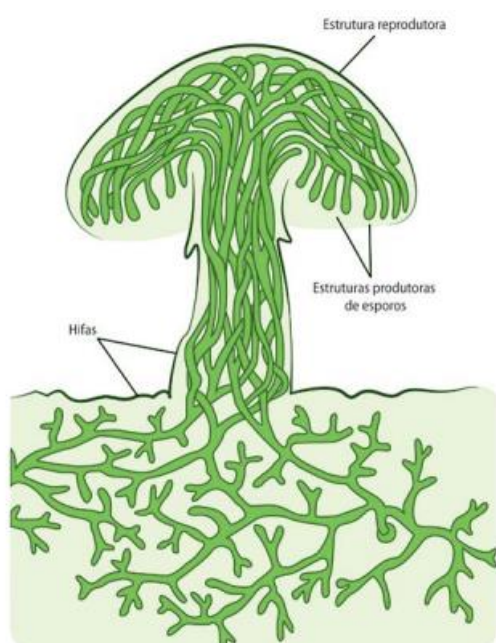


**Figura 1.** Estrutura reprodutiva macroscópica, formada por fungos especializados. Fonte: Santos (2015).

Devido à sua capacidade de degradação, os fungos de podridão branca, são capazes de transformar resíduos agrícolas em valiosa biomassa, ricas em proteínas e contendo todos os nutrientes essenciais aos seres humanos (Thakur, 2020). Os cogumelos são reconhecidos como alimentos funcionais, devido à presença de compostos bioativos com potencial de promover benefícios à saúde, como as  $\beta$ -glucanas, ergosterol, polissacarídeos, antioxidantes, entre outros (Sudheep & Sridhar, 2014; Sun et al., 2017). São uma fonte importante de proteínas, vitaminas e minerais, como vitamina D, potássio, selênio e ferro, além de serem baixos em gordura e calorias (Rzymski et al., 2017). A composição química dos cogumelos varia de acordo com a espécie, a origem geográfica, o substrato de cultivo, as condições

ambientais, a idade e a parte do basidioma analisada (Sudheep & Sridhar, 2014; Sun et al., 2017).

Os cogumelos são compostos por uma proporção de 50 a 80% de carboidratos, 7,30 a 41,92% de fibras e 20 a 50% de proteínas de alto valor biológico (Cheung, 2013). Suas proteínas são compostas por uma variedade de aminoácidos essenciais e não essenciais, como alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, tirosina e valina (Zhang et al., 2012). Além disso, as proteínas dos cogumelos possuem alta digestibilidade, tornando-os excelente opção para vegetarianos, veganos e pessoas que buscam uma suplementação alimentar.

Os cogumelos comestíveis também são fonte de fibra alimentar, apresentando quantidades consideráveis de oligo e polissacarídeos, na forma solúvel e insolúvel (Cheung, 2013). Entre os polissacarídeos mais abundantes estão a quitina,  $\alpha$  e  $\beta$ -glucana, eritadenina, manana, xilana e galactana (Zhang et al., 2012). As fibras alimentares auxiliam na regulação do trato intestinal, absorção de nutrientes e sensação de saciedade (Wang et al., 2014). Além disso, podem ter efeitos benéficos na prevenção de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes e câncer de cólon. A variação no teor de fibras dos cogumelos pode estar relacionada principalmente a fatores genéticos, condições de crescimento (razão C/N, presença de compostos fenólicos e pH do meio) e maturação do basidioma, que determinarão a quantidade e a variedade de sacarídeos presentes nas paredes celulares dos fungos (Rop et al., 2009).

Devido à sua capacidade de ciclar elementos, os cogumelos são excelentes fontes de minerais, tais como cálcio, potássio, fósforo, ferro, zinco, cobre, selênio e molibdênio, e outros (Paulino et al., 2017). Esses minerais desempenham papel fundamental no funcionamento adequado do organismo humano, sendo que não são sintetizados em quantidades suficientes pelo próprio organismo, necessitando ser obtidos através da alimentação (Oliveira et al., 2021). Os cogumelos são ricos em vitaminas como a tiamina (B1), riboflavina (B2), biotina, ácido ascórbico (vitamina C), niacina (vitamina B3) e ergosterol (que é convertido em vitamina D2 quando os cogumelos são expostos à luz solar) (Reis et al., 2020). É importante ressaltar que os cogumelos são um dos poucos alimentos não fortificados que fornecem vitamina D, especialmente quando expostos ao sol. No entanto, a quantidade de vitamina D

produzida pelos cogumelos pode variar dependendo de fatores, como o tempo de exposição à luz solar e o tipo de cogumelo (Angelo, 2016). Um estudo conduzido por Kalac (2009) revelou que, de maneira geral, os minerais encontrados nos cogumelos seguem uma ordem decrescente de concentração, sendo o potássio o mais predominante, seguido por fósforo, enxofre, magnésio, cálcio e sódio. O autor também observou que a distribuição de potássio nos cogumelos não é uniforme, com maior concentração sendo encontrada no píleo, seguido pelo estipe, lamelas e, por último, os esporos.

## **2.2 *Lentinula edodes***

A espécie *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, conhecida popularmente como *shiitake* (*shii*, referente a um tipo de árvore; *take*, que significa cogumelo em japonês) é um cogumelo comestível considerado nutracêutico devido à presença de compostos biologicamente ativos que conferem propriedades medicinais ao fungo. Dentre as substâncias biologicamente ativas encontradas em *L. edodes*, destacam-se os polissacarídeos, a lentinana, a ergotioneína, a vitamina D, o ergosterol, os ácidos graxos poli-insaturados e polifenóis. Esses compostos presentes no *shiitake* têm demonstrado uma série de benefícios potenciais para a saúde humana. Por exemplo, as  $\beta$ -glucanas presentes no *shiitake* possuem propriedades imunomoduladoras e podem auxiliar na melhoria da resposta imunológica do organismo (López-Cauce et al., 2022). Além disso, o *shiitake* contém compostos antioxidantes, como a ergotioneína e a glutatona, que podem ajudar a proteger as células do corpo contra o estresse oxidativo e o dano celular (Finimundy et al., 2013).

Outros compostos presentes no *shiitake*, como os ácidos graxos insaturados e os polissacarídeos, têm demonstrado propriedades anti-inflamatórias e podem ajudar a reduzir a inflamação crônica no corpo, que está associada a uma série de doenças crônicas, incluindo doenças cardíacas, diabetes e câncer (Vikineswary & Chang, 2013). O *shiitake* contém compostos que podem ajudar a reduzir o colesterol LDL (o "mau" colesterol) no sangue, o que pode contribuir para a redução do risco de doenças cardíacas (Morales et al., 2019). A espécie também é citada por apresentar propriedade anti-helmíntica (López-Cauce et al., 2022), ser produtora de resposta imunitária contra vírus (Roman et al., 2013; Ritz et al., 2006; Smith et al., 2019; Utepbergenova & Baituganov, 2019; Wahyudin et al., 2017), possuir efeitos antidepressivos (Ito et al., 2014) e propriedades antibacterianas (Eliuz et al., 2022).

Incluir *shiitake* na alimentação pode ser uma estratégia eficaz para aumentar a ingestão de nutrientes essenciais e promover a saúde de maneira geral. A espécie é uma fonte significativa de proteínas (11,4 a 41,92%), carboidratos (26,7 a 70,91%) e fibras alimentares (8,92 a 41,89%), com baixos teores de gorduras totais (1,23 a 3,34%) e uma proporção elevada de ácidos graxos poli-insaturados (Balbi et al., 2013). Além disso, o *shiitake* contém compostos fenólicos, polissacarídeos, glicoproteínas, aminoácidos essenciais, terpenos e esteróis (Lim & Yim, 2012; Villares et al., 2012; Kozarski et al., 2014; Gründemann et al., 2015; Boonsong et al., 2016). A variação nas quantidades desses nutrientes pode ser atribuída a fatores relacionados à produção, como a composição do substrato utilizado e as condições ambientais (Sun et al., 2017).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados durante o desenvolvimento normal de alguns organismos, e em resposta a diferentes situações de estresse e condições ambientais adversas, tais como infecções, ferimentos e radiação ultravioleta (UV) (Naczki & Shahidi, 2004; Haminiuk et al., 2012). Nos cogumelos, a produção de compostos fenólicos desempenha funções específicas, como proteção contra patógenos, defesa contra estresse oxidativo, interações com ecológicas e sinalização celular. Para os humanos, estes compostos também podem trazer potenciais benefícios à saúde, atuando como antioxidantes, anti-inflamatórios, prevenindo a formação de placas nas artérias, reduzindo a pressão arterial e melhorando a função vascular e digestiva (Kalili & Villiers, 2011). Alguns compostos fenólicos identificados na espécie *L. edodes* incluem ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido sinápico, ácido cinâmico, vanilina, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido cinâmico, ácido trans-cinâmico e rutina (Reis et al., 2012).

Os cogumelos apresentam baixas quantidades de lipídeos, o que é muito interessante em dietas saudáveis e com restrição calórica. Uma análise conduzida por Balbi et al. (2013) dos tipos de ácidos graxos (um dos principais componentes dos lipídeos) encontrados no *shiitake* mostrou que a quantidade de ácidos graxos insaturados é maior que a de saturados (77,7: 22,3). Outros estudos também confirmam a presença desses ácidos graxos no *shiitake*, incluindo ácido linoleico e ácido linolênico (Kozarski et al., 2012; Villares et al., 2012).

O *shiitake* é uma fonte significativa de  $\beta$ -glucanas entre os fungos comestíveis. As  $\beta$ -glucanas são um tipo de polissacarídeo encontrado em alimentos como cereais, leguminosas e algumas espécies de fungos, incluindo o *shiitake*. No *shiitake*, esse polissacarídeo é denominado lentinana e é produzido como componente da parede celular do fungo. A lentinana é um tipo de  $\beta$ -glucana de cadeia longa, altamente ramificada, considerada um dos principais compostos responsáveis pelos efeitos imunomodulatórios do *shiitake* (Roszczyk et al., 2022).

Além das propriedades medicinais, o *shiitake* também é apreciado pelo seu sabor umami, que é reconhecido como um sabor básico capaz de realçar o paladar dos alimentos. As substâncias aromatizantes associadas a este sabor são os aminoácidos livres, como ácido glutâmico e aspártico, juntamente com os nucleotídeos 5-monofosfato purina inosina (IMP) e 5-monofosfato de guanosina (GMP) (Phat et al., 2016).

### **2.3 CENÁRIO DE CONSUMO E PRODUÇÃO**

Conforme mencionado por Chang (2018), a palavra "cogumelo" pode ter diferentes significados em diferentes países. Ao longo da história, diversas culturas atribuíram grande valor aos cogumelos, denominando-os como "elixir da vida" pelos romanos, o "alimento dos deuses" pelos faraós e o "consolo para os guerreiros" pelos gregos (Daba et al., 2008).

A prática ancestral de coletar cogumelos selvagens, que ocorrem naturalmente, continua a desempenhar um papel significativo na sociedade atual. Essa atividade é realizada tanto para subsistência quanto para fins comerciais e incentivo ao turismo local, conhecido como Micoturismo (Lino & Carvalho, 2018). A indústria global de cogumelos, incluindo cogumelos comestíveis, medicinais e selvagens, foi avaliada em cerca de 63 bilhões de dólares em 2013, destacando sua relevância econômica (Royse et al., 2017). No entanto, devido degradação ambiental e escassez de recursos naturais, a disponibilidade de cogumelos selvagens tem diminuído, enquanto a demanda tem aumentado. A produção de cogumelos passa a ser, portanto, uma alternativa viável para solucionar esta questão, fornecendo o produto de forma regular e com boa qualidade (Vinceti et al., 2013).

A prática do cultivo de cogumelos possui uma longa tradição no sudoeste asiático, com registros datando desde 600 a.C. Atualmente, a China é responsável por mais de 93% da produção global de cogumelos, sendo as espécies mais

cultivadas o *shiitake* (*L. edodes*), *shimeji* (*Pleurotus* spp.), orelha-de-macaco (*Auricularia* spp.) e champignon-de-paris (*Agaricus bisporus*) (Royse et al., 2017). Segundo a FAO (2022), a produção global de cogumelos aumentou 13,8 vezes ao longo de 30 anos (1990 a 2020), alcançando 42,8 milhões de toneladas. Esse crescimento é considerado notável, especialmente ao considerar que a população mundial cresceu apenas 1,7 vezes durante o mesmo período (Royse et al., 2017). Além disso, o consumo per capita de cogumelos tem aumentado rapidamente, ultrapassando 4,7 kg anualmente em comparação com a 1 kg em 1997 (FAO, 2022).

O cultivo do *shiitake* teve início na China por volta de 1000 a 1100 d.C (Chang, 2018). Posteriormente, os agricultores japoneses aprenderam as técnicas de cultivo dos produtores chineses e deram o nome popular de *shiitake*, sendo eles os responsáveis por disseminar sua produção para o leste (Royse, 2009). Até a década de 80, o Japão era o maior produtor de *L. edodes*, cultivando-o em toras naturais de árvores. No entanto, a China ultrapassou o Japão em termos de produção ao desenvolver tecnologias e técnicas baseadas no uso de serragem, que reduziram o ciclo de cultivo e aumentaram a eficiência, elevando a produção de 500 milhões para mais de 2 bilhões de kg (Royse et al., 2017). Atualmente, a China é responsável por mais de 95% da produção mundial de *shiitake*.

Embora os povos indígenas brasileiros tenham amplo conhecimento acerca do consumo dos cogumelos nativos, os não indígenas do Brasil não têm a tradição do consumir cogumelos (Sanuma, 2016). Infelizmente, Portugal não contribuiu para estabelecer uma cultura de consumo de cogumelos no país e, como resultado, a maioria dos brasileiros desenvolveu preconceito em relação a esses alimentos, acreditando que eles são venenosos ou alucinógenos (Dias, 2010). No entanto, esse cenário tem mudado no país desde a migração asiática, na década de 1950, que iniciaram os primeiros cultivos de cogumelos na região de Mogi das Cruzes (SP) (Bett & Perondi, 2011). Os cogumelos mais consumidos atualmente no Brasil, em ordem decrescente, são o champignon-de-paris (*Agaricus bisporus*), *shimeji* (*Pleurotus ostreatus*) e *shiitake* (*L. edodes*), sendo o primeiro em conserva e os dois últimos *in natura* (Urban, 2017).

De acordo com Urban (2017), o consumo per capita de cogumelos no Brasil ainda é baixo, sendo apenas 288 g por ano, em comparação a 1,3 Kg por ano na Itália, 2,0 Kg por ano na França, 4,0 Kg por ano na Alemanha e 8,0 Kg por ano na China.

No entanto, um estudo realizado por Capra & Tonin (2019) indica que a fungicultura apresenta um alto potencial de investimento no Brasil, especialmente na agricultura familiar. As oportunidades mencionadas pelos autores são atraentes: o mercado brasileiro é promissor, com um aumento significativo de restaurantes japoneses e crescente interesse pelo veganismo/vegetarianismo; os cogumelos são alimentos funcionais com propriedades nutraceuticas; possuem alto valor agregado, são passíveis de processamento; existem incentivos da Embrapa e das associações do setor, como cursos, workshops, seminários; há uma ampla divulgação de informações sobre os benefícios do consumo de cogumelos; há uma baixa oferta (pouca concorrência); a produção nacional está centralizada em São Paulo; a maioria dos produtores não utiliza tecnologia avançada e a atividade apresenta baixo impacto ambiental, focando na sustentabilidade.

A prática de cultivo de cogumelos é reconhecida como um exemplo de agricultura circular, devido ao uso de agroresíduos como substrato, resultando em uma redução do impacto ambiental e fomentando a sustentabilidade agrícola (Zhang et al., 2014; Faria et al., 2022). A utilização de materiais orgânicos como substrato de cultivo para cogumelos é de grande importância devido à capacidade dos fungos de atuarem como bioacumuladores. Essa capacidade faz com que os fungos absorvam e acumulem substâncias presentes no ambiente em que crescem, o que pode incluir tanto nutrientes essenciais quanto elementos tóxicos (Zhang et al., 2014).

Para Capra & Tonin (2019), existem desafios na produção de cogumelos, como a alta sensibilidade dos cogumelos a fatores ambientais e sua perecibilidade, o que demanda a adoção de técnicas avançadas e uma logística de distribuição eficiente para garantir a qualidade do produto. Uma das vantagens do cultivo do *shiitake* é que uma parcela considerável de seu mercado é direcionada ao produto desidratado, que desenvolve um aroma mais intenso, tornando-o altamente valorizado pelos consumidores no mercado internacional (Mata & Savoie, 2018).

## **2.4 TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO**

Os basidiomicetos são organismos chave na degradação secundária da parede celular das plantas e têm sido explorados biotecnologicamente para obtenção de biomassa rica em proteínas para consumo humano e animal (Barros et al., 2007). O *shiitake*, em particular, é capaz de produzir enzimas hidrolíticas e oxidativas que degradam seletivamente substratos orgânicos. No entanto, a produção dessas

enzimas é altamente específica e depende da composição do substrato, além de fatores ambientais como temperatura e umidade (Gaitán-Hernández et al., 2006).

O cultivo tradicional do *shiitake* em toras de madeira apresenta limitações para a produção em larga escala, devido ao longo ciclo de produção, variações ambientais e baixa eficiência biológica (Dias, 2010). Por isso, o cultivo em sacos (bags) tem se tornado mais comum desde a década de 70 (Lee et al., 2018). Nesse método, utiliza-se substratos à base de serragem ou outros materiais lignocelulósicos tratados termicamente, com controle ambiental adequado. O cultivo em bags oferece vantagens como constância na produção, fornecimento previsível ao mercado, maior eficiência biológica em um tempo reduzido e menor necessidade de espaço físico (Chen, 2005). Além disso, o uso de substratos alternativos e acessíveis localmente pode contribuir para a redução dos custos de produção (Royse, 2009; Dias, 2010; Chang & Miles, 2004; Lee et al., 2018; Chen, 2005).

A técnica chinesa "Jun-Cao", proposta pelos professores Lin Zhanxi e Lin Zhanhua (Lin & Lin, 1997), é uma abordagem sustentável para o cultivo de cogumelos. Essa técnica propõe a utilização de gramíneas como substrato de cultivo, oferecendo benefícios sociais, ecológicos e econômicos significativos. O método permite o aproveitamento de diversos agroresíduos, como palha de arroz, trigo, milho, entre outros, como substratos. A bioconversão de agroresíduos pelos cogumelos é vantajosa, pois evita o acúmulo e descarte inadequado de materiais agrícolas, agregando valor a esses resíduos. Diferentes agroresíduos podem ser utilizados, como polpa de café, bagaço de cana-de-açúcar, casca de amendoim, entre outros, para a produção de cogumelos (Gaitán-Hernández & Mata, 2004; Gaitán-Hernández et al., 2006; Özçelik & Pekşen, 2007; Gaitán-Hernández & Cortés, 2014; Zied et al., 2016; Gaitán-Hernández et al., 2017; ShiFeng et al., 2017; Gao et al., 2020).

De acordo com Stamets (2000), a produção de basidiocarpos é influenciada por diversos estímulos, como mudanças de temperatura, umidade do substrato, disponibilidade de nutrientes. Essa resposta aos estímulos é determinada geneticamente por cada linhagem fúngica, o que pode levar a variações na eficiência de produção nos diferentes substratos. Portanto, a escolha cuidadosa da linhagem e do substrato é essencial para maximizar a produção de basidiocarpos.

Durante a produção de *L. edodes*, a indução da frutificação desempenha um papel crucial no estímulo à formação de primórdios. A temperatura e a umidade do

substrato devem ser controladas durante essa etapa. De acordo com Ohga & Royse (2001), a redução da temperatura pode ser empregada para induzir a frutificação no primeiro fluxo, enquanto a imersão em água é necessária para os fluxos subsequentes. A imersão em água é um método eficaz que não só estimula a produção de cogumelos, mas também repõe a água perdida durante a colonização do substrato e a formação dos basidiocarpos. No entanto, é importante destacar que esse processo pode favorecer a proliferação de contaminantes, especialmente no segundo ciclo de produção, quando o substrato já está mais degradado (Dias, 2010).

Para garantir o sucesso da indução à frutificação, é necessário um desenvolvimento vigoroso da massa micelial, que resulta no processo de "browning", onde a superfície do bloco de substrato escurece. Esse escurecimento indica que o micélio se desenvolveu intensamente e formou uma camada protetora que reduz a suscetibilidade à contaminação e previne a perda de umidade do bloco. Apesar de ser um método simples e de baixo custo, a imersão em água pode permitir a disseminação de contaminantes caso um ou mais blocos estejam contaminados de forma não perceptível a olho nu.

Durante a fase de indução de primórdios e frutificação de cogumelos, é crucial manter um ambiente controlado para garantir colheitas de qualidade. Estudos mostraram que o controle das condições ambientais resulta em maior eficiência biológica e uniformidade no tamanho dos cogumelos produzidos (Kalberer, 1998; 2000; Rinker, 1991; Bruhn & Mihail, 2009). No entanto, é importante considerar que períodos de colheita prolongados podem aumentar o consumo de energia elétrica, tornando essa prática economicamente inviável. Além disso, a exposição prolongada do substrato no ambiente de frutificação e a necessidade de repetidas induções de frutificação podem favorecer o desenvolvimento de contaminantes no substrato, resultando em uma queda na produtividade (Mata et al., 1998; Kalberer, 1998).

Práticas de higiene rigorosas são fundamentais durante o cultivo do *shiitake* para garantir o controle efetivo de contaminantes em todas as instalações, incluindo o controle do acesso de pessoas. Em caso de contaminação, é importante avaliar rapidamente se é necessário eliminar os blocos afetados. A contaminação bacteriana pode ser problemática, afetando o crescimento micelial e a frutificação, resultando em deformações e diminuindo significativamente a produção, além manchas no himênio, comprometendo a qualidade do produto. Além disso, deformações nos basidiocarpos

podem ocorrer devido à falta de ventilação, excesso de umidade ou infecção por vírus. Durante o cultivo de *shiitake*, podem surgir pragas como ácaros, colêmbolos, lesmas, joaninhas e pequenos roedores, atraídos pelo odor dos cogumelos (Fan et al., 2005). Em muitos casos, essas pragas podem ser controladas com relativa facilidade usando armadilhas ou outros métodos apropriados.

O controle adequado do processo de desidratação é crucial para garantir a qualidade e comercialização do *shiitake* desidratado (Mata & Savoie, 2018). Além de conservar o produto, o objetivo é manter sua aparência e cor, bem como intensificar o aroma (Gao et al., 2020). Os cogumelos secos em câmaras com recirculação de ar quente têm melhor qualidade, incluindo melhores condições higiênicas e cor mais brilhante quando comparados aos cogumelos secos ao sol (Fan et al., 2005). A temperatura deve ser mantida entre 40 e 50 °C durante 24 horas. Uma hora antes do término do processo de secagem, é importante resfriar o cogumelo seco, embalá-lo em sacos plásticos, selar e armazenar em um local seco, fresco e escuro.

O aroma e o sabor são atributos importantes para a qualidade do *shitake*, pois afetam significativamente a aceitação do produto pelos consumidores. O substrato de cultivo adotado afeta diretamente o sabor e aroma dos cogumelos colhidos (Mata et al., 2014). O sabor, textura e aroma do *shiitake* estão relacionados à presença de umami. De acordo com Gao et al. (2020), a adição de palha de arroz ao substrato pode aumentar a concentração de umami equivalente (EUC) do *shiitake* colhido em comparação com a produção em serragem de carvalho, devido à maior presença de aminoácidos, que são precursores do sabor umami, na palha de arroz. A propriedade organoléptica do aroma está relacionada com a presença de compostos como lentionina, enxofre e álcoois (Hiraide et al., 2004; Hiraide, 2006; Hiraide et al., 2010). No entanto, o aroma também pode ser influenciado por outros fatores, como o tempo e a temperatura de cultivo, além da cepa utilizada.

#### **2.4.1 A UTILIZAÇÃO DE GRAMÍNEAS COMO SUBSTRATO**

A substituição da serragem por gramíneas no substrato para o cultivo de cogumelos traz diversas vantagens, como a redução do tempo total de cultivo e aumento considerável da produtividade (Gaitán-Hernández & Cortés, 2014). No contexto brasileiro, essa técnica é interessante, pois as gramíneas se adaptam bem a diferentes condições ambientais e são abundantes em todo o país. Além disso, considerando que muitas espécies de gramíneas são exploradas comercialmente, a

utilização dos resíduos destas culturas agrega valor ao material e evita o acúmulo ou a queima, o que contribui para a redução das emissões de carbono. No entanto, é importante enfatizar práticas agrícolas orgânicas para evitar a contaminação dos cogumelos com compostos tóxicos, como inseticidas ou herbicidas, que podem ser bioacumuladas nos cogumelos (Kalac, 2010).

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), cerca de 518 milhões de toneladas de arroz são produzidas anualmente no mundo, sendo a palha de arroz um dos agrosíduos mais abundantes (USDA, 2022). A produção de arroz tem aumentado substancialmente ao longo dos anos, e estima-se que a sua demanda aumente 28% até 2050 devido ao aumento da população mundial (Hussain et al., 2020; FAO, 2022). A Ásia produz cerca de 91% da produção total de arroz do mundo, seguida da América com 5,2%, África com 3,1%, Europa 0,6% e Oceania 0,1% (FAO, 2022).

A utilização da palha de arroz como substrato na produção de cogumelos apresenta vantagens econômicas e ambientais, especialmente em países subdesenvolvidos com grande produção de arroz e disponibilidade de palha de arroz como subproduto. Além de evitar o desperdício, o uso da palha de arroz como substrato pode gerar renda adicional para produtores rurais e contribuir para a redução das emissões de gases de efeito estufa. Estudos mostraram que a produção de cogumelos a partir da palha de arroz pode reduzir as emissões de gases de efeito estufa em até 80% em comparação com a queima da palha (Arai et al., 2015), além de diminuir as emissões de metano em até 90% (Jiang et al., 2019).

A relação Carbono/Nitrogênio (C/N) é um importante fator na produção de cogumelos, pois afeta diretamente o crescimento e a produção do fungo. A palha de arroz é uma fonte de carbono, contendo lignina, celulose e hemicelulose, que são utilizados pela espécie *L. edodes* (Vivek et al., 2019). A serragem também é uma importante fonte de carbono, composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, e pode ser adicionada à palha de arroz para suprir a quantidade de carbono necessária pelo fungo. A adição de nutrientes suplementares, como farelo de arroz, trigo, soja e outros, é indicada para fornecer nitrogênio orgânico disponível e vitaminas, sendo recomendada uma adição de 10% a 20% desses materiais. A relação C/N ideal para a produção de cogumelos varia de acordo com a espécie, mas geralmente situa-se entre 20:1 e 40:1 (Auta et al., 2017).

Uma relação C/N muito alta pode limitar o crescimento dos cogumelos, enquanto uma relação C/N muito baixa pode resultar em crescimento excessivo de microrganismos competidores e redução da produtividade (Chang & Miles, 1989; Stamets, 2000; Sánchez, 2017). Por isso, é importante avaliar cada caso de forma individualizada. Kalberer & Griensven (2000) conduziram um estudo sobre a suplementação de nitrogênio em substratos à base de serragem para a produção de *shiitake*. Os resultados indicaram que a suplementação com compostos nitrogenados resultou em maior produtividade e basidiomas mais pesados em comparação com substratos não suplementados. A redução da relação C/N do substrato, devido à suplementação, pode ter contribuído para esses resultados positivos. No entanto, o excesso de nitrogênio pode levar a um crescimento excessivo de microrganismos competidores ou até mesmo ser tóxico para o fungo, resultando em competição por nutrientes e espaço, prejudicando o crescimento e a produtividade dos cogumelos (Chang & Miles, 1989; Stamets, 2000; Sánchez, 2017).

Outros suplementos, como o calcário e gesso também devem ser adicionados ao substrato de cultivo, para neutralizar a acidez, especialmente durante os estágios finais de decomposição do substrato (Przybylowicz & Donoghue, 1990). À medida que o micélio do fungo consome os nutrientes do substrato, pode ocorrer a produção de ácidos que aumentam a acidez do substrato. O uso de calcário e gesso ajuda a neutralizar esses ácidos e manter um ambiente adequado para o crescimento e desenvolvimento dos cogumelos (Li et al., 2022). O gesso fornece enxofre à formulação. A dosagem e a combinação dos suplementos podem variar dependendo das condições específicas de produção e do tipo de substrato utilizado. A água também é importante para o pleno desenvolvimento do fungo, devendo ser adicionada até atingir a umidade ideal para o crescimento de *L. edodes*, que se situa entre 55 e 70% (Rinker, 1991).

Puri (2011) e Chittaragi et al. (2020) avaliaram diferentes formulações de *spawn* para a produção de *L. edodes* em substratos à base de agrosresíduos, e constataram que a utilização de sorgo como fonte de nutrientes na formulação do *spawn* promoveu um crescimento linear máximo e mais rápido do fungo em comparação a outras formulações testadas. O sorgo é uma fonte rica em nutrientes, como proteínas e carboidratos, que são essenciais para o desenvolvimento micelial do *shiitake*. Além

disso, o uso de sorgo na formulação do *spawn* também pode melhorar a colonização do substrato pelo fungo, resultando em uma produção mais eficiente de cogumelos.

#### 2.4.2 A ESCOLHA DA LINHAGEM

O sucesso na produção de cogumelos depende da máxima compatibilidade entre a linhagem fúngica e o substrato utilizado no cultivo (Zied et al., 2016). As diferenças químicas e estruturais no substrato de cultivo têm um impacto direto no crescimento e desenvolvimento de cogumelos, afetando sua nutrição, umidade e aeração. Portanto, é fundamental compreender essas diferenças e selecionar o substrato mais apropriado para cada linhagem, a fim de obter uma produção eficiente e de alta qualidade.

De acordo com Mahdizadeh et al. (2021), há uma diferença significativa na colonização do substrato por diferentes linhagens de *L. edodes*. Portanto, a seleção de uma linhagem que seja adaptada, competitiva e vigorosa, capaz de distinguir-se ao contato de microrganismos competidores e com rápida taxa e alto potencial de colonização do substrato, é de fundamental importância para garantir alta produção de cogumelos, no menor tempo possível (Gaitán-Hernández & Cortés, 2014).

Na maioria dos casos, a contaminação na produção em que se utiliza substratos a base de palha é causada por fungos do gênero *Trichoderma* (Fan et al., 2005). Segundo Mata et al. (1998), as linhagens têm habilidades diferentes para reagir ao contato de *Trichoderma*. O *shiitake* é capaz de resistir ao ataque desses fungos por produzir grandes quantidades de lacases (p-fenol oxidase, EC 1.10.3.2) (Savoie & Mata, 1999; Badham et al., 1991). Observa-se normalmente que um pigmento acastanhado é produzido na zona de contato entre os micélios, quando *L. edodes* rejeita o ataque de *Trichoderma*. Este pigmento acastanhado é formado pela superprodução de enzimas lacases, induzida por metabólitos extracelulares produzidos pelo contaminante. De todo modo, as lacases também são induzidas por derivados de lignina solúveis em água presentes no substrato de cultivo, o que favorece o crescimento micelial de *L. edodes* e limita o de *Trichoderma* (Savoie et al., 1998; Badham et al., 1991). Essa vantagem ocorre porque a produção da enzima lacase pelo *shiitake* é um mecanismo adaptativo crucial para o crescimento e desenvolvimento do fungo em substratos lignocelulósicos. Essa enzima é capaz de degradar a lignina, permitindo com que o *shiitake* tenha maior acesso à celulose e hemicelulose, além de oxidar compostos tóxicos gerados pelos contaminantes, como

os ácidos fenólicos e quinonas, aumentando assim, sua eficiência da produção (Badham et al., 1991).

O tempo requisitado pelo *shiitake* até a frutificação varia de acordo com a linhagem utilizada. Linhagens que frutificam precocemente são consideradas mais vantajosas comercialmente, porém, é importante que a linhagem seja capaz de equilibrar o consumo de nutrientes para o desenvolvimento micelial e a formação de corpos de frutificação (Mata & Savoie, 1998; Llarena-Hernández et al., 2013).

De acordo com Zied et al. (2016) cada linhagem de *L. edodes* possui uma temperatura ótima de crescimento, isto é, a faixa de temperatura na qual a estirpe cresce mais rapidamente e eficientemente. O conhecimento da temperatura de crescimento ótimo pode ajudar a selecionar estirpes adaptadas a diferentes condições ambientais e substratos de cultivo. Zied et al. (2016) observaram que as linhagens respondem diferentemente também à composição nutricional do substrato. A composição nutricional do substrato inclui fatores como o teor de nutrientes, a proporção de carbono e nitrogênio, o pH e a presença de compostos como polissacarídeos, proteínas e lignina. Essas diferenças na resposta das linhagens à composição nutricional do substrato estão relacionadas à produção de enzimas específicas por cada linhagem como componente de adaptação. Cada linhagem apresenta um perfil de enzimas que lhe permite degradar de forma eficiente os compostos presentes no substrato (Martinez et al., 2005).

Mata & Savoie (1998) destacaram a importância de as linhagens apresentarem um equilíbrio entre a produção de enzimas e a velocidade de utilização dos açúcares solúveis no cultivo de *L. edodes* em palha. A palha é um substrato rico em celulose e hemicelulose, que são polissacarídeos que podem ser degradados por enzimas produzidas por *L. edodes*. No entanto, a palha também contém açúcares solúveis, como a glicose e a sacarose, que podem ser utilizados rapidamente pelo fungo. Segundo autor, se a produção de enzimas for insuficiente, o fungo consumirá rapidamente os açúcares e, não terá energia suficiente para degradar a celulose e a hemicelulose, levando à redução na produção de cogumelos ou favorecendo outros fungos ou bactérias que competem pelos açúcares solúveis. E, se a produção de enzimas for muito, o fungo desperdiçará energia, o que também pode levar a uma diminuição na produção de cogumelos.

Sales-Campos et al. (2008) destacam que a qualidade dos cogumelos colhidos é uma característica importante a ser considerada no cultivo de *L. edodes*, além da produção de biomassa. A linhagem e as condições de cultivo podem ter influência direta na composição química dos cogumelos, especialmente nos minerais e na qualidade proteica. Uma pesquisa realizada por Wu et al. (2012) comparou o conteúdo de ergosterol e o perfil de ácidos graxos em seis linhagens de *shiitake*, e observou diferenças significativas entre elas.

No que diz respeito ao critério de mercado, a forma e a cor do cogumelo fresco são os principais parâmetros adotados pelos consumidores. Sales-Campos et al. (2008) apontam que a escolha da linhagem pode influenciar a cor, a quantidade e a qualidade dos pigmentos produzidos pelo cogumelo. A forma do cogumelo é determinada principalmente pela genética da linhagem usada no cultivo (Stamets, 2000). Xie et al. (2017) analisaram a composição química de pigmentos em duas linhagens de *shiitake* cultivadas em diferentes substratos, e verificaram que a linhagem mais produtiva em biomassa apresentou uma coloração mais clara e conteúdo menor de pigmentos em comparação com a outra linhagem.

#### **2.4.2 SUPLEMENTAÇÃO DO SPAWN**

O inóculo normalmente utilizado para o cultivo de cogumelos comestíveis é popularmente conhecido como *spawn*. Ele consiste em um substrato colonizado pelo micélio fúngico e é utilizado para inoculação do substrato final. As sementes de sorgo são frequentemente utilizadas na formulação de *spawn* de *shiitake* e têm apresentado ótimos resultados (Salmones et al., 1999; Martínez Guerrero et al., 2012).

A contaminação por fungos antagonistas é uma das principais dificuldades na produção de cogumelos comestíveis em substratos à base de gramíneas (Mata et al., 1998). Essa competição por espaço e nutrientes pode levar à inibição do crescimento do micélio e à diminuição ou até mesmo ausência de frutificação, resultando em perdas significativas na produção (Savoie & Mata, 1999). Como forma de minimizar este problema, vem sendo demonstrado que a adição de suplementos ao *spawn* melhora a resistência do micélio contra possíveis contaminações e serve para pré-adaptar o micélio ao substrato final (Savoie et al. 2000; Mata et al., 2011; Gaitán-Hernández & Cortés, 2014).

Para que haja uma melhor adaptação da linhagem de *L. edodes* ao substrato de cultivo, é necessário utilizar um inóculo com elevado potencial biológico e atividade

metabólica do fungo durante a corrida do spawn, segundo estudos de Mata e Savoie (1998). Com o propósito de aumentar a competitividade das diferentes linhagens de *L. edodes* e garantir o sucesso da produção, faz-se conveniente o desenvolvimento de um inóculo adequado, o que pode ser alcançado através da adição de nutrientes extras ao meio de cultura do micélio durante o processo de produção do spawn (Savoie et al., 2000; Mata et al., 2011; Gaitán-Hernández & Cortés, 2014). Essa suplementação pode aumentar a produção de enzimas, melhorar a qualidade do micélio e aumentar a resistência a condições adversas, conforme apontado por Ohga e Royse (2001). Os autores apontam que a suplementação pode também aumentar a produção de compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de fungos e bactérias antagonistas.

Suplementos como turfa, serragem e outros materiais ricos em lignina não só possuem propriedades adsorventes, mas também contém compostos fenólicos e outras moléculas complexas que beneficiam a produção de cogumelos, uma vez que estimulam a defesa ativa de *shiitake* contra os antagonistas e favorecem seu crescimento e competitividade no substrato de cultivo. estas substâncias fenólicas e outras moléculas complexas não são facilmente degradadas pela maioria dos contaminantes, porém induzem a produção de enzimas oxidantes por *shiitake* o que faz com que tenha acesso quase exclusivo a estes suplementos, melhorando sua competitividade frente aos antagonistas (Mata et al., 2011). Compostos fenólicos também podem contribuir com a defesa ativa de *L. edodes*. Quando o micélio de *shiitake* e *Trichoderma* são confrontados em substrato a base de palha, o micélio de *shiitake* forma uma barreira com denso micélio, inicialmente branco que depois se torna castanho escuro. Nesta zona escura, o *shiitake* produz uma quantidade significativa de enzimas do grupo de lacases. As lacases são enzimas que podem oxidar compostos fenólicos, como aqueles encontrados na palha, para formar produtos químicos que podem matar ou inibir o crescimento de fungos ou bactérias antagonistas, incluindo o *Trichoderma* (Yang et al., 2016).

#### **2.4.2.1 TURFA NEGRA**

A turfa é uma substância fóssil, organomineral que pode ser encontrada em áreas alagadiças como várzeas de rios, planícies costeiras e regiões lacustres (Gnatowski et al., 2010; Franchi, 2006). De acordo com a Santos et al. (2018), as turfeiras são classificadas como organossolos e sua composição elementar, assim

como suas propriedades dependem de vários fatores, como a natureza da vegetação, o clima da região, a acidez da água e seu grau de decomposição (Brown, 2000). Sob o ponto de vista físico-químico, a turfa negra é um material poroso e altamente polar. Possui em média 5% de celulose, 20% de hemicelulose, 70% de lignina e menos de 5% de minerais, além de compostos fenólicos, cinza e substâncias húmicas (ácidos húmicos e fúlvicos) com elevada capacidade de adsorção para metais de transição e moléculas orgânicas polares (Schumacher et al., 2013). O pH das turfas negras é neutro ou ligeiramente alcalino e pode conter uma variedade de nutrientes como ferro, manganês, zinco, cobre, cálcio, magnésio, potássio e sódio (Akça, 2005).

Alguns autores utilizaram a turfa na formulação do *spawn* para a produção de *L. edodes*, onde observou-se melhorias em relação à nutrição do fungo e vantagens competitivas frente a outros microrganismos oportunistas (Leatham, 1986, Mata et al., 1998, Beyer, 1997). Leatham (1986) observou que a adição de turfa ao *spawn* de *L. edodes* resultou em um crescimento mais rápido e vigoroso do micélio, além de uma melhor produção de cogumelos em comparação com o uso de outros materiais orgânicos. Ele também observou que a turfa possui efeito inibitório sobre o crescimento de algumas bactérias e fungos oportunistas, o que aumentou a competitividade de *L. edodes* no substrato de cultivo. Mata et al., (1998) verificaram que a adição de 10% de turfa à formulação do *spawn* para produção de *L. edodes* em substrato a base de palha de trigo, reduziu a taxa de contaminação por *Trichoderma* em 50% e aumentou em 30% o rendimento em cogumelos mesmo na ausência de contaminação, o que os autores sugerem ocorrer em decorrência da composição da turfa, que pode atuar como uma fonte de C de liberação lenta e um componente de proteção. Além disso a presença de compostos fenólicos pode estimular a produção de enzimas lacases capazes de aumentar a resistência contra contaminantes e acelerar a degradação dos compostos lignocelulósicos.

#### **2.4.2.2 SERRAGEM**

Os cogumelos dependem de substratos para sua nutrição, devendo ser uma fonte de material lignocelulósico que suporta o crescimento, desenvolvimento e frutificação do fungo (Chang & Miles, 2004). No Brasil, a serragem de eucalipto é a principal fonte de carbono utilizada. Diferenças significativas são observadas no desenvolvimento do *spawn* de *shiitake* ao utilizar diferentes serragens (Tarushi & Sud, 2020). Segundo os autores houve um aumento percentual no crescimento micelial do

*shiitake* em serragem de eucalipto, o qual os autores concluem ser a melhor serragem para a formulação de *spawn* para *shiitake*. Essa vantagem pode estar relacionada à sua boa relação C/N, porosidade e maior área superficial específica em comparação com outras serragens. Além disso, o uso dessa serragem apresenta diversas vantagens, como alta disponibilidade, baixo custo e facilidade de manipulação.

Em geral, a serragem de eucalipto é composta principalmente por celulose (40-50%), hemicelulose (20-30%), lignina (20-30%) e extrativos (3-5%). Além disso, a serragem de eucalipto pode conter outros componentes, como resinas, taninos, ácidos graxos e compostos fenólicos que podem favorecer a produção de *shiitake* (Mata et al., 2011)

A adição da serragem como suplemento na formulação do *spawn* é um método popular e econômico, capaz de fornecer cogumelos mais robustos e menos propensos a contaminação, o que a torna uma opção viável para a produção em escala comercial (Mata et al. 1998, Savoie et al. 2000). Puri (2011) avaliou diferentes proporções de grãos de sorgo, serragem e a combinação entre eles e observou que períodos de corrida do *spawn* eram menores quando utilizaram a combinação de sorgo e serragem em relação ao uso destes materiais isolados. O *spawn* preparado apenas com serragem mostrou menor eficiência biológica e rendimento que formulações com pequenas alíquotas do material.

A utilização da serragem é uma alternativa mais viável à utilização da turfa por conta das questões ecológicas relacionada à extração e exploração da turfa que é um material fóssil não renovável (Limpens et al., 2008). A extração de turfa é uma atividade que causa impactos ambientais significativos, como a degradação de ecossistemas naturais e a emissão de gases do efeito estufa. Além disso, a extração de turfa pode resultar na perda de habitats de espécies animais e vegetais, afetando a biodiversidade.

#### **2.4.3 ESTABILIDADE OU MATURAÇÃO DO MICÉLIO**

Dentro do processo produtivo de *shiitake* em blocos de substrato, o período de incubação é uma fase de extrema importância (Mata & Savoie, 2018). O *shiitake* é conhecido por necessitar de um período relativamente longo de incubação em comparação com outros cogumelos cultivados em substratos. Durante a incubação, ocorrem vários processos, incluindo a colonização do micélio através do substrato, a formação de grumos salientes na superfície do bloco, a produção de uma superfície

castanha (*browning*) e, finalmente, a produção dos primórdios de cogumelos (*pinning*), conforme descrito por Donoghue & Denison (2003).

O *browning* ou produção da capa marrom, é considerado um passo importante para a produção de *shiitake*. Este processo é induzido através da exposição dos blocos de micélio a um fotoperíodo durante a fase de incubação. Alguns estudos demonstram que a intensidade do *browning* pode variar de acordo com a luz, aeração e temperatura (Seo & Koo, 2019) e, pode ser acelerado pela exposição ao oxigênio e à luz (Tang et al., 2013). Algumas atividades enzimáticas são modificadas: enzimas relacionadas com a detecção da luz e à degradação da parede celular do substrato (Yoo et al., 2019; Sousa et al., 2019). O processo de escurecimento desenvolve uma capa marrom de micélio que não só melhora a qualidade dos cogumelos, mas também reduz consideravelmente a contaminação por microrganismos competidores (Chen, 2005). 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.

Durante o período de colonização do substrato a temperatura ideal é 24°C (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.

#### **2.4.4 QUALIDADE DOS BASIDIOMAS**

Os cogumelos comestíveis são considerados fonte de fibra alimentar por possuírem quantidades consideráveis de oligo e os polissacarídeos, tanto na forma solúvel como insolúvel (Cheung, 2013). As fibras são os principais constituintes da parede celular dos fungos, seu teor varia em torno 6-14% do cogumelo, e os polissacarídeos mais abundantes: quitina,  $\alpha$  e  $\beta$ -glucana, eritadenina, manana, xilana e galactana, (Zhang et al., 2012).

O *shiitake* é considerado uma ótima fonte de  $\beta$ -glucanas dentre os cogumelos comestíveis. Este metabólito em *shiitake* é denominado lentinana [ $\beta$ -(1,3)-D-glucan], um exopolissacarídeo, biologicamente ativo, de alto peso molecular com atividade imunomoduladora (Zhang et al., 2011). Este polissacarídeo tem sido reconhecido por suas propriedades funcionais para a saúde humana como atividade anticancerígena,

antiviral, imunomoduladora, antioxidante, antibacteriana e antifúngica (Chang & Miles, 2004; Bisen et al., 2010; Kang et al., 2012).

A qualidade e conteúdo da composição proximal e das substâncias fisiologicamente ativas variam com a linhagem (fatores genéticos) (Dayani et al., 2017; Atila, 2018), e também do substrato de cultivo, suplementação (relação C/N, presença de compostos fenólicos e pH do meio) (Elisashvili et al., 2015; Dayani et al., 2017; Atila, 2018), das condições de cultura e crescimento (Bisen et al., 2010), ou dos processos de pós-colheita dos basidiomas (Xu et al., 2019; Yang et al., 2019).

Diferentes estratégias têm sido adotadas para aumentar a produção de exopolissacarídeos em fungos (Gaitán-Hernández et al., 2019). Segundo o autor, até a presente data, estudos demonstraram que as condições de produção de metabólitos ativos em *shiitake*, diferem dos fatores bióticos e abióticos que estimulam seu crescimento e, são necessários mais estudos para desenvolver estratégias que aumentem a produção destes compostos concomitantemente ao aumento na produtividade dos cogumelos. O autor sugere que há uma grande diversidade de estratégias que podem ser usadas para melhorar a produção de exopolissacarídeos em fungos, como a utilização de diferentes fontes de carbono, alteração das condições de cultivo, modificação genética, entre outras.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Centro de Estudo em Cogumelos (CECOG) da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT/UNESP), utilizando um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com esquema fatorial duplo em duplicata, sendo que cada experimento foi composto por 2 linhagens de *L. edodes* e 7 tipos de inóculo, totalizando 14 tratamentos, cada um com 7 repetições, resultando em um montante de 196 unidades experimentais. Foram realizados dois experimentos, um no ano de 2021, onde metade dos blocos foram abertos aos 75 dias após a inoculação (DAI) e a outra metade aos 87 DAI. O segundo experimento foi realizado no primeiro semestre de 2022 e a abertura dos blocos se deu aos 75 DAI. Nos dois experimentos foram utilizadas as linhagens: LED 19/11 E LED 20/06. O primeiro cultivo perdurou por 115 dias e o segundo por 135 dias, contando do dia da inoculação até o término do segundo e quarto fluxo respectivamente. A Figura 2 a seguir, apresenta o organograma das atividades realizadas.

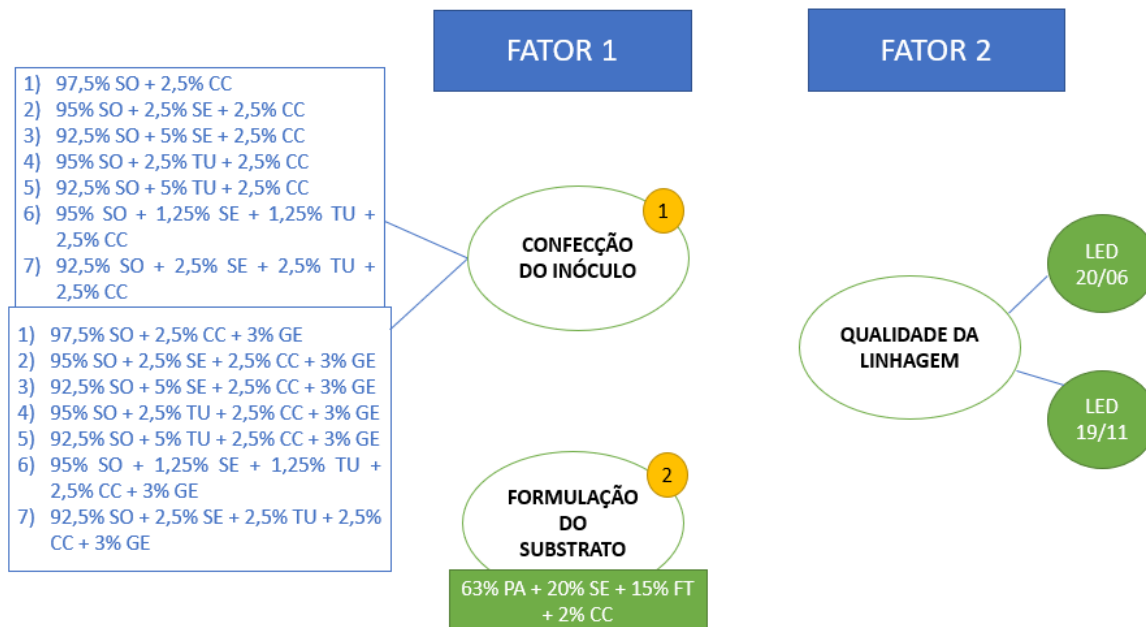


**Figura 2.** Layout do experimento desenvolvido, em esquema fatorial duplo, com a condução de 2 experimentos, tendo como objetivos definir um padrão de qualidade do inóculo, com emprego de substrato a base de gramíneas utilizando tratamento axênico. \*Abreviações: SO - sorgo, CC - carbonato de cálcio, SE - serragem, TU - turfa, PA – palha de arroz, FT - farelo de trigo e LED – *L. edodes*, GE – gesso agrícola.

### 3.1 INÓCULO

As matrizes utilizadas encontravam-se na micoteca do CECOG/FCAT. Foram utilizadas neste experimento duas linhagens identificadas como LED 20/06 e LED 19/11. A linhagem LED 20/06 já havia sido utilizada em experimento prévio no centro de estudo em questão, em substrato a base de gramíneas. A partir deste experimento foi obtida a matriz primária utilizada neste experimento. A escolha da matriz se deu com base em características morfológicas e agronômicas: um exemplar de cogumelo de tamanho grande, com características morfológicas exemplares para a espécie e obtida em unidade experimental altamente produtiva, com presença de focos de contaminação pelo fungo *Trichoderma sp.* A linhagem LED 19/11 foi obtida a partir de experimento realizado no mesmo local, porém utilizando-se substrato a base de serragem. A escolha do exemplar utilizado para isolamento e obtenção da matriz primária se deu utilizando os mesmos princípios citados anteriormente.

A matriz primária foi obtida por meio de um fragmento de cogumelo, disposta em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar) estéril e incubada a 25°C em câmara BOD até completa colonização do substrato pelo fungo. A matriz secundária foi

preparada a partir da repicagem de um disco de 10 mm, contendo o micélio da matriz primária, com auxílio de furador de rolha para uma nova placa contendo meio de cultura DBA estéril. Após a colonização da matriz secundária pelo fungo, é preparada a matriz terciária. Para o preparo da matriz terciária foram cozidos grãos de sorgo em água até que não houvesse resistência mecânica do pericarpo. Após o cozimento a água é drenada e adiciona-se 2,5% de calcita, conforme peso úmido para elevar o pH. Essa mistura é alocada em potes de vidro e esterilizada a 121°C por 4 horas. Em câmara de fluxo, após o resfriamento do material, coloca-se  $\frac{1}{4}$  da matriz secundária no fundo de um pote de vidro também previamente esterilizado e vazio, com o micélio voltado para cima. O micélio deve ser coberto com os grãos preparados até a metade do recipiente. O recipiente foi então levemente tampado e coberto com papel alumínio com o auxílio de um elástico e colocado em câmara BOD a 25°C. Após a colonização da matriz terciária pelo fungo foi preparado o *spawn*. Utilizando grãos de sorgo previamente cozidos e 2,5% de calcita, os materiais referentes a cada tratamento (Tabela 1) foram adicionados. Após a homogeneização dos materiais de cada tratamento, colocou-se 250 g do material em embalagens plásticas de polipropileno de alta densidade (PEAD) com filtro e se seguiu com a autoclavagem por 4 h a 121°C. Após a redução da temperatura, em câmara de fluxo, os tratamentos foram inoculados com 2% de matriz terciária (w/w) e as embalagens foram seladas. Os tratamentos foram mantidos a 25°C em câmara BOD por aproximadamente 20 dias, conforme metodologia de Serna-Díaz et al. (2020) (Figura 3).

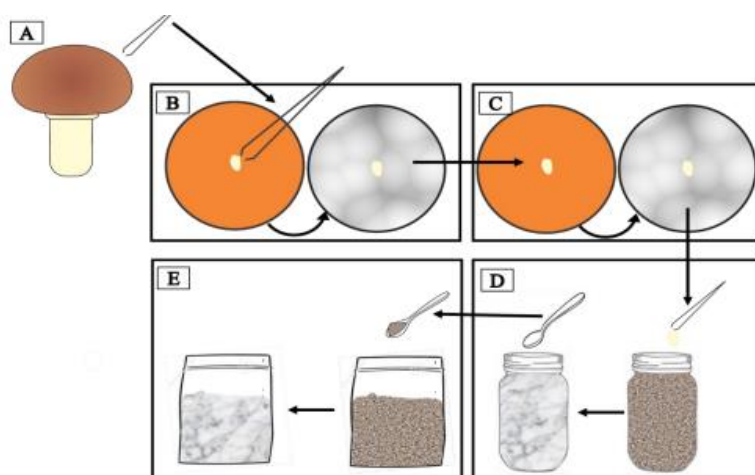


**Figura 3.** Produção de inóculo de *L. edodes* sendo, A: cogumelo; B: matriz primária; C: matriz secundária; D: matriz terciária; E: inóculo. Fonte: Vieira Junior, 2018.

Para a padronização da qualidade do inóculo ou “spawn”, submeteu-se as duas linhagens ao crescimento em 7 formulações diferentes de inóculo, indicadas na tabela 1 a seguir. Ao segundo experimento foram adicionados 3% de gesso a todas as formulações de spawn (w/w) (Figura 3).

**Tabela 1.** Tratamentos utilizados para a padronização da qualidade do inóculo.

| Tratamento | Formulação (%) |     |      |      |
|------------|----------------|-----|------|------|
|            | SO             | CC  | SE   | TU   |
| <b>C</b>   | 97,5           | 2,5 | -    | -    |
| <b>2</b>   | 95             | 2,5 | 2,5  | -    |
| <b>3</b>   | 92,5           | 2,5 | 5    | -    |
| <b>4</b>   | 95             | 2,5 | -    | 2,5  |
| <b>5</b>   | 92,5           | 2,5 | -    | 5    |
| <b>6</b>   | 95             | 2,5 | 1,25 | 1,25 |
| <b>7</b>   | 92,5           | 2,5 | 2,5  | 2,5  |

SO: Grãos de sorgo; CC: Carbonato de cálcio; SE: Serragem; TU: Turfa negra.

### 3.2 SUBSTRATO

O substrato base consiste numa mistura de palha de arroz (*Oryza sativa*), cultivada sob condições de sequeiro na própria FCAT campus Dracena, e cedida pelo Prof. Dr. Samuel Ferrari. A palha foi triturada (granulometria de 0,5 cm) e foram adicionados 20% de serragem, 15% de farelo de trigo e 2% de carbonato de cálcio (peso seco). O substrato foi homogeneizado, acrescido de água até atingir 65% de umidade e acondicionado em sacos PEAD com filtro, na quantidade de 2 kg por embalagem. O substrato foi comprimido com auxílio de prensa mecânica, propriamente adaptada para o volume da embalagem, para correta padronização dos blocos e autoclavados por 4h a 121 °C. Após o resfriamento, o substrato foi inoculado com 2% de spawn (w/w) e as embalagens foram seladas. Os tratamentos foram mantidos a 25°C em câmara climática. A análise química do substrato está apresentada na tabela 2 a seguir.

**Tabela 2.** Análise química do substrato utilizado, anteriormente à autoclavagem.

| Unidade          | %  |      | Relação | (g/kg) |     |     |     | (mg/kg) |   |    |      | µS  |     |     |                  |
|------------------|----|------|---------|--------|-----|-----|-----|---------|---|----|------|-----|-----|-----|------------------|
| Amostra          | C  | N    | C:N     | N      | P   | Ca  | Mg  | S       | B | Cu | K    | Fe  | Mn  | Zn  | PH Condutividade |
| <b>Substrato</b> | 44 | 1,04 | 42,5    | 10     | 2,6 | 6,3 | 3,3 | 1,7     | 8 | 28 | 11,7 | 357 | 357 | 377 | 6,1 2668         |

Após a homogeneização e adição de água, foram alocados 2 kg da mistura em sacos de polipropileno autoclaváveis com as medidas 42 x 12 x 22 cm, contendo filtro,

necessário para as trocas gasosas entre o fungo e o meio, visto que o fungo em questão é um organismo aeróbio. Em seguida, os sacos foram selados e submetidos a autoclavagem, por 4 h à 121°C.

### **3.3 INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO**

Após a redução da temperatura, os blocos foram inoculados com 2% de inóculo (w/w) das duas linhagens, em relação ao peso úmido do substrato, em câmara de fluxo laminar. Sendo assim, os sacos foram incubados em câmara de alvenaria à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa de 70%, na ausência de luz. Metade dos blocos do primeiro experimento permaneceram na câmara por um período de 75 dias e a outra metade por 87 dias; os blocos do segundo experimento permaneceram por um período de 75 dias.

### **3.4 MATURAÇÃO**

Foram realizados descolamentos, prática que consiste em descolar cuidadosamente o substrato da parede do saco, sem abri-los. Este manejo se deu apenas uma vez para os blocos abertos aos 75 dias do primeiro experimento e duas vezes para os blocos abertos aos 87 dias. No segundo experimento esta prática se deu a partir da completa colonização do substrato pelo fungo, em intervalos de aproximadamente 15 dias até o final do período de incubação.

Ao final do período de incubação, ou seja, quando o micélio de *L. edodes* colonizou completamente o substrato, ocorreu a maturação. Neste momento ocorre um espessamento da capa micelial que envolve o substrato e há a liberação de diversos exsudados enzimáticos. Quando a coloração do micélio se modifica de branco para marrom escuro, é um indicativo de que os blocos podem ser submetidos à fase de frutificação (Gong et al., 2014).

### **3.5 FRUTIFICAÇÃO**

Para a indução à frutificação, os blocos de substrato foram retirados dos sacos e lavados com água corrente para eliminar os exsudatos. Posteriormente, foram enumerados e casualizados na câmara de produção e mantidos em câmara climática a  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  e 85% a 90% de UR. Esta câmara não bloqueava a luz do sol, condicionando os blocos ao fotoperíodo natural do dia, prática necessária para incentivar o desenvolvimento de cogumelos (Mata & Savoie, 2018). Após a colheita do primeiro fluxo, os blocos foram submersos em água por aproximadamente 8 horas,

com o objetivo de induzir a frutificação dos fluxos subsequentes, segundo metodologia de Kobayashi et al. (2020).

### **3.6 COLHEITA**

A colheita foi realizada manualmente, com um corte rente ao bloco sem deixar resíduos do tecido. Foram colhidos somente os cogumelos no ponto ideal de colheita, sendo este indicado pelo estágio de desenvolvimento do píleo (parcialmente aberto). Por fim, os cogumelos foram desidratados a 40°C por 36 horas, em desidratador próprio para o processo, com as características: velocidade do ar de 1m/s e 15% de renovação de ar (Zied et al., 2017).

### **3.7 VARIÁVEIS AVALIADAS**

#### **3.7.1 CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS**

Os cogumelos colhidos foram contados e pesados para a avaliação de: precocidade (rendimento na primeira metade do tempo total de colheita / rendimento no tempo total de colheita x 100, expresso em porcentagem), o tempo para o 1º fluxo (dias da inoculação até a primeira colheita), a produtividade do 1º, 2º, 3º fluxo e total (massa fresca dos cogumelos (g)/peso do substrato inicial úmido (g) x 100, expresso em porcentagem), taxa de produtividade (eficiência biológica / tempo em dias requeridos para a colheita), a eficiência biológica (peso fresco de cogumelos/peso seco do substrato inicial x 100, expresso em porcentagem), o número (contagem manual(u)) e a massa dos basidiomas (massa fresca dos cogumelos/número de cogumelos, expresso em gramas) seguindo as metodologias apresentadas por Zied et al. (2013) e Pardo-Giménez et al. (2012).

Também foi considerado o período de produção (PP), número de colheitas e o tamanho dos cogumelos colhidos de acordo com o diâmetro do píleo: Grupo 1 (G1) < 5 cm, grupo 2 (G2) 5 – 9,9 cm e grupo 3 (G3) 10 – 15 cm.

#### **3.7.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SUBSTRATO**

O substrato à base de palha de arroz foi avaliado antes do tratamento sanitário (esterilização) e ao final do cultivo (substrato exaurido), quanto aos teores de macro e micronutrientes, pH e condutividade elétrica.

#### **3.7.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA**

Para as avaliações morfológicas, 20 cogumelos de cada linhagem foram selecionados de forma aleatória, no ponto de colheita recomendado e os seguintes parâmetros foram avaliados: comprimento total do cogumelo, do píleo e do estipe, largura do estipe, da base do estipe e do píleo e largura do véu. As medidas foram realizadas conforme a figura 4, utilizando um paquímetro digital (Paquímetro Digital 150 mm Mitutoyo®), com precisão de 0,1 mm.

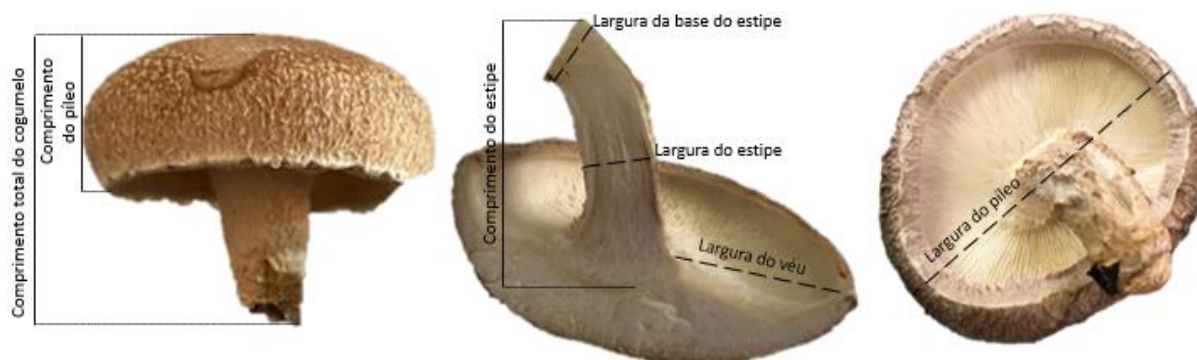


**Figura 4.** Avaliação das características morfológicas de cogumelos de linhagens de *L. edodes*.

#### 3.7.4 OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO LENTINANA

Os extratos de polissacarídeos das amostras do basidioma (formulação de *spawn* x estirpe) foram obtidos por extração assistida por micro-ondas (MAE), segundo metodologia proposta por Aguiló-Aguayo et al. (2017). As experiências foram realizadas em tubos de Teflon (55 mL de capacidade) contendo os basidiomas, liofilizados e peneirados em partículas de 30 *mesh*, e 15 mL de H<sub>2</sub>O MilliQ, numa razão biomassa/solvente de 1:15 (g/mL). Uma vez preparadas as misturas, cada frasco foi devidamente selado e colocado no rotor do equipamento para irradiação, o que foi realizado em 2 fases. Na primeira fase, chamada aquecimento, os tubos foram submetidos a um conjunto de potência no planeamento durante 5 min para que a solução + amostra atingisse a temperatura determinada no desenho experimental. Na segunda fase, chamada fase de extração, a temperatura definida na planificação foi mantida constante durante o tempo pré-determinado, utilizando a potência da 1ª fase.

Após a irradiação, os tubos foram imediatamente arrefecidos (~15 min), e os materiais centrifugados (6000 rpm, 15 min, 20 °C) para separar os resíduos. As fracções de polissacarídeos foram recuperadas por precipitação dos extratos aquosos com etanol (1:1, v/v), centrifugação nas mesmas condições que acima, e liofilização (Figura 5). Todas as experiências foram realizadas em triplicado, de forma aleatória.

Depois disso, os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RNM) das diferentes frações foram obtidos utilizando um espectrômetro modelo Bruker Advance III de 400 MHz com uma sonda inversa de 5 mm, e as análises foram realizadas a 70 °C. As amostras (30 mg) foram dissolvidas em Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub> e foram centrifugadas (10.000 rpm, 22 °C, 2 min) para remover material insolúvel, por isso apenas as frações solúveis foram analisadas. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm ( $\delta$ ) relativamente a Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub> a 70°C (13C) e 50°C (HSQC-DEPT).

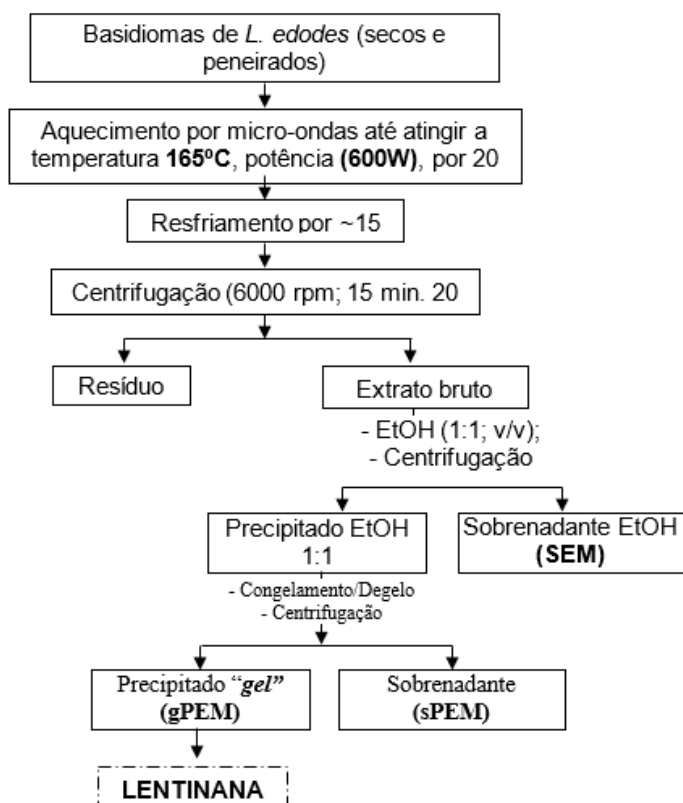


**Figura 5.** Esquema de obtenção de lentinana a partir de basidioma de *L. edodes*, através de extração assistida por micro-ondas.

#### 4. RESULTADOS

Aos 75 dias após a inoculação, os blocos do primeiro experimento ainda não haviam apresentado formação da capa marrom, nem presença de exsudatos, por isso apenas metade dos blocos foram abertos, e seguiu-se com os procedimentos de indução à frutificação: lavagem e incubação em sala de frutificação com temperatura reduzida para  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  e 85% a 90% de UR. A lavagem foi cuidadosamente realizada, pois a capa micelial de coloração ainda branca, se apresentava de forma fina e frágil. Estes blocos apesar de apresentarem crescimento vegetativo, não apresentaram formação da capa marrom e, não foram capazes de desenvolver basidiomas para

nenhuma das linhagens testadas. Simultaneamente, na outra metade dos blocos do primeiro experimento realizou-se um descolamento das embalagens plásticas e, em seguida, foram mantidos a temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Aos 87 dias, a outra metade dos blocos do primeiro experimento foram abertos. Estes já apresentavam capa marrom, que iniciara em pequenas manchas, e ao final cobriram toda a superfície do bloco, indicando a maturidade do micélio. Aos 75 dias após a inoculação, os blocos do segundo experimento, submetidos a descolamentos a cada 15 dias a partir da data de inoculação já apresentavam capa marrom formada (Figura 6), e presença de exsudatos, indicando a maturação do micélio e, portanto, procedeu-se a abertura dos blocos e indução da frutificação em sala de frutificação.

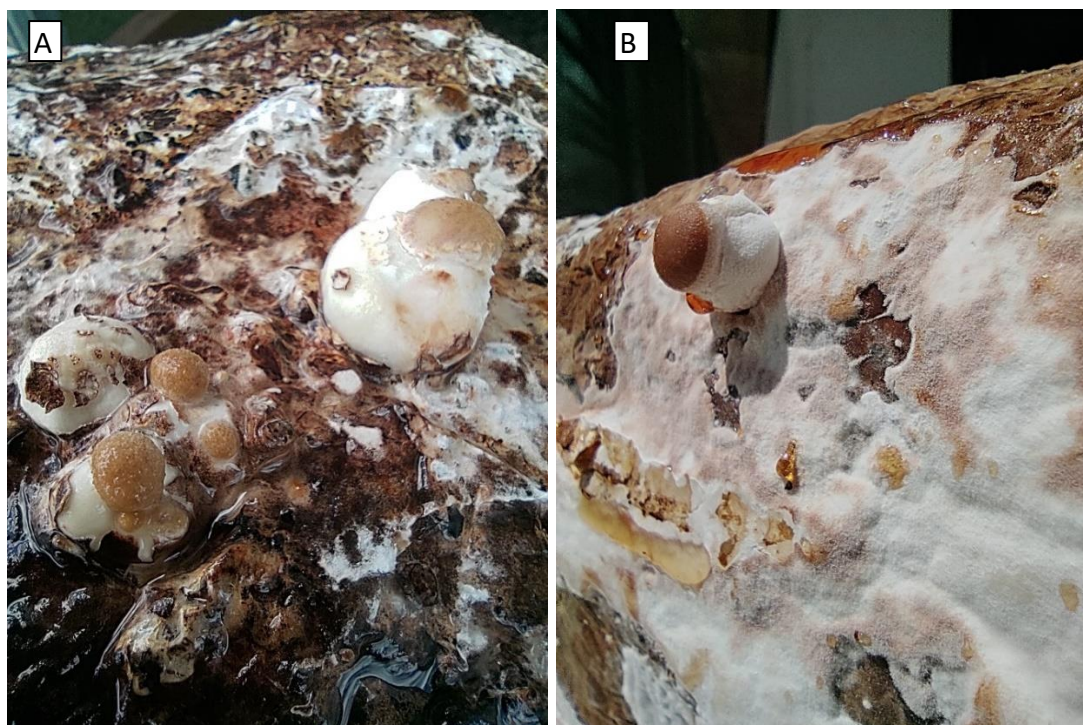


**Figura 6 (A e B).** Estado de maturação dos blocos de *L. edodes*, ao final do período de incubação, onde é possível ver a capa marrom formada e primórdios. Fotos: Autora, 2022.

#### **4.1 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA**

A Tabela 3 mostra o efeito das diferentes formulações de *spawn* sobre a morfologia dos cogumelos, para cada linhagem avaliada. Verificou-se diferenças significativas na morfologia dos cogumelos nos dois períodos de incubação adotados, de forma específica para cada linhagem e tratamento de *spawn*. Os cogumelos exibiram maiores médias em todas as variáveis morfológicas avaliadas, quando

adotou-se período de incubação de 75 dias e apresentou resultados específicos de acordo com as combinações de linhagem e tratamento do inóculo (Tabela 3).

De modo geral, os resultados morfológicos do menor período de incubação (75 dias) sofreram menor influência específica de acordo com o tratamento, do que os resultados com maior período de incubação (87 dias). Com PI75, a linhagem LED 19/11 sofreu menor influência dos tratamentos em relação a linhagem LED 20/06 para os parâmetros morfológicos avaliados (Tabela 3).

A largura do píleo variou de 38,11 a 77,38 cm; a altura do píleo (15,74 a 31,8 cm); a largura do estipe (7,41 a 16,86 cm); Altura do estipe (23,52 a 48,04 cm); Largura da base do estipe (8,09 a 14,12 cm); Largura do véu (14,13 a 29,15 cm); Comprimento total (31,46 a 64,92 cm) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Características morfológicas de basidiocarpos de duas linhagens de *L. edodes* sob 7 formulações de *spawn* e submetidos a dois períodos de incubação.

| PI                     | 87                   |                      | Média                | 75                |                        | Média               |
|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|------------------------|---------------------|
| L                      | LED 19/11            | LED 20/06            |                      | LED 19/11         | LED 20/06              |                     |
| Largura do píleo (cm)  |                      |                      |                      |                   |                        |                     |
| C                      | 38,11 <sup>b</sup>   | 45,22 <sup>c</sup>   | 43,45 <sup>c</sup>   | 63,53             | 58,43 <sup>b</sup>     | 61,05 <sup>b</sup>  |
| T2                     | 52,21 <sup>ab</sup>  | 48,50 <sup>bc</sup>  | 50,62 <sup>bc</sup>  | 68,53             | 77,05 <sup>a</sup>     | 72,44 <sup>a</sup>  |
| T3                     | 50,66 <sup>ab</sup>  | 47,43 <sup>bc</sup>  | 48,28 <sup>bc</sup>  | 69,25             | 68,15 <sup>ab</sup>    | 68,72 <sup>ab</sup> |
| T4                     | 51,97 <sup>ab</sup>  | 56,35 <sup>abc</sup> | 54,11 <sup>ab</sup>  | 73,8              | 65,27 <sup>ab</sup>    | 69,03 <sup>ab</sup> |
| T5                     | 56,64 <sup>B a</sup> | 68,83 <sup>A a</sup> | 62,58 <sup>a</sup>   | 77,38             | 70,20 <sup>ab</sup>    | 73,6 <sup>a</sup>   |
| T6                     | 64,86 <sup>a</sup>   | 60,49 <sup>ab</sup>  | 62,73 <sup>a</sup>   | 73,57             | 74,07 <sup>a</sup>     | 73,81 <sup>a</sup>  |
| T7                     | 59,96 <sup>a</sup>   | 57,18 <sup>abc</sup> | 58,61 <sup>ab</sup>  | 73,16             | 70,28 <sup>ab</sup>    | 71,24 <sup>ab</sup> |
| Média                  | 53,49                | 54,86                |                      | 71,32             | 69,06                  |                     |
| CV (%)                 | 26,44                |                      |                      | 20,8              |                        |                     |
| Altura do píleo (cm)   |                      |                      |                      |                   |                        |                     |
| C                      | 15,74 <sup>b</sup>   | 19,46 <sup>b</sup>   | 48,53 <sup>d</sup>   | 27,52             | 24,56 <sup>bc</sup>    | 26,08               |
| T2                     | 22,95 <sup>a</sup>   | 21,04 <sup>b</sup>   | 22,13 <sup>bcd</sup> | 28,36             | 31,1 <sup>a</sup>      | 29,62               |
| T3                     | 20,05 <sup>ab</sup>  | 20,38 <sup>b</sup>   | 20,19 <sup>cd</sup>  | 26,86             | 30,01 <sup>ab</sup>    | 28,4                |
| T4                     | 23,67 <sup>a</sup>   | 20,81 <sup>b</sup>   | 22,28 <sup>bcd</sup> | 30,8 <sup>A</sup> | 23,6 <sup>B c</sup>    | 26,77               |
| T5                     | 25,30 <sup>B a</sup> | 31,14 <sup>A a</sup> | 28,15 <sup>a</sup>   | 28,93             | 30,7 <sup>a</sup>      | 29,86               |
| T6                     | 26,13 <sup>a</sup>   | 25,57 <sup>ab</sup>  | 25,86 <sup>ab</sup>  | 28,01             | 28,04 <sup>abc</sup>   | 28,02               |
| T7                     | 25,80 <sup>A a</sup> | 20,79 <sup>B b</sup> | 23,36 <sup>bc</sup>  | 31,8 <sup>A</sup> | 26,34 <sup>B abc</sup> | 28,15               |
| Média                  | 22,8                 | 22,74                |                      | 28,9              | 27,76                  |                     |
| CV (%)                 | 27,73                |                      |                      | 21,16             |                        |                     |
| Largura do estipe (cm) |                      |                      |                      |                   |                        |                     |
| C                      | 8,54 <sup>b</sup>    | 7,41 <sup>c</sup>    | 7,69 <sup>d</sup>    | 12,86             | 13,8                   | 13,31 <sup>b</sup>  |
| T2                     | 9,71 <sup>ab</sup>   | 9,72 <sup>bc</sup>   | 9,72 <sup>abcd</sup> | 15,33             | 16,66                  | 15,94 <sup>ab</sup> |

|                                    |                        |                      |                      |                      |                       |                     |
|------------------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
| T3                                 | 9,67 <sup>ab</sup>     | 8,56 <sup>bc</sup>   | 9,2 <sup>cd</sup>    | 15,2                 | 14,52                 | 14,87 <sup>ab</sup> |
| T4                                 | 10,20 <sup>ab</sup>    | 8,51 <sup>bc</sup>   | 9,38 <sup>bcd</sup>  | 14,92                | 13,35                 | 14,04 <sup>ab</sup> |
| T5                                 | 10,14 <sup>B ab</sup>  | 13,62 <sup>A a</sup> | 11,84 <sup>a</sup>   | 16,51                | 16,00                 | 16,24 <sup>a</sup>  |
| T6                                 | 11,94 <sup>a</sup>     | 10,84 <sup>ab</sup>  | 11,41 <sup>ab</sup>  | 16,20                | 16,86                 | 16,52 <sup>a</sup>  |
| T7                                 | 11,55 <sup>ab</sup>    | 9,82 <sup>bc</sup>   | 10,71 <sup>abc</sup> | 16,56                | 16,05                 | 16,22 <sup>a</sup>  |
| Média                              | 10,25                  | 9,78                 |                      | 15,37                | 15,32                 |                     |
| CV (%)                             | 30,02                  |                      |                      | 25,27                |                       |                     |
| Altura do estipe (cm)              |                        |                      |                      |                      |                       |                     |
| C                                  | 24,41 <sup>b</sup>     | 23,52 <sup>c</sup>   | 23,75 <sup>d</sup>   | 43,29 <sup>A</sup>   | 33,89 <sup>B</sup>    | 38,71               |
| T2                                 | 31,09 <sup>ab</sup>    | 30,71 <sup>bc</sup>  | 30,93 <sup>abc</sup> | 43,76                | 43,63                 | 43,7                |
| T3                                 | 28,97 <sup>ab</sup>    | 30,25 <sup>bc</sup>  | 2,52 <sup>cd</sup>   | 40,70                | 40,93                 | 40,81               |
| T4                                 | 31,89 <sup>ab</sup>    | 28,36 <sup>bc</sup>  | 30,17 <sup>abc</sup> | 40,42                | 36,1                  | 38                  |
| T5                                 | 32,85 <sup>B ab</sup>  | 41,86 <sup>A a</sup> | 37,24 <sup>a</sup>   | 40,75                | 38,57                 | 39,59               |
| T6                                 | 37,39 <sup>a</sup>     | 32,25 <sup>abc</sup> | 34,89 <sup>ab</sup>  | 47,35                | 43,19                 | 45,32               |
| T7                                 | 29,80 <sup>ab</sup>    | 35,34 <sup>ab</sup>  | 32,5 <sup>ab</sup>   | 48,04 <sup>A</sup>   | 34,73 <sup>B</sup>    | 39,16               |
| Média                              | 30,91                  | 31,75                |                      | 43,47 <sup>A</sup>   | 38,72 <sup>B</sup>    |                     |
| CV (%)                             | 33,01                  |                      |                      | 27,38                |                       |                     |
| Largura da base do estipe (cm)     |                        |                      |                      |                      |                       |                     |
| C                                  | 8,09 <sup>c</sup>      | 8,85 <sup>c</sup>    | 8,47 <sup>d</sup>    | 12,39                | 13,2 <sup>ab</sup>    | 12,78               |
| T2                                 | 10,02 <sup>bc</sup>    | 10,41 <sup>bc</sup>  | 10,21 <sup>abc</sup> | 11,02                | 12,34 <sup>ab</sup>   | 11,63               |
| T3                                 | 10,01 <sup>bc</sup>    | 9,21 <sup>c</sup>    | 9,61 <sup>cd</sup>   | 11,63                | 12,47 <sup>ab</sup>   | 12,04               |
| T4                                 | 11,32 <sup>A ab</sup>  | 9,54 <sup>B bc</sup> | 10,43 <sup>bcd</sup> | 11,7                 | 11,17 <sup>b</sup>    | 11,39               |
| T5                                 | 10,43 <sup>B abc</sup> | 12,91 <sup>A a</sup> | 11,67 <sup>ab</sup>  | 11,69 <sup>B</sup>   | 14,12 <sup>A a</sup>  | 12,97               |
| T6                                 | 12,79 <sup>a</sup>     | 11,73 <sup>ab</sup>  | 12,26 <sup>a</sup>   | 12,43                | 12,87 <sup>ab</sup>   | 12,64               |
| T7                                 | 10,77 <sup>ab</sup>    | 10,60 <sup>abc</sup> | 10,68 <sup>abc</sup> | 12,04                | 12,41 <sup>ab</sup>   | 12,28               |
| Média                              | 10,6                   | 10,44                |                      | 11,84 <sup>B</sup>   | 12,65 <sup>A</sup>    |                     |
| CV (%)                             | 30,02                  |                      |                      | 18,19                |                       |                     |
| Largura do véu (cm)                |                        |                      |                      |                      |                       |                     |
| C                                  | 14,13 <sup>b</sup>     | 18,00 <sup>b</sup>   | 17,03 <sup>d</sup>   | 21,84 <sup>b</sup>   | 19,02 <sup>b</sup>    | 20,46 <sup>b</sup>  |
| T2                                 | 22,01 <sup>a</sup>     | 18,27 <sup>b</sup>   | 20,41 <sup>bcd</sup> | 23,42 <sup>ab</sup>  | 25,11 <sup>a</sup>    | 24,19 <sup>ab</sup> |
| T3                                 | 19,42 <sup>ab</sup>    | 17,53 <sup>b</sup>   | 18,61 <sup>cd</sup>  | 24,40 <sup>ab</sup>  | 23,47 <sup>ab</sup>   | 23,95 <sup>ab</sup> |
| T4                                 | 20,36 <sup>ab</sup>    | 22,69 <sup>ab</sup>  | 21,5 <sup>abcd</sup> | 25,94 <sup>ab</sup>  | 23,78 <sup>ab</sup>   | 24,74 <sup>ab</sup> |
| T5                                 | 23,61 <sup>a</sup>     | 27,43 <sup>a</sup>   | 25,47 <sup>a</sup>   | 29,15 <sup>A a</sup> | 23,32 <sup>B ab</sup> | 26,08 <sup>a</sup>  |
| T6                                 | 24,12 <sup>a</sup>     | 24,55 <sup>ab</sup>  | 24,33 <sup>ab</sup>  | 25,3 <sup>ab</sup>   | 25,8 <sup>a</sup>     | 25,54 <sup>a</sup>  |
| T7                                 | 24,22 <sup>a</sup>     | 21,43 <sup>ab</sup>  | 22,86 <sup>abc</sup> | 24,6 <sup>ab</sup>   | 23,84 <sup>ab</sup>   | 24,09 <sup>ab</sup> |
| Média                              | 21,12                  | 21,41                |                      | 24,95                | 23,48                 |                     |
| CV (%)                             | 32,44                  |                      |                      | 25,27                |                       |                     |
| Comprimento total do cogumelo (cm) |                        |                      |                      |                      |                       |                     |
| C                                  | 34,45 <sup>b</sup>     | 31,46 <sup>c</sup>   | 32,21 <sup>d</sup>   | 55,59 <sup>A</sup>   | 43,05 <sup>B b</sup>  | 49,48 <sup>b</sup>  |
| T2                                 | 42,03 <sup>ab</sup>    | 41,63 <sup>bc</sup>  | 41,86 <sup>abc</sup> | 57,1                 | 59,48 <sup>a</sup>    | 58,18 <sup>ab</sup> |
| T3                                 | 36,64 <sup>b</sup>     | 40,06 <sup>bc</sup>  | 38,11 <sup>cd</sup>  | 54,45                | 56,34 <sup>a</sup>    | 55,37 <sup>ab</sup> |
| T4                                 | 41,67 <sup>ab</sup>    | 39,34 <sup>bc</sup>  | 40,54 <sup>bcd</sup> | 56,28                | 50,01 <sup>ab</sup>   | 52,78 <sup>ab</sup> |

|               |                       |                      |                      |                    |                       |                     |
|---------------|-----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|
| <b>T5</b>     | 44,50 <sup>B ab</sup> | 55,08 <sup>A a</sup> | 49,65 <sup>a</sup>   | 56,92              | 53,61 <sup>ab</sup>   | 55,17 <sup>ab</sup> |
| <b>T6</b>     | 50,55 <sup>a</sup>    | 45,46 <sup>ab</sup>  | 48,07 <sup>ab</sup>  | 62,35              | 56,32 <sup>a</sup>    | 59,41 <sup>a</sup>  |
| <b>T7</b>     | 42,17 <sup>ab</sup>   | 46,64 <sup>ab</sup>  | 44,35 <sup>abc</sup> | 64,92 <sup>A</sup> | 49,37 <sup>B ab</sup> | 54,55 <sup>ab</sup> |
| <b>Média</b>  | 41,71                 | 36,54                |                      | 57,42 <sup>A</sup> | 52,6 <sup>B</sup>     |                     |
| <b>CV (%)</b> | 27,96                 |                      |                      | 22,5               |                       |                     |

L: Linhagem; PI: Período de incubação; LED: *Lentinula edodes*. Os valores são médias e  $\pm$  são desvios padrão. As médias seguidas de letras minúsculas indicam diferença estatística de acordo com Tukey ( $p < 0,05$ ) e as letras maiúsculas indicam diferença significativa de acordo com o teste "t" ( $p < 0,05$ ).

Os cogumelos foram divididos em três grupos de acordo com o tamanho do píleo (G1 < 5 cm, G2 5 - 9,9 cm e G3 10-15 cm) e, com exceção da linhagem LED 19/11, tratamentos 1, 2, 4 e 7 e da linhagem LED 20/06, tratamentos 1 e 3 que não produziram cogumelos do G3. Comparando-se as duas linhagens avaliadas, o grupo de tamanho mais representativo foi G2 (52,39 a 90,71%), com exceção do IP (C) (>54%) mais representado pelo grupo G1 para a linhagem LED 20/06. O grupo G2 também foi mais representativo em todos os tratamentos quando a abertura dos blocos se deu aos 75 DAI (76 a 100%) em comparação com a abertura dos blocos aos 87 DAI, onde os tratamentos 1 (>77%), 2 (>58%) e 3 (>56%) tiveram expressão no grupo G1 e os tratamentos 4 (>72%), 5 (> 69%), 6 (>74%) e 7 (>56%), majoritariamente no grupo G2 (Tabela 4).

A soma das porcentagens médias de G1 e G2, obtidas de todas as cepas, para cada formulação de *spawn*, representou 100% em C, 97,36% em T2, 98,7% em T3, T4 e T7, 93,62% em T5 e 94,87% em T6 (Tabela 4).

**Tabela 4.** Distribuição por grupo de tamanho de duas linhagens de *L. edodes*, sob 7 formulações de *spawn* em substrato axênico a base de palha de arroz

| Linhagem  | PI | TR           | Produção por cada grupo de tamanho (%) <sup>1</sup> |       |      |
|-----------|----|--------------|-----------------------------------------------------|-------|------|
|           |    |              | G1                                                  | G2    | G3   |
| LED 19/11 | 75 | 1            | 10                                                  | 90    | -    |
|           |    | 2            | 5                                                   | 95    | -    |
|           |    | 3            | 20                                                  | 75    | 5    |
|           |    | 4            | -                                                   | 100   | -    |
|           |    | 5            | -                                                   | 85    | 15   |
|           |    | 6            | -                                                   | 90    | 10   |
|           |    | 7            | -                                                   | 100   | -    |
|           |    | <b>Média</b> | 5                                                   | 90,71 | 4,28 |
|           | 87 | 1            | 83,33                                               | 16,67 | -    |

|                  |              |       |       |       |
|------------------|--------------|-------|-------|-------|
|                  | 2            | 50    | 50    | -     |
|                  | 3            | 40    | 60    | -     |
|                  | 4            | 40    | 60    | -     |
|                  | 5            | 40    | 60    | -     |
|                  | 6            | 15    | 85    | -     |
|                  | 7            | 35    | 65    | -     |
|                  | <b>Média</b> | 43,33 | 56,67 | 0     |
|                  | 1            | 36,84 | 63,16 | -     |
|                  | 2            | -     | 89,47 | 10,53 |
|                  | 3            | 5,26  | 94,74 | -     |
| 75               | 4            | -     | 94,74 | 5,26  |
|                  | 5            | 10,53 | 89,47 | -     |
|                  | 6            | -     | 94,74 | 5,26  |
|                  | 7            | -     | 100   | -     |
| <b>LED 20/06</b> | <b>Média</b> | 7,52  | 89,47 | 3,01  |
|                  | 1            | 72,22 | 27,78 | -     |
|                  | 2            | 66,67 | 33,33 | -     |
|                  | 3            | 73,33 | 26,67 | -     |
| 87               | 4            | 15,79 | 84,21 | -     |
|                  | 5            | 10,53 | 78,94 | 10,53 |
|                  | 6            | 31,58 | 68,42 | -     |
|                  | 7            | 47,37 | 47,37 | 5,26  |
|                  | <b>Média</b> | 45,35 | 52,39 | 2,25  |

<sup>1</sup> Grupos de tamanho de píleo de acordo com o diâmetro: G1 < 5 cm, G2 5 - 9,9 cm e G3 10-15 cm. PI: Período de incubação.

As figuras 7 e 8 a seguir detalham como se deu esta relação da distribuição dos 3 grupos de tamanhos de basidiomas definidos com base no diâmetro do píleo. É possível observar na figura 7 que quando o período de incubação é de 75 dias prevalece o grupo de tamanho G2 e nos tratamentos 2, 3, 4, 5 e 6 o grupo G3 aparece, porém com pouca expressão. Já na figura 8, onde está representado o maior período de incubação (87 dias), o grupo G1, ou seja, cogumelos de menos de 5 centímetros possui significativa presença, portanto conclui-se que o maior período de incubação avaliado neste estudo forneceu no geral cogumelos menores que o menor tempo de incubação.

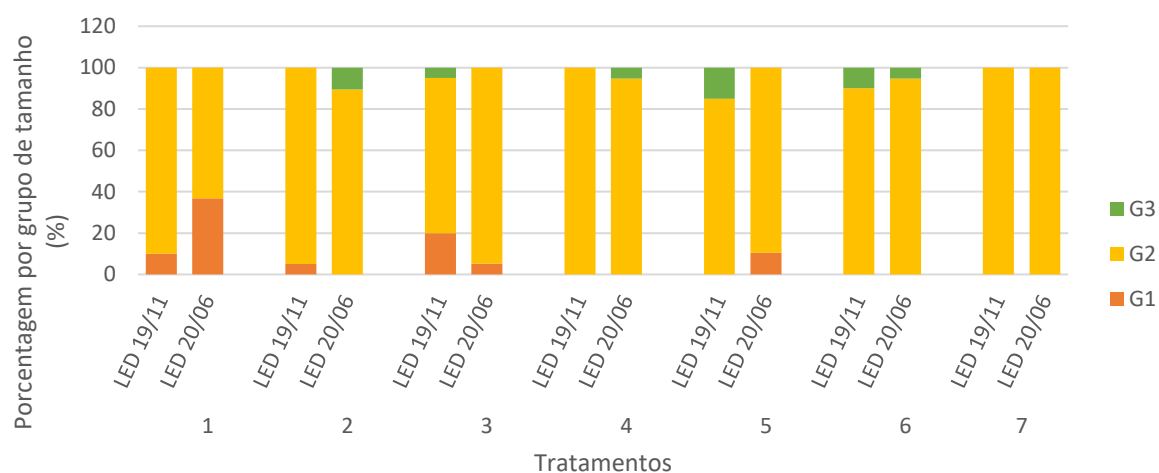


**Figura 7.** Gráfico representativo dos grupos<sup>1</sup> de tamanho de basidiomas de duas linhagens de *L. edodes*, sob 7 formulações de *spawn*, obtidos após período de incubação de 75 dias.

<sup>1</sup> Grupos de tamanho de píleo de acordo com o diâmetro: G1 < 5 cm, G2 5 - 9,9 cm e G3 10-15 cm.



**Figura 8.** Gráfico representativo dos grupos<sup>1</sup> de tamanho de basidiomas de duas linhagens de *L. edodes*, sob 7 formulações de *spawn*, obtidos após período de incubação de 87 dias.

<sup>1</sup> Grupos de tamanho de píleo de acordo com o diâmetro: G1 < 5 cm, G2 5 - 9,9 cm e G3 10-15 cm.

## 4.2 AVALIAÇÃO AGRONÔMICA

A influência da formulação do *spawn* nos dias requeridos para a primeira colheita (DPC) e no período de produção (PP), é mostrado na Tabela 5. Foi necessário um período de 82 a 115 dias para que as linhagens produzissem os primeiros

basidiomas. O período de produção foi consideravelmente menor (13 a 40 dias), quando o período de incubação foi maior (87 dias), em relação a quando a abertura dos blocos se deu aos 75 DAI (82 a 115 dias).

A média de dias necessários para a primeira colheita (DPC) foi de 88, 96, 94, 92, 96, 98 e 99 para C, T2, T3, T4, T5, T6 e T7 respectivamente. A linhagem LED 20/06 levou menos tempo para iniciar a colheita (82 a 108 dias), do que a linhagem LED 19/11 (88 a 115 dias). Apesar do período maior de incubação (87 dias), os resultados indicaram início mais precoce da produção (87 a 94 dias) em relação ao menor período de incubação (82 a 115 dias). Nota-se também que o maior período de incubação, implicou em peso médio inferior (334,8 g) ao menor período de incubação (504 g).

O peso médio total de cogumelos frescos para o maior período de incubação foi significativamente afetado pelo tratamento (GL = 6, F = 7,43 e p = 0,00) e pela interação linhagem e tratamento (GL = 6, F = 2,43 e p = 0,03) e o peso médio total de cogumelos frescos no menor período de incubação foi afetado pela interação linhagem e tratamento (GL = 6, F = 2,31 e p = 0,03). No geral variou entre 15 g (C - LED 19/11) a 504 g (T3 - LED 20/06). O número de fluxos obtidos nos experimentos foi de dois para o maior período de incubação e quatro para o menor. A distribuição da produção ao longo dos fluxos mostrou diferentes padrões em cada período de incubação adotados, sendo 94,5 a 97% do total sendo obtido no primeiro fluxo quando PI87 dias e 10 a 14% quando PI75 dias (Tabela 5). Os dados de desvio padrão foram altos em alguns casos, porque a produção de cogumelos foi variável entre amostras.

**Tabela 5.** Análises de variância (ANOVA) para os resultados de produção dos basidiomas colhidos de duas linhagens de *L. edodes* a partir de substrato axênico a base de palha de arroz, inoculado com diferentes formulações de *spawn*.

| PI      | Fator               | Efeito              | GL | F    | p*          |
|---------|---------------------|---------------------|----|------|-------------|
| 75 dias | Produtividade total | Linhagem            | 1  | 0,2  | 0,65        |
|         |                     | Tratamento          | 6  | 0,92 | 0,48        |
|         |                     | Linhagem*tratamento | 6  | 2,31 | <b>0,04</b> |
| 87 dias |                     | Linhagem            | 1  | 1,47 | 0,22        |
|         |                     | Tratamento          | 6  | 7,43 | <b>0,00</b> |
|         |                     | Linhagem*tratamento | 6  | 2,43 | <b>0,03</b> |
| 75 dias | Peso médio total    | Linhagem            | 1  | 0,2  | 0,65        |
|         |                     | Tratamento          | 6  | 0,92 | 0,48        |
|         |                     | Linhagem*tratamento | 6  | 2,31 | <b>0,03</b> |

|         |                          |                      |                     |       |      |      |
|---------|--------------------------|----------------------|---------------------|-------|------|------|
| 87 dias | Massa média de cogumelos | Linhagem             | 1                   | 1,47  | 0,22 |      |
|         |                          | Tratamento           | 6                   | 7,43  | 0,00 |      |
|         |                          | Linhagem*tratamento  | 6                   | 2,43  | 0,03 |      |
| 75 dias |                          | Linhagem             | 1                   | 1,05  | 0,3  |      |
|         |                          | Tratamento           | 6                   | 2,97  | 0,01 |      |
|         |                          | Linhagem*tratamento  | 6                   | 2,6   | 0,02 |      |
| 87 dias |                          | Linhagem             | 1                   | 0,003 | 0,95 |      |
|         |                          | Tratamento           | 6                   | 7,79  | 0,00 |      |
|         |                          | Linhagem*tratamento  | 6                   | 4,09  | 0,00 |      |
| 75 dias |                          | Eficiência Biológica | Linhagem            | 1     | 0,23 | 0,62 |
|         |                          |                      | Tratamento          | 6     | 0,87 | 0,51 |
|         |                          |                      | Linhagem*tratamento | 6     | 2,27 | 0,04 |
| 87 dias | Linhagem                 |                      | 1                   | 1,47  | 0,22 |      |
|         | Tratamento               |                      | 6                   | 7,43  | 0,00 |      |
|         | Linhagem*tratamento      |                      | 6                   | 2,43  | 0,03 |      |
| 75 dias | Taxa de produção         | Linhagem             | 1                   | 0,32  | 0,57 |      |
|         |                          | Tratamento           | 6                   | 1,46  | 0,19 |      |
|         |                          | Linhagem*tratamento  | 6                   | 3,78  | 0,00 |      |
| 87 dias |                          | Linhagem             | 1                   | 1,82  | 0,18 |      |
|         |                          | Tratamento           | 6                   | 7,34  | 0,00 |      |
|         |                          | Linhagem*tratamento  | 6                   | 2,56  | 0,02 |      |
| 75 dias | Precocidade              | Linhagem             | 1                   | 3,78  | 0,05 |      |
|         |                          | Tratamento           | 6                   | 1,59  | 0,15 |      |
|         |                          | Linhagem*tratamento  | 6                   | 0,71  | 0,63 |      |
| 87 dias |                          | Linhagem             | 1                   | 1,17  | 0,28 |      |
|         |                          | Tratamento           | 6                   | 1,74  | 0,12 |      |
|         |                          | Linhagem*tratamento  | 6                   | 0,47  | 0,82 |      |

PI: Período de incubação; \*p valores < 0,05 foram considerados significantes.

**Tabela 6.** Produção de duas linhagens de *L. edodes*, sob 7 diferentes formulações de spawn, submetidos a dois períodos de incubação.

| PI        | L                | TR       | PP | DPC                 | Peso médio total (g) <sup>1</sup> | Produção por fluxo (%) <sup>2</sup> |       |       |       |
|-----------|------------------|----------|----|---------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|
|           |                  |          |    |                     |                                   | 1º                                  | 2º    | 3º    | 4º    |
| <b>87</b> | <b>LED 20/06</b> | <b>C</b> | 14 | 89 ± 3              | 96,5 <sup>ab</sup> ± 46,95        | 100                                 | 0     | ----- | ----- |
|           |                  | <b>2</b> | 15 | 87 ± 0              | 118,25 <sup>ab</sup> ± 41,24      | 100                                 | 0     | ----- | ----- |
|           |                  | <b>3</b> | 13 | 92 ± 4              | 33 <sup>B b</sup> ± 6,29          | 100                                 | 0     | ----- | ----- |
|           |                  | <b>4</b> | 31 | 87 ± 0              | 319,17 <sup>a</sup> ± 52,6        | 89,75                               | 10,25 | ----- | ----- |
|           |                  | <b>5</b> | 31 | 89 ± 3              | 198,43 <sup>B ab</sup> ± 103,51   | 94,94                               | 5,06  | ----- | ----- |
|           |                  | <b>6</b> | 39 | 94 <sup>A</sup> ± 7 | 239,6 <sup>a</sup> ± 161,88       | 89,09                               | 12,91 | ----- | ----- |
|           |                  | <b>7</b> | 40 | 94 ± 3              | 198,14 <sup>B ab</sup> ± 182,34   | 89,38                               | 10,62 | ----- | ----- |

|       |              |    |       |                          |                                   |       |       |       |       |
|-------|--------------|----|-------|--------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|       | Média        | 26 | 90,58 | 181,92                   | 94,5                              | 5,5   | ----  | ----  |       |
|       | LED<br>19/11 | C  | 15    | 94 ± 3                   | 15 <sup>c</sup> ± 8,29            | 100   | 0     | ----  | ----  |
|       |              | 2  | 18    | 89 ± 4                   | 103 <sup>bc</sup> ± 70,92         | 100   | 0     | ----  | ----  |
|       |              | 3  | 17    | 89 ± 4                   | 172,6 <sup>A ab</sup> ±<br>109,24 | 100   | 0     | ----  | ----  |
|       |              | 4  | 32    | 87 ± 3                   | 221,5 <sup>ab</sup> ± 78,3        | 99,57 | 0,43  | ----  | ----  |
|       |              | 5  | 34    | 92 ± 6                   | 326 <sup>A a</sup> ± 104,74       | 90,73 | 9,27  | ----  | ----  |
|       |              | 6  | 33    | 88 <sup>B</sup> ± 3      | 301,83 <sup>ab</sup> ±<br>160,86  | 92,96 | 7,04  | ----  | ----  |
|       |              | 7  | 37    | 90 ± 5                   | 334,8 <sup>A a</sup> ±<br>79,89   | 92,98 | 7,02  | ----  | ----  |
| Média |              | 26 | 89,78 | 213,54                   | 97                                | 3     | ----  | ----  |       |
| C.V.  |              |    | 4,78  | 35,6 *                   |                                   |       |       |       |       |
| 75    | LED<br>20/06 | 1  | 80    | 82 ± 8                   | 327,5 <sup>ab</sup> ± 63,99       | 24,75 | 5,79  | 18,3  | 51,16 |
|       |              | 2  | 76    | 107 ±<br>23              | 348,12 <sup>ab</sup> ±<br>162,97  | 9,09  | 12,35 | 10,35 | 68,2  |
|       |              | 3  | 79    | 84 <sup>B</sup> ± 9      | 504,00 <sup>B a</sup> ± 75        | 15,14 | 12,31 | 32,99 | 39,56 |
|       |              | 4  | 80    | 87 ± 20                  | 256,6 <sup>b</sup> ± 77,82        | 11,54 | 4,03  | 32,38 | 52,04 |
|       |              | 5  | 78    | 88 <sup>B</sup> ±<br>17  | 381,5 <sup>ab</sup> ±<br>105,91   | 16,36 | 6,82  | 29,76 | 56,25 |
|       |              | 6  | 76    | 111 ±<br>18              | 403,86 <sup>ab</sup> ±<br>146,52  | 7,25  | 3,32  | 35,78 | 53,65 |
|       |              | 7  | 77    | 99 ± 23                  | 274,37 <sup>b</sup> ±<br>89,33    | 15,31 | 2,34  | 14,71 | 67,64 |
|       | Média        |    | 78    | 95                       | 354,63                            | 14    | 6     | 25    | 55    |
|       | LED<br>19/11 | 1  | 76    | 88 ± 13                  | 383,17 ± 163,95                   | 15,25 | 16,12 | 28,43 | 40,19 |
|       |              | 2  | 75    | 103 ±<br>21              | 363,55 ± 140,82                   | 9,33  | 15,32 | 20,42 | 54,92 |
|       |              | 3  | 72    | 108 <sup>A</sup> ±<br>19 | 271,91 <sup>A</sup> ±<br>104,87   | 12,31 | 6,94  | 18,57 | 62,18 |
|       |              | 4  | 77    | 85 ± 8                   | 351,33 ± 61,7                     | 13,42 | 17,21 | 42,73 | 26,63 |
|       |              | 5  | 75    | 115 <sup>A</sup> ±<br>22 | 358 ± 166,44                      | 3,55  | 5,18  | 30,79 | 60,47 |
|       |              | 6  | 75    | 103 ±<br>24              | 360 ± 161,64                      | 6,19  | 8,03  | 24,39 | 61,4  |
|       |              | 7  | 68    | 113 ±<br>15              | 306,2 ± 70,39                     | 20,5  | 11,54 | 20,57 | 65,84 |
| Média |              | 74 | 102   | 343,01                   | 10                                | 11    | 26    | 53    |       |
| C.V.  |              |    | 19,99 | 38,77                    |                                   |       |       |       |       |

Os valores são médias e ± são desvios padrão. As médias seguidas de letras minúsculas indicam diferença estatística de acordo com Tukey (p < 0,05) e as letras maiúsculas indicam diferença significativa de acordo com o teste "t" (p < 0,05).

TR: Tratamento do inóculo; PI: Período de incubação (Dias para abertura dos blocos após a inoculação); PP: Período de produção (intervalo entre a primeira e última colheita); L: Linhagem.

<sup>1</sup> Peso fresco médio dos cogumelos colhidos de 7 replicatas;

<sup>2</sup> Distribuição do peso total dos cogumelos colhidos em cada fluxo, estimados em porcentagem.

\* Foi utilizada transformação de dados: Raiz quadrada de  $Y + 0.5 - \text{SQRT}(Y + 0.5)$ .

A eficiência biológica variou entre 2,5% (C - LED 19/11) e 84% (T3 – LED 20/06). Com relação às diferenças entre os dois experimentos realizados, pode-se observar que um maior intervalo entre valores de EB% foram obtidos quando se adotou um maior período de incubação (2,5 a 55,8%) e menor quando o período de incubação foi menor (42,77 a 84%). A EB% média entre os tratamentos (PI75 dias) não apresentou diferença significativa para as duas linhagens testadas: 59,1% (LED 20/06) a 56,91% (LED 19/11). Os dados de desvio padrão foram altos em alguns casos, porque a produção de cogumelos foi variável entre amostras (Tabela 7).

A taxa de produção variou fortemente dependendo da formulação do *spawn* e da linhagem, variando entre 0,03 e 0,63% quando o período de incubação foi de 87 dias e 0,43 a 1% no menor período de incubação.

A abertura dos blocos aos 87 DAI forneceu tratamentos precoces para as duas linhagens testadas, o que não ocorreu no experimento onde houve a abertura dos blocos com 75 DAI (Tabela 7).

**Tabela 7.** Produtividade de duas linhagens de *L. edodes*, sob 7 diferentes formulações de *spawn*, submetidos a dois períodos de incubação.

| PI              | 87           |               |       | 75            |               |       |
|-----------------|--------------|---------------|-------|---------------|---------------|-------|
| L               | LED 19/11    | LED 20/06     | Média | LED 19/11     | LED 20/06     | Média |
| Precocidade (%) |              |               |       |               |               |       |
| C               | 100 ± 0      | 100 ± 0       | 100   | 15,25 ± 7,92  | 24,74 ± 12,82 | 19,57 |
| T2              | 100 ± 0      | 100 ± 0       | 100   | 9,33 ± 11,16  | 9,09 ± 14,27  | 9,22  |
| T3              | 100 ± 0      | 100 ± 0       | 100   | 12,31 ± 28,55 | 15,14 ± 8,89  | 13,31 |
| T4              | 99,57 ± 0,96 | 89,75 ± 19,13 | 94,66 | 13,43 ± 4,05  | 11,54 ± 14,28 | 12,25 |

|                          |                              |                               |                     |                            |                             |       |
|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------------|-----------------------------|-------|
| T5                       | 90,94 ± 12,89                | 94,94 ± 6,36                  | 92,83               | 3,55 <sup>B</sup> ± 5,65   | 16,36 <sup>A</sup> ± 9,90   | 10,38 |
| T6                       | 92,96 ± 6,6                  | 87,09 ± 14,4                  | 90,29               | 6,19 ± 7,21                | 7,25 ± 11,49                | 6,63  |
| T7                       | 92,96 ± 9,71                 | 89,38 ± 18,6                  | 90,87               | 2,05 ± 4,09                | 15,31 ± 14,39               | 10,21 |
| Média                    | 96,47                        | 93,79                         |                     | 9,47                       | 14,86                       |       |
| CV(%)                    | 11,54                        |                               |                     | 67,81 *                    |                             |       |
| Taxa de produção (%)     |                              |                               |                     |                            |                             |       |
| C                        | 0,03 <sup>c</sup> ± 0,02     | 0,18 <sup>b</sup> ± 0,09      | 0,09 <sup>d</sup>   | 0,75 ± 0,34                | 0,67 <sup>ab</sup> ± 0,16   | 0,71  |
| T2                       | 0,19 <sup>bc</sup> ± 0,14    | 0,23 <sup>ab</sup> ± 0,08     | 0,21 <sup>bcd</sup> | 0,61 ± 0,28                | 0,59 <sup>ab</sup> ± 0,33   | 0,6   |
| T3                       | 0,32 <sup>abc</sup> ± 0,21   | 0,06 <sup>b</sup> ± 0,01      | 0,19 <sup>cd</sup>  | 0,43 <sup>B</sup> ± 0,18   | 1 <sup>A a</sup> ± 0,17     | 0,63  |
| T4                       | 0,43 <sup>ab</sup> ± 0,15    | 0,61 <sup>a</sup> ± 0,10      | 0,52 <sup>a</sup>   | 0,68 ± 0,11                | 0,44 <sup>b</sup> ± 0,09    | 0,53  |
| T5                       | 0,60 <sup>A a</sup> ± 0,22   | 0,37 <sup>B ab</sup> ± 0,19   | 0,48 <sup>ab</sup>  | 0,57 ± 0,38                | 0,76 <sup>ab</sup> ± 0,25   | 0,67  |
| T6                       | 0,58 <sup>ab</sup> ± 0,31    | 0,43 <sup>ab</sup> ± 0,29     | 0,51 <sup>a</sup>   | 0,63 ± 0,33                | 0,44 <sup>b</sup> ± 0,16    | 0,55  |
| T7                       | 0,63 <sup>A a</sup> ± 0,17   | 0,35 <sup>B ab</sup> ± 0,32   | 0,47 <sup>abc</sup> | 0,47 ± 0,17                | 0,47 <sup>b</sup> ± 0,19    | 0,47  |
| Média                    | 0,4                          | 0,34                          |                     | 0,59                       | 0,62                        |       |
| CV(%)                    | 58,42                        |                               |                     | 44,73                      |                             |       |
| Eficiência biológica (%) |                              |                               |                     |                            |                             |       |
| C                        | 2,5 <sup>c</sup> ± 1,38      | 16,08 <sup>b</sup> ± 7,83     | 8,53 <sup>c</sup>   | 63,86 ± 27,32              | 54,58 <sup>ab</sup> ± 10,66 | 59,64 |
| T2                       | 17,17 <sup>bc</sup> ± 11,82  | 19,71 <sup>ab</sup> ± 6,87    | 18,09 <sup>bc</sup> | 60,59 ± 23,47              | 58,02 <sup>ab</sup> ± 27,16 | 59,38 |
| T3                       | 28,77 <sup>abc</sup> ± 18,21 | 5,5 <sup>b</sup> ± 1,05       | 17,13 <sup>c</sup>  | 45,32 <sup>B</sup> ± 17,48 | 84 <sup>A a</sup> ± 12,5    | 58,97 |
| T4                       | 36,91 <sup>abc</sup> ± 13,05 | 53,19 <sup>a</sup> ± 8,77     | 45,05 <sup>a</sup>  | 58,55 ± 10,28              | 42,77 <sup>b</sup> ± 12,97  | 48,68 |
| T5                       | 54,33 <sup>A a</sup> ± 17,46 | 33,07 <sup>B ab</sup> ± 17,25 | 43,70 <sup>a</sup>  | 58,06 ± 30,14              | 63,58 <sup>ab</sup> ± 17,65 | 61    |
| T6                       | 50,31 <sup>ab</sup> ± 26,81  | 39,93 <sup>ab</sup> ± 26,98   | 45,59 <sup>a</sup>  | 60 ± 26,94                 | 67,31 <sup>ab</sup> ± 24,41 | 63    |
| T7                       | 55,8 <sup>A a</sup> ± 13,31  | 33,02 <sup>B ab</sup> ± 30,39 | 42,51 <sup>ab</sup> | 51,03 ± 11,73              | 45,73 <sup>b</sup> ± 14,89  | 47,77 |
| Média                    | 35,58                        | 30,32                         |                     | 56,97                      | 59,10                       |       |
| CV(%)                    | 58,24                        |                               |                     | 39,23                      |                             |       |

Os valores são médias e  $\pm$  são desvios padrão. As médias seguidas de letras minúsculas indicam diferença estatística de acordo com Tukey ( $p < 0,05$ ) e as letras maiúsculas indicam diferença significativa de acordo com o teste "t" ( $p < 0,05$ ).

PI: Período de Incubação (Dias para abertura dos blocos após a inoculação); TR: Tratamento do inóculo; Eficiência biológica = peso do cogumelo fresco/peso do substrato seco x 100; Taxa de produção = EB%/dias para obtenção do primeiro fluxo, incluindo tempo de incubação; Precocidade = produtividade na primeira metade do tempo total de colheita / produtividade no tempo total de colheita x 100; L: Linhagem.

\* Foi utilizada transformação de dados: Raiz quadrada de  $Y + 0.5 - \text{SQRT} (Y + 0.5)$ .

A produtividade de *L. edodes* ao longo dos fluxos nos dois períodos de incubação adotados, não foi constante (Tabela 8). A produtividade quando se adotou o maior período de incubação (PI87 dias) foi significativamente afetada pelos tratamentos (GL = 6; F = 7,43 e  $p = 0,00$ ) e pela interação linhagem\*tratamento (GL = 6; F = 2,43 e  $p = 0,03$ ), sendo as melhores produtividades para a linhagem LED 20/06 obtidas utilizando-se *spawn* suplementado T5 e T7 (16,3 e 16,71%, respectivamente) e para a linhagem LED 19/011 as maiores produtividades foram obtidas utilizando-se também *spawn* suplementado de formulação T4 e T6 (15,96 e 11,98%, respectivamente) em apenas dois fluxos. No menor período de incubação, a produtividade foi afetada pela interação linhagem\*tratamento (GL = 6; F = 2,31 e  $p = 0,04$ ) e a maior produtividade foi obtida utilizando a suplementação de *spawn* T3 associado à linhagem LED 20/06 (25,2%).

No segundo fluxo, ocorreram mudanças significativas no experimento. Grande parte dos blocos do primeiro experimento (62%) foram perdidas em decorrência da contaminação pelo fungo *Trichoderma sp.*, resultando na impossibilidade de calcular a produtividade dos tratamentos 1,2 e 3 a partir do segundo fluxo e dos tratamentos 4, 5, 6 e 7 a partir do terceiro fluxo.

A variável “número de cogumelos colhidos” não apresentou diferença estatística entre as duas linhagens avaliadas. No menor período de incubação, o intervalo entre esta variável foi de 9,25 a 15,33 e no maior período de incubação, 2,4 a 18,33. Dentro de cada período de incubação, não houve diferença significativa na variável “massa média” de acordo com a linhagem testada, porém apresenta diferença estatística de acordo com a formulação de *spawn* utilizado, menos para a linhagem

LED 19/11 que não apresenta diferença estatística de acordo com a formulação de *spawn*.

**Tabela 8.** Dados de produção de duas linhagens de *L. edodes* sob 7 formulações de *spawn*, submetidos a dois períodos de incubação.

| PI                       | 87                   |                      |                      | 75                |                     |                    |
|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| Linhagem                 | LED 19/11            | LED 20/06            | Média                | LED 19/11         | LED 20/06           | Média              |
| Produtividade 1º fluxo * |                      |                      |                      |                   |                     |                    |
| C                        | 0,75 <sup>c</sup>    | 4,82 <sup>ab</sup>   | 2,56 <sup>d</sup>    | 3,47              | 4,24                | 3,82 <sup>a</sup>  |
| T2                       | 5,15 <sup>bc</sup>   | 5,91 <sup>ab</sup>   | 5,42 <sup>bcd</sup>  | 1,64              | 1,39                | 1,52 <sup>b</sup>  |
| T3                       | 8,63 <sup>A ab</sup> | 1,65 <sup>B b</sup>  | 5,14 <sup>cd</sup>   | 0,61 <sup>B</sup> | 3,59 <sup>A</sup>   | 1,66 <sup>ab</sup> |
| T4                       | 10,99 <sup>ab</sup>  | 14,57 <sup>a</sup>   | 12,78 <sup>a</sup>   | 2,28              | 1,11                | 1,55 <sup>ab</sup> |
| T5                       | 14,81 <sup>ab</sup>  | 9,26 <sup>ab</sup>   | 12,03 <sup>ab</sup>  | 0,93 <sup>B</sup> | 3,18 <sup>A</sup>   | 2,13 <sup>ab</sup> |
| T6                       | 13,96 <sup>ab</sup>  | 9,72 <sup>ab</sup>   | 12,04 <sup>abc</sup> | 1,20              | 1,24                | 1,22 <sup>b</sup>  |
| T7                       | 15,65 <sup>A a</sup> | 7,93 <sup>B ab</sup> | 11,15 <sup>abc</sup> | 0,4               | 1,84                | 1,28 <sup>b</sup>  |
| Média                    | 10,11                | 8,09                 |                      | 1,59 <sup>B</sup> | 2,49 <sup>A</sup>   |                    |
| CV (%)                   | 32,02                |                      |                      | 44,00             |                     |                    |
| Produtividade 2º fluxo * |                      |                      |                      |                   |                     |                    |
| C                        | -                    | -                    | -                    | 3,12 <sup>A</sup> | 0,93 <sup>B</sup>   | 2,12               |
| T2                       | -                    | -                    | -                    | 3,75              | 2,53                | 3,18               |
| T3                       | -                    | -                    | -                    | 1,05              | 3,29                | 1,84               |
| T4                       | 0,08                 | 1,38                 | 0,73                 | 3,45              | 0,81                | 1,8                |
| T5                       | 1,49                 | 0,66                 | 1,07                 | 1,16              | 1,52                | 1,35               |
| T6                       | 1,12                 | 2,26                 | 1,64                 | 1,56              | 1,01                | 1,34               |
| T7                       | 1,09                 | 1,98                 | 1,61                 | 1,91              | 0,34                | 0,94               |
| Média                    | 0,56                 | 1                    |                      | 2,22              | 1,45                |                    |
| CV (%)                   | 57,01                |                      |                      | 54,65             |                     |                    |
| Produtividade 3º fluxo * |                      |                      |                      |                   |                     |                    |
| C                        | -                    | -                    | -                    | 5,48              | 3,09 <sup>ab</sup>  | 4,39               |
| T2                       | -                    | -                    | -                    | 3,45              | 2,88 <sup>b</sup>   | 3,18               |
| T3                       | -                    | -                    | -                    | 2,81 <sup>B</sup> | 8,15 <sup>A a</sup> | 4,69               |
| T4                       | -                    | -                    | -                    | 7,51              | 4,32 <sup>ab</sup>  | 5,52               |
| T5                       | -                    | -                    | -                    | 5,61              | 5,58 <sup>ab</sup>  | 5,59               |
| T6                       | -                    | -                    | -                    | 4,72              | 8,22 <sup>ab</sup>  | 6,16               |
| T7                       | -                    | -                    | -                    | 3,10              | 2,54 <sup>ab</sup>  | 2,75               |
| Média                    | -                    | -                    | -                    | 4,42              | 4,75                |                    |
| CV (%)                   | -                    |                      |                      | 42,17             |                     |                    |
| Produtividade 4º fluxo * |                      |                      |                      |                   |                     |                    |
| C                        | -                    | -                    | -                    | 7,09              | 8,10 <sup>ab</sup>  | 7,55               |
| T2                       | -                    | -                    | -                    | 9,33              | 10,59 <sup>a</sup>  | 9,23               |
| T3                       | -                    | -                    | -                    | 9,12              | 10,17 <sup>ab</sup> | 9,49               |

|                                                     |                        |                       |                      |                    |                      |                     |
|-----------------------------------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| <b>T4</b>                                           | -                      | -                     | -                    | 4,32               | 6,59 <sup>b</sup>    | 5,74                |
| <b>T5</b>                                           | -                      | -                     | -                    | 10,21              | 9,81 <sup>a</sup>    | 10                  |
| <b>T6</b>                                           | -                      | -                     | -                    | 9,64               | 9,71 <sup>ab</sup>   | 9,67                |
| <b>T7</b>                                           | -                      | -                     | -                    | 9,90               | 8,99 <sup>ab</sup>   | 9,34                |
| <b>Média</b>                                        | -                      | -                     |                      | 8,77               | 9,19                 |                     |
| <b>CV (%)</b>                                       | -                      |                       |                      | 22,53              |                      |                     |
| <b>Produtividade total (%) *</b>                    |                        |                       |                      |                    |                      |                     |
| <b>C</b>                                            | 0,75 <sup>c</sup>      | 4,82 <sup>ab</sup>    | 2,56 <sup>d</sup>    | 19,16              | 16,37 <sup>ab</sup>  | 17,89               |
| <b>T2</b>                                           | 5,15 <sup>bc</sup>     | 5,91 <sup>ab</sup>    | 5,43 <sup>bcd</sup>  | 18,17              | 17,41 <sup>ab</sup>  | 17,81               |
| <b>T3</b>                                           | 8,63 <sup>A ab</sup>   | 1,65 <sup>B b</sup>   | 5,14 <sup>cd</sup>   | 13,59 <sup>B</sup> | 25,2 <sup>A a</sup>  | 17,69               |
| <b>T4</b>                                           | 11,07 <sup>ab</sup>    | 15,96 <sup>a</sup>    | 13,52 <sup>a</sup>   | 17,57              | 12,83 <sup>b</sup>   | 14,6                |
| <b>T5</b>                                           | 16,3 <sup>A a</sup>    | 9,92 <sup>B ab</sup>  | 13,11 <sup>a</sup>   | 17,9               | 19,07 <sup>ab</sup>  | 18,53               |
| <b>T6</b>                                           | 15,09 <sup>ab</sup>    | 11,98 <sup>a</sup>    | 13,68 <sup>ab</sup>  | 18,00              | 20,19 <sup>ab</sup>  | 18,9                |
| <b>T7</b>                                           | 16,74 <sup>A a</sup>   | 9,91 <sup>B ab</sup>  | 12,75 <sup>abc</sup> | 15,31              | 13,72 <sup>b</sup>   | 14,33               |
| <b>Média</b>                                        | 10,67                  | 9,09                  |                      | 17,15              | 17,73                |                     |
| <b>CV (%)</b>                                       | 32,5                   |                       |                      | 20,03              |                      |                     |
| <b>Número de cogumelos</b>                          |                        |                       |                      |                    |                      |                     |
| <b>C</b>                                            | 2,4 <sup>c</sup>       | 7,5                   | 4,67 <sup>c</sup>    | 15,33              | 13,00                | 14,27               |
| <b>T2</b>                                           | 6,14 <sup>bc</sup>     | 8,25                  | 6,91 <sup>bc</sup>   | 12,88              | 11,00                | 12                  |
| <b>T3</b>                                           | 16,4 <sup>A ab</sup>   | 3,2 <sup>B</sup>      | 9,8 <sup>abc</sup>   | 12,09              | 14,83                | 13,06               |
| <b>T4</b>                                           | 18,33 <sup>a</sup>     | 14,33                 | 16,33 <sup>a</sup>   | 13,67              | 12,2                 | 12,75               |
| <b>T5</b>                                           | 12,28 <sup>abc</sup>   | 9,71                  | 11 <sup>abc</sup>    | 11,14              | 13,50                | 12,4                |
| <b>T6</b>                                           | 14,67 <sup>ab</sup>    | 10,2                  | 12,64 <sup>abc</sup> | 12,9               | 11,71                | 12,41               |
| <b>T7</b>                                           | 14,00 <sup>abc</sup>   | 12,85                 | 13,33 <sup>ab</sup>  | 10,40              | 9,25                 | 9,69                |
| <b>Média</b>                                        | 11,97                  | 9,84                  |                      | 12,86              | 12,15                |                     |
| <b>CV (%)</b>                                       | 59,69                  |                       |                      | 51,56              |                      |                     |
| <b>Massa média de cogumelos (peso/nº cogumelos)</b> |                        |                       |                      |                    |                      |                     |
| <b>C</b>                                            | 6,38 <sup>d</sup>      | 12,05 <sup>ab</sup>   | 8,9 <sup>d</sup>     | 28,39              | 25,62 <sup>ab</sup>  | 27,13 <sup>ab</sup> |
| <b>T2</b>                                           | 13,93 <sup>bcd</sup>   | 14 <sup>ab</sup>      | 13,96 <sup>bcd</sup> | 31,07              | 37,46 <sup>a</sup>   | 34,08 <sup>a</sup>  |
| <b>T3</b>                                           | 10,17 <sup>cd</sup>    | 10,62 <sup>b</sup>    | 10,39 <sup>cd</sup>  | 24,37 <sup>B</sup> | 35,31 <sup>A a</sup> | 28,23 <sup>ab</sup> |
| <b>T4</b>                                           | 12,41 <sup>B bcd</sup> | 23,46 <sup>A a</sup>  | 17,93 <sup>abc</sup> | 25,81              | 21,33 <sup>b</sup>   | 23,01 <sup>c</sup>  |
| <b>T5</b>                                           | 28,75 <sup>A a</sup>   | 19,71 <sup>B ab</sup> | 24,23 <sup>a</sup>   | 33,69              | 28,14 <sup>ab</sup>  | 30,72 <sup>ab</sup> |
| <b>T6</b>                                           | 19,54 <sup>abc</sup>   | 23,16 <sup>ab</sup>   | 21,18 <sup>ab</sup>  | 30,29              | 35,59 <sup>a</sup>   | 32,47 <sup>a</sup>  |
| <b>T7</b>                                           | 24,2 <sup>A ab</sup>   | 13,54 <sup>B ab</sup> | 17,98 <sup>abc</sup> | 30,19              | 29,87 <sup>ab</sup>  | 29,99 <sup>ab</sup> |
| <b>Média</b>                                        | 16,93                  | 17,01                 |                      | 29,04              | 30,53                |                     |
| <b>CV (%)</b>                                       | 20,15*                 |                       |                      | 25,34              |                      |                     |

DAB: Dias para abertura dos blocos após a inoculação.

\* Foi utilizada transformação de dados: Raiz quadrada de  $Y + 0.5 - \text{SQRT} (Y + 0.5)$ .

Para conhecimento do efeito do fungo *L. edodes* sobre o substrato utilizado, foi realizada análise química após o fim da produção (Tabela 9).

Os resultados indicam que houve redução da relação C/N, por conta do aumento no teor de nitrogênio livre no substrato, apesar da equivalência no teor de carbono. Houve também aumento dos teores dos outros nutrientes avaliados, com exceção do micronutriente cobre. Houve redução do pH e da condutividade elétrica (Tabela 11).

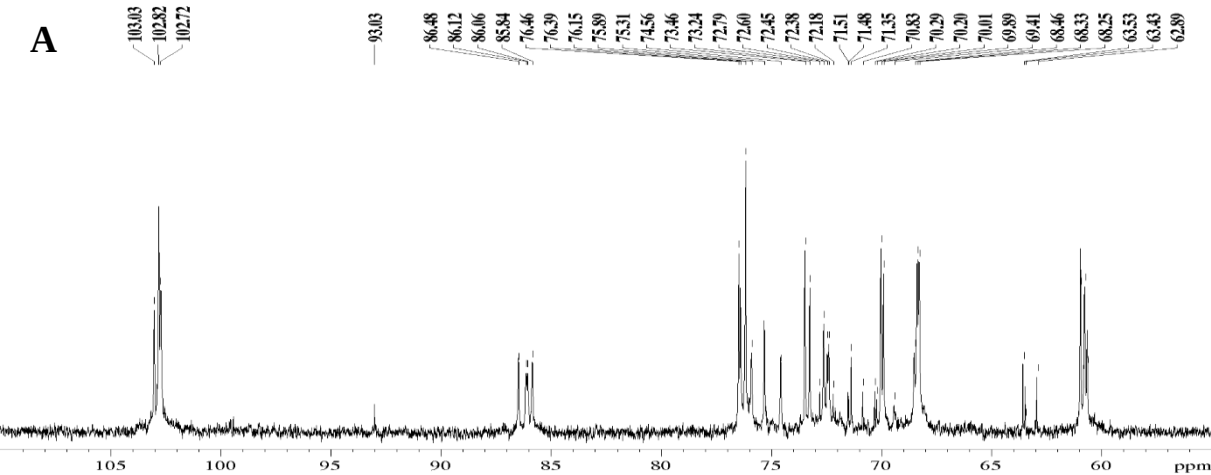
**Tabela 9.** Resultados analíticos do substrato a base de palha de arroz no início e ao fim da produção.

| Unidade        | %  |      | (g/kg)      |      |     |     |     | (mg/kg) |    |    |      |     | μS  |     |      |               |
|----------------|----|------|-------------|------|-----|-----|-----|---------|----|----|------|-----|-----|-----|------|---------------|
| Amostra        | C  | N    | Relação C/N | N    | P   | Ca  | Mg  | S       | B  | Cu | K    | Fe  | Mn  | Zn  | pH   | Condutividade |
| Pré utilização | 44 | 1,04 | 42,5        | 10   | 2,6 | 6,3 | 3,3 | 1,7     | 8  | 28 | 11,7 | 357 | 357 | 377 | 6,1  | 2668          |
| SMS            | 44 | 1,45 | 30,4        | 14,5 | 3,6 | 24  | 7,8 | 1,9     | 13 | 20 | 18   | 872 | 811 | 404 | 5,14 | 2425          |

SMS: *Spent mushroom substrate*.

### 4.3 PRODUÇÃO DO POLISSACARÍDEO LENTINANA

Os espectros da Ressonância Magnética Nuclear <sup>13</sup>C (NMR) e HSQC-DEPT das frações T6-PEM da linhagem LED 20/06 (A) e T1-PEM da linhagem LED 19/11(B) são mostrados abaixo. Os turnos químicos são expressos em ppm (δ) relativamente a Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub> a 70°C e 50°C (Figuras 9 e 10).



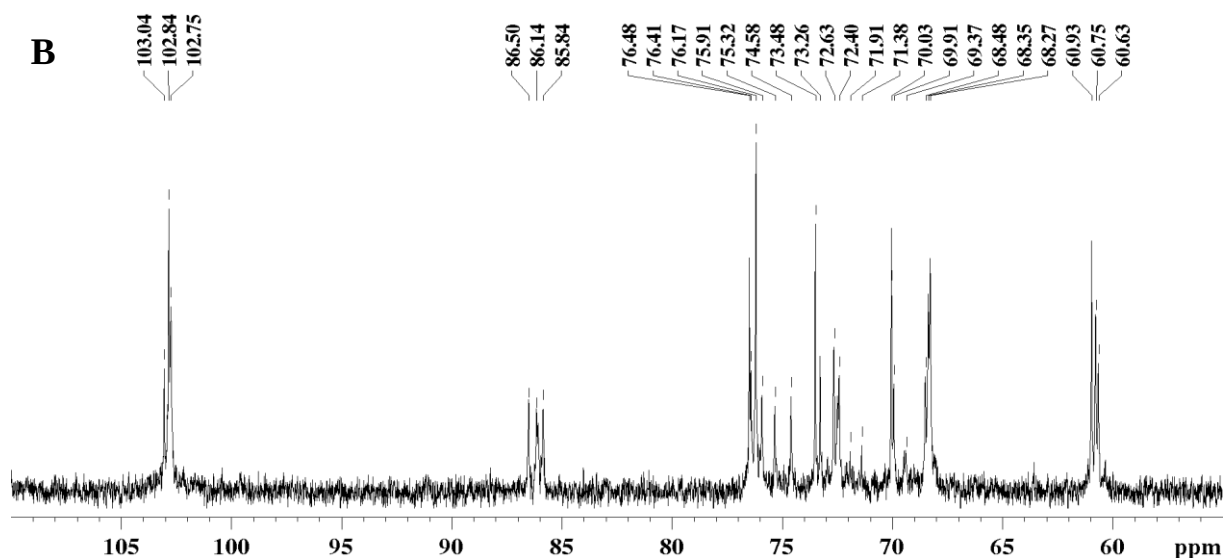


**Figura 9.** Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das frações T6-PEM da linhagem 20/06 (A) e T1-PEM da linhagem 19/11(B), em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  a  $70^\circ\text{C}$ .

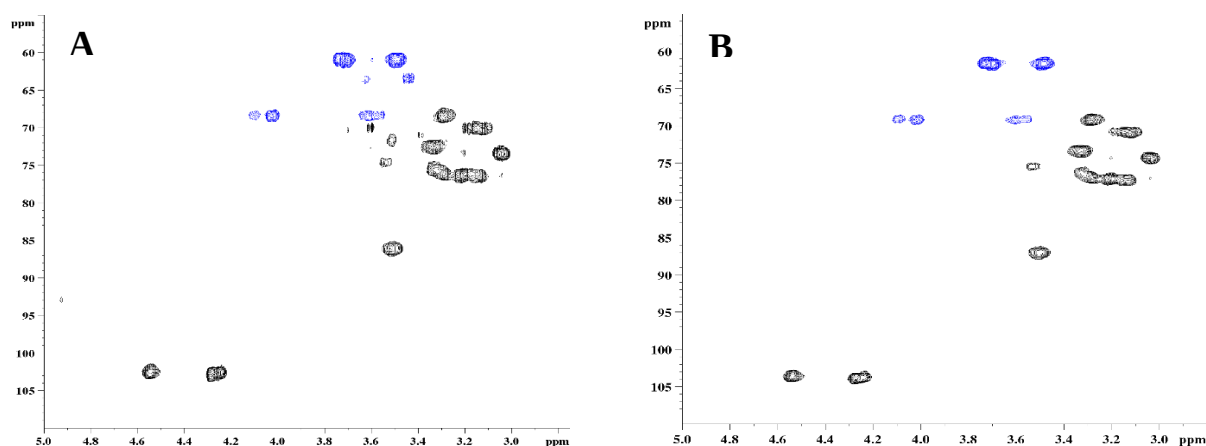


**Figura 10.** Espectro de HSQC-editado das frações T6-PEM da linhagem 20/06 (A) e T1-PEM da linhagem 19/11(B), em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  a  $50^\circ\text{C}$ .

Verificou-se que a utilização de grãos suplementados com diferentes doses de turfa e serragem (T3, T4, T5, T6 e T7), resultou em resultados médios mais elevados (mg lentinana/grama de cogumelo seco) de lentinana, quando comparado com o tratamento de controle para ambas as estirpes testadas. Além disso, verificou-se que as estirpes resultaram em diferentes quantidades do polissacarídeo, uma vez que a estirpe LED 19/11 mostrou ser superior à estirpe LED 20/06 independentemente da formulação de *spawn* utilizada ( $p < 0,05$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Teor de  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6), lentinana, obtida das linhagens LED 19/11 e LED 20/06 de *L. edodes*.

| Tratamento   | Linhagem                 |                            | Média              |
|--------------|--------------------------|----------------------------|--------------------|
|              | LED 19/11                | LED 20/06                  |                    |
| <b>C</b>     | 141 ± 2,5 <sup>A b</sup> | 91 ± 1,2 <sup>B b</sup>    | 115,7 <sup>b</sup> |
| <b>T2</b>    | 143 ± 2,7 <sup>A b</sup> | 91 ± 2,3 <sup>B b</sup>    | 117 <sup>b</sup>   |
| <b>T3</b>    | 171 ± 3,5 <sup>A a</sup> | 105,6 ± 6,4 <sup>B a</sup> | 138 <sup>a</sup>   |
| <b>T4</b>    | 176 ± 8,1 <sup>A a</sup> | 103 ± 4,3 <sup>B a</sup>   | 139,7 <sup>a</sup> |
| <b>T5</b>    | 176 ± 6,9 <sup>A a</sup> | 103,6 ± 4 <sup>B a</sup>   | 139,8 <sup>a</sup> |
| <b>T6</b>    | 174 ± 5,6 <sup>A a</sup> | 104,6 ± 2 <sup>B a</sup>   | 139 <sup>a</sup>   |
| <b>T7</b>    | 171 ± 2 <sup>A a</sup>   | 101 ± 1,2 <sup>B a</sup>   | 136 <sup>a</sup>   |
| <b>Média</b> | 164,45 <sup>A</sup>      | 99,74 <sup>B</sup>         |                    |

Os valores são médias e  $\pm$  são desvios padrão. As médias seguidas de letras minúsculas indicam diferença estatística de acordo com Tukey ( $p < 0,05$ ) e as letras maiúsculas indicam diferença significativa de acordo com o teste "t" ( $p < 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

O cultivo de cogumelos comestíveis não é apenas uma prática agrícola ancestral, mas uma atividade que atualmente requer conhecimentos tecnológicos e científicos (Mata & Savoie, 2018). Além de sua importância histórica, a produção de cogumelos a partir de resíduos agrícolas desempenha um papel significativo na manutenção do ajudam a manter equilíbrio ecológico sustentável. No futuro, os fungos comestíveis serão cada vez mais relevantes na dieta humana, devido aos seus benefícios para a saúde.

Este trabalho apresenta grande importância no sentido técnico e científico, pois as linhagens de *L. edodes* apresentaram altíssimo rendimento, utilizando o material lignocelulósico mais disponível no mundo (a palha de arroz), como componente principal do substrato de cultivo. Esse avanço foi possível por meio da suplementação do *spawn*, que forneceu materiais recalcitrantes que tornaram as linhagens mais eficientes na degradação do substrato e na conversão em cogumelos comestíveis e medicinais. A utilização do *spawn* suplementado não apenas proporcionou uma produção significativamente superior, mas também aumentou a qualidade dos cogumelos. Isso ocorreu porque o polissacarídeo lentinana, altamente valorizado e estudado por suas diversas propriedades medicinais, foi produzido em maior quantidade quando as linhagens tiveram acesso ao *spawn* suplementado.

Os resultados deste estudo indicam que a produção em larga escala dessa espécie pode ser otimizada, seja para fins medicinais, alimentícios ou industriais. Essa otimização resulta em redução dos custos de produção e comercialização,

possibilitando popularizar o produto. Além disso, o uso da palha de arroz como substrato oferece aos produtores de cogumelos mais opções para obter a matéria-prima localmente, evitando com que esse material amplamente disponível seja descartado inadequadamente, podendo causar impactos ambientais negativos.

Os resultados mostraram que, aos 75 dias após a inoculação, os blocos do primeiro experimento ainda não haviam apresentado a formação da capa marrom nem a havia a presença de exsudatos líquidos. Por outro lado, no segundo experimento, neste mesmo momento (75 dias após a inoculação), os blocos já apresentavam a capa marrom completamente formada e exsudatos. Duas hipóteses são levantadas para explicar esse fenômeno. A primeira hipótese está relacionada à frequência de descolamentos dos blocos durante o desenvolvimento micelial. A exposição do micélio ao oxigênio é um fator que acelera o processo de formação da capa marrom, conforme descrito por Tang et al. (2013). Assim, a maior frequência de descolamentos no segundo experimento pode ter contribuído para a formação mais rápida da capa marrom. É interessante notar que, no primeiro experimento, quando os blocos foram abertos aos 75 dias, não houve formação da capa marrom e nem de basidiomas, o que contradiz os resultados de Alberti et al. (2022), que sugerem que o processo de formação da capa marrom não é essencial para a produção de *shiitake*. Foi observado neste trabalho, porém que a exposição ao oxigênio pode ter acelerado a formação do *browning*, reduzido o período de incubação e resultado na formação de basidiomas.

A segunda hipótese levantada sugere que a adição de gesso às formulações de *spawn* no segundo experimento pode ter proporcionado condições nutricionais e físicas ideais para o crescimento do micélio no substrato final de cultivo. É sabido que o pH desempenha um papel crucial no cultivo de cogumelos, e é comumente ajustado utilizando gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ ), cal ( $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ ) e calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) (Khan et al. 2013). Embora *L. edodes* seja capaz de crescer em um pH variando de 3,0 a 7,0, a taxa de crescimento micelial é mais alta em pH de 3,5 a 4,0 (Li et al., 2022). Fungos geralmente acidificam o ambiente devido a diversos mecanismos, e o íon  $\text{Ca}^{2+}$  é essencial no crescimento, metabolismo e diferenciação de fungos (Dzurendova et al., 2021). Além disso, atua como um segundo mensageiro para a transdução de sinais intracelulares envolvidos em diversos processos celulares (Roy et al., 2021). O

enxofre é outro elemento essencial presente em várias biomoléculas e envolvido em múltiplos processos metabólicos dos fungos (Linder, 2018).

Ainda são necessários estudos adicionais para compreender se a adição de gesso à formulação de *spawn* está de fato relacionada ao processo de formação da capa marrom e à redução do período de incubação. Também é importante avaliar se a adição de gesso ao *spawn* pode influenciar os resultados de produção, uma vez que, estudos anteriores mostraram que a EB% da produção, onde se utilizou substratos suplementados com 1-3% de gesso, é maior do que em tratamentos sem gesso adicional (Li et al., 2022). Portanto, é possível que a adição de gesso ao *spawn* também tenha um efeito positivo na produção de cogumelos, embora isso precise ser investigado mais a fundo.

Os resultados deste estudo indicam que o período de incubação desempenha um papel significativo nos resultados produtivos de *L. edodes*. Embora um período de incubação mais longo tenha sido associado a um aumento na biomassa micelial e maior quantidade de hifas em contato com o substrato, o que pode permitir a melhor digestão e incorporação de nutrientes pelo micélio (Royse, 1985), neste estudo foi observado que a maior EB% foi alcançada com o menor período de incubação testado (75 dias). Esses achados estão em concordância com o estudo de Alberti et al. (2022), no qual também foi obtida uma maior EB% com um período de incubação de 70 dias. Os autores também observaram que o período de incubação afeta a EB%, produtividade, diâmetro do píleo, número e massa média dos cogumelos. Uma das razões levantadas pelos autores, é relacionado à quantidade de enzimas presentes no substrato. No entanto, Curiél Pérez et al. (2012), ressaltaram a importância de avaliar os parâmetros de produção para cada linhagem individualmente, uma vez que obtiveram respostas variadas em relação ao tempo ótimo de incubação, com 70 dias para algumas linhagens e apenas 42 dias para outras.

Os períodos de incubação (75 e 87 dias) utilizados neste estudo são mais longos em comparação com estudos anteriores para a espécie *L. edodes*, como Gao et al. (2020) (50 dias), Gaitán-Hernández et al. (2006) (60 dias), Gaitán-Hernández & Cortés (2014) (45 dias), mas semelhantes aos utilizados por Alberti et al. (2022) (70 dias). O longo período de incubação observado neste estudo pode estar relacionado à quantidade de *spawn* utilizada na inoculação do substrato de cultivo. Quando uma maior quantidade de *spawn* é adicionada para inocular substratos a base de palha

esterilizados ou pasteurizados, o período de incubação pode ser reduzido, o que pode levar a melhores resultados de produção, conforme apontado por Mata & Savoie (2018). Neste estudo utilizou-se 2% de *spawn* (w/w), enquanto a maioria dos produtores de *shiitake* utiliza 5% ou 7% (w/w) (Albertó, 2008; Stamets, 2000).

Após o período de incubação, a formação da capa marrom observada neste estudo está de acordo com a aparência citada por Przybylowicz e Donoghue (1990). A presença de exsudatos líquidos indica a maturação do micélio, indicando um estado adequado para frutificação (Donoghue & Denison, 2003). Durante o período de incubação, não foram observadas diferenças significativas no tempo de colonização do substrato, de acordo com a fórmula de *spawn* utilizada, o que está em concordância com os resultados encontrados por Gaitán-Hernández & Cortés (2014).

A seleção de genótipos adequados às propriedades químicas e estruturais dos substratos, bem como o tratamento térmico adotado, desempenham um papel crucial na garantia de uma boa produção satisfatória de basidiomas no menor tempo possível. Os resultados obtidos neste estudo, permitiram classificar as linhagens de acordo com sua capacidade de crescimento no substrato a base de palha de arroz sob diferentes períodos de incubação, e mostraram que a formulação do *spawn* pode afetar a adaptação das linhagens a esse substrato. Em relação aos parâmetros de produção, as linhagens foram significativamente influenciadas pela formulação do *spawn* e pelo período de incubação. Embora o maior período de incubação (87 dias) tenha levado a uma colheita mais precoce, as linhagens apresentaram um desempenho mais satisfatório no menor período de incubação testado (75 dias), produzindo cogumelos com maior diâmetro de píleo, período de produção mais longo, maior EB%, TP%, massa média e número de cogumelos.

As formulações de *spawn* que incluíram pequenas quantidades de turfa e/ou serragem mostraram resultados significativamente superiores em termos de EB%, produtividade, diâmetro de píleo, número de cogumelos, massa média de cogumelos. A formulação de *spawn* com adição de 5% de serragem resultou na maior EB% obtida.

Um *spawn* adequado é essencial para que o micélio do fungo apresente rápido crescimento ao colonizar um determinado substrato. Especialmente quando se utiliza substratos não convencionais para *shiitake*, ou seja, com maiores teores de celulose e hemicelulose, o *spawn* adequado é capaz de fornecer nutrição, resultando em um micélio vigoroso capaz de se desenvolver no substrato (Donoghue & Denison,

2003). Tanto a composição do substrato quanto a composição do *spawn* são fundamentais na redução da incidência de contaminantes que possam afetar a produção (Mata et al. 1998; Ohmasa & Cheong 1999, Savoie et al. 2000).

No estudo realizado por Gaitán-Hernández & Cortés (2014), foi avaliado o efeito da suplementação do *spawn* em substrato a base de gramínea, e observou-se que, em geral, a produção de *shiitake* utilizando *spawn* suplementado resultou em melhores colheitas em comparação aos tratamentos sem suplementação. Nesse estudo, o período de produção foi significativamente afetado pela formulação do *spawn* utilizada, variando de 34 a 56 dias, sendo que os maiores períodos de produção foram obtidos utilizando-se *spawn* suplementado.

No presente estudo o período de produção variou entre 4 a 69 dias e, independentemente do período de incubação adotado, os maiores períodos de produção foram obtidos com a suplementação do *spawn*, exceto para a linhagem LED 20/06 sob tratamento controle no período de incubação de 75 dias. No estudo de Gaitán-Hernández & Cortés (2014), os autores obtiveram uma produção precoce, com 50 a 72% do total da produção colhida já no primeiro fluxo, resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho (87 a 100%), com período de incubação de 87 dias. No entanto, no menor período de incubação adotado, apenas 9% a 24% da produção foi obtida no primeiro fluxo, diferindo dos resultados do estudo citado.

Ao comparar os resultados obtidos neste estudo com outros autores que utilizaram gramíneas como substrato, observou-se que a TP% foi semelhante (0,63 e 1%/dia) aos valores encontrados por Gaitán-Hernández & Mata (2004) (0,19 e 0,55%/dia) e Gaitán-Hernández et al. (2006) (0,6 a 1,1%/dia), mas inferior aos valores encontrados por Gaitán-Hernández & Cortés (2014) (1 a 1,8%/dia) que também utilizaram *spawn* suplementado em substrato a base de palha de trigo pasteurizado.

Morais et al. (2000) utilizaram palha de arroz em duas formulações de *spawn* nas proporções de 97,1 e 30,2%, para cultivar *L. edodes*, porém não obtiveram produção de basidiomas. Os autores sugeriram que isso ocorreu devido à baixa quantidade de lignina (14,6 e 18,1%) e celulose (32 e 38,6%) no substrato utilizado, o que não foi suficiente para sustentar a frutificação da linhagem de *L. edodes* utilizada. Shifeng et al. (2017) estudaram os efeitos da substituição da serragem por palha de arroz em uma fórmula de substrato convencional e obtiveram maior EB% e produtividade ao utilizar apenas 10% de palha de arroz. Diferentemente do que os

estudos citados encontram, neste estudo foi possível utilizar 63% de palha de arroz na formulação do substrato de cultivo para *L. edodes*, com valores de EB% maiores, graças ao uso de linhagem e formulação de *spawn* adequada.

Os maiores valores de EB% encontrados neste estudo (67,31 e 84%) são semelhantes aos obtidos por Royse & Sanchez (2007) (80,4–98,9%), e superiores aos obtidos por Yang et al. (2017) (36,4–56,6%), Gao et al. (2020) (36,09-49,66%) e Gaitán-Hernández & Mata (2004) (24,8–55,6%). Os valores da EB% encontrados neste estudo são comparáveis aos obtidos por Sharma et al. (2013), com 81% e Manero Colín et al. (2012) com 70,4% que utilizaram serragem como componente principal do substrato. Considerando o método e substrato utilizado neste estudo, o valor de EB% encontrado é aceitável em relação aos mencionados anteriormente.

Este trabalho demonstra que é possível obter alta produtividade e EB%, substituindo 63% de serragem por palha de arroz, utilizando linhagem, formulação de *spawn* e período de incubação adequados. Este estudo confirma os resultados obtidos por Gao et al. (2020), que substituíram a serragem por palha de arroz em produção axênica de *L. edodes* e observaram que é possível substituir mais de 60% da serragem por palha de arroz, e obter elevada produtividade. Além disso, a adição de palha de arroz ao substrato pode reduzir o teor de proteína e os teores de cinzas em cogumelos de *L. edodes*. Este resultado está de acordo com Manzi et al. (1999) e Carnero et al. (2013). No entanto, segundo os autores, a adição de palha aumenta valores de compostos de sabor não voláteis, como os nucleotídeos 5'-monofosfato (GMP) e 5'-monofosfato (IMP), que contribuem para o sabor umami em cogumelos, conforme relatado por Yamaguchi et al. (1971). Shifeng et al. (2017) observaram que o crescimento micelial e a frutificação é mais precoce em substratos que contém palha de arroz, em comparação com substratos com majoritariamente serragem.

A variabilidade nos parâmetros de produtividade encontrados neste estudo foi influenciada significativamente pela formulação do *spawn* e pelos fatores genéticos das duas linhagens avaliadas, além dos diferentes períodos de incubação. As produtividades mais altas obtidas (20,19% e 25,2%) são superiores às encontradas por Gaitán-Hernandez & Mata (2004) (11,7% e 13,9%) e Delpech & Oliver (1991) (11,9% a 15,9%) ao utilizar substrato à base de palha de trigo com pasteurização.

Valenzuela-Cobos et al. (2021) relataram EB% de 64,75% e 63,74% e TP% de 0,83% e 0,86% para linhagens comerciais de *L. edodes* cultivadas em substrato

composto por uma mistura de 50% de serragem de carvalho, 40% de palha de trigo, 5% de casca de semente de algodão e 5% de  $\text{CaCO}_3$ . Esses valores são inferiores aos obtidos neste estudo com 63% de palha de arroz, o que indica que a substituição da serragem por palha de arroz, juntamente com a suplementação do *spawn*, proporciona resultados ótimos na produção de *L. edodes*, semelhantes ou até superiores aos obtidos com a serragem, que é o material mais comumente utilizado no cultivo de *L. edodes*, e superiores aos resultados obtidos com outros agroresíduos.

O tamanho dos cogumelos é uma característica relevante para o mercado e para a eficiência da colheita (Zied et al., 2016), uma vez que cogumelos maiores são geralmente mais desejáveis e podem ser colhidos mais rapidamente. Neste estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no tamanho dos cogumelos colhidos entre as linhagens testadas. No entanto, o período de incubação mais longo (87 dias) resultou, em geral, em cogumelos menores em comparação com o período de incubação mais curto (75 dias). Estes resultados são consistentes com os obtidos por Alberti et al (2022), que também relataram cogumelos maiores quando o período de incubação foi de 70 dias.

A formulação de *spawn* também influenciou no tamanho dos cogumelos colhidos, sendo que as formulações suplementadas forneceram em média, cogumelos maiores em relação ao controle. Esses resultados estão de acordo com Gaitán-Hernández & Cortés (2014), que observaram, ao testar diferentes formulações de *spawn* suplementadas para quatro linhagens de *L. edodes*, que o tamanho predominante dos cogumelos variava de acordo com as diferentes formulações de *spawn* utilizadas. Os autores obtiveram cogumelos principalmente maiores (5 a 14,9 cm) do que os encontrados neste estudo, ao utilizar as formulações suplementadas de *spawn* a seguir: F1: 88,5% milho, 8,8% farelo de trigo, 1,3% turfa de esfagno, 1,3% gesso; e F2: 88,5% milho, 8,8% palha de trigo em pó, 1,3% turfa de esfagno, 1,3% gesso. Esses autores também observaram tamanhos maiores de cogumelos em substratos inoculados com *spawn* suplementado (> 15 cm).

Neste estudo, foram utilizadas duas linhagens comerciais de *shiitake* para avaliar a produção do polissacarídeo lentinana e outros parâmetros de produção. Foi utilizada apenas uma análise para cada linhagem, uma vez que estudos anteriores mostraram que o período de incubação não afeta a composição proximal dos cogumelos colhidos (Alberti et al., 2022). Foram observadas diferenças

estatisticamente significativas no conteúdo de lentinana, dependendo da combinação de linhagem e formulação de *spawn* utilizada. Ambas as linhagens apresentaram valores mais elevados de lentinana quando submetidas a *spawn* suplementado, em comparação com o tratamento controle e a formulação de *spawn* T2. Além disso, a linhagem LED 19/11 apresentou, em média, conteúdo superior de lentinana em comparação com a linhagem LED 20/06. É consenso entre os autores que a qualidade e a composição proximal dos cogumelos colhidos em um determinado substrato dependem da linhagem (Alberti et al., 2022; Gaitán-Hernández & Cortés, 2014).

Alterações no metabolismo fúngico e na composição dos polissacarídeos da parede celular podem ocorrer em resposta ao estresse ou a condições adversas (Smits et al., 2001). Os fungos possuem mecanismos para preservar a integridade da parede celular em resposta a sinais de estresse. As principais respostas fúngicas ao estresse da parede celular estão relacionadas à síntese e à regulação de componentes da parede celular (Bickle et al., 1998; Smits et al., 2001). A alteração na estrutura da parede celular pode levar ao aumento da síntese de  $\beta$ -glucana, como observado em *L. edodes* por Reverberi et al. (2004). No entanto, conforme relatado por Reverberi et al. (2004), o aumento da atividade de síntese de  $\beta$ -glucana não parece estar correlacionado com um aumento no crescimento fúngico. No caso deste estudo, observou-se um aumento maior na quantidade do polissacarídeo lentinana quando as linhagens foram submetidas a *spawn* suplementado com pequenas quantidades de turfa e serragem. Além disso, os resultados mostraram que as linhagens produzem quantidades diferentes de polissacarídeo, dependendo do período de incubação adotado. Esses resultados apoiam a importância da seleção de linhagens para o cultivo comercial, a fim de identificar aquelas mais produtivas e com maior qualidade (Zied et al., 2016).

De acordo com Mata et al. (1998), a adição de turfa à formulação do *spawn* melhorou tanto a defesa contra o ataque de *Trichoderma*, quanto no aumento da EB%, mesmo na ausência de contaminação. Esses efeitos positivos são atribuídos à composição da turfa, que atua como fonte de carbono de liberação lenta e como um componente de proteção. O autor levanta algumas explicações para o efeito benéfico da adição de turfa ao *spawn*. Como *L. edodes* é um fungo lignolítico, ele é capaz de degradar diferentes formas de compostos fenólicos presentes na turfa, o que pode ter efeito fungistático contra *Trichoderma* spp. Além disso, características da turfa, como

capacidade de troca iônica significativa e propriedades adsorventes, podem melhorar a adsorção de cálcio ou outros cátions presentes no substrato, contribuindo para maiores produtividades, conforme observado por Beyer (1997). Por fim, a adsorção de compostos fenólicos tóxicos produzidos por *Trichoderma spp.*, que poderiam ser prejudiciais a *L. edodes*, pode explicar o efeito da adição de turfa na competição entre *L. edodes* e *Trichoderma spp.* em substrato de cultivo à base de gramíneas.

A análise do substrato antes da colonização do fungo mostrou que a relação C/N utilizada (42,5) é semelhante à adotada por Gaitán-Hernandez & Mata (2004) (41) e Li et al. (2019) (52,74) para a produção de *L. edodes* em substrato à base de palha de trigo. O teor de carbono e nitrogênio do substrato são fatores importantes que favorecem a formação dos basidiomas de *shiitake*. Os valores reportados aqui (C = 44%, N = 1,45%) são considerados adequados e estão em concordância com os valores mencionados por Gaitán-Hernandez & Mata (2004) (C = 52,5%, N = 1,28%) e Salmones et al. (1999).

Os fungos basidiomicetos de podridão branca possuem um arsenal enzimático capaz de degradar as estruturas básicas dos materiais lignocelulósicos. Essa degradação de polissacarídeos transforma-os em nutrientes e açúcares simples, que são utilizados no metabolismo do fungo e liberam dióxido de carbono como subproduto. Os nutrientes solubilizados que não são utilizados ficam disponíveis no meio. Após a produção dos cogumelos, foi observada uma redução na relação C/N, como era esperado, devido ao aumento da quantidade de nitrogênio no substrato. O pH e a condutividade elétrica do material também diminuíram. Houve um aumento na quantidade dos elementos analisados, com exceção do metal cobre (Cu), que apresentou menor quantidade após a produção dos cogumelos.

Os fungos basidiomicetos utilizam a celulose e a hemicelulose como substrato para seu crescimento enquanto a degradação da lignina ocorre durante o metabolismo secundário, geralmente em situações de escassez de nutrientes ou em condições de estresse (Leitner et al., 2002). A despolimerização da lignina, é realizada por meio da ação combinada de várias enzimas lignolíticas, sendo a lacase uma das principais. As lacases são enzimas encontradas em plantas, insetos, bactérias e, especialmente, em fungos da podridão branca. Essas enzimas são glicoproteínas que contêm quatro íons de cobre, que desempenham um papel na reação catalítica de oxidação de substratos fenólicos. O fungo utiliza os íons de cobre presentes no substrato para a produção

das enzimas lacases, o que explica a menor quantidade de cobre no substrato após a produção dos cogumelos.

## 6. CONCLUSÃO

A espécie *L. edodes* é o segundo cogumelo mais produzido no mundo e sua produção tende a aumentar, conforme a população conheça seus benefícios e potenciais de utilização. O cultivo de *shiitake* em regiões tropicais e subtropicais utilizando palha de arroz, representa uma alternativa viável devido à alta disponibilidade de material nestas regiões. No entanto, para obter a máxima produtividade, devido às características do material, é importante que se utilize a combinação ideal entre linhagem, formulação de *spawn*, período de incubação e substrato de cultivo.

Com base nos resultados deste estudo, podemos concluir que:

1. O uso de substrato contendo 63% de palha de arroz mostrou-se altamente viável para a produção de *L. edodes*, apresentando excelentes resultados em termos de rendimento, tamanho dos cogumelos e qualidade dos basidiomas;
2. O período de incubação teve impacto nos parâmetros agrônômicos das linhagens de *L. edodes*, destacando a importância de se considerar esse aspecto durante o cultivo;
3. O processo de bioconversão da palha de arroz por *L. edodes*, utilizando um *spawn* nutricionalmente suplementado, mostrou-se promissor para aumentar o rendimento e melhorar a composição química dos cogumelos;
4. Os resultados indicam a necessidade de combinações específicas de linhagem e *spawn*, ressaltando a importância dos produtores em fazer escolhas cuidadosas ao realizar mudanças em suas práticas de produção;
5. O processo do *browning* mostrou-se relevante para a produtividade e manejo dos blocos de cultivo em sala de produção. A indução do *browning* por meio de descolamentos consecutivos durante o período de incubação foi observada como uma estratégia eficaz para reduzir esse intervalo e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção. Foi observado que blocos que não apresentaram capa marrom e formação de exsudatos não são capazes de formar primórdios ou basidiomas, além de serem frágeis e sem estrutura para suportar a reidratação e indução da frutificação por meio de imersão em água.

Mais estudos são necessários para avaliar os efeitos da prática do descolamento e do fotoperíodo como formas de reduzir o período de incubação e se a adição de gesso às formulações de *spawn* também interferiam no período de produção. Além disso, é interessante que futuros estudos investiguem o efeito da quantidade de *spawn* inoculado no substrato de cultivo sobre parâmetros de produção, utilizando a metodologia aqui descrita.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIB (Associação Brasileira Das Indústrias De Biomassa Bioenergia E Pellets). (2022). Agrobiomassa Energética. Disponível em: <https://www.abibbrasil.com.br/>.
- AGUILÓ-AGUAYO, I.; WALTON, J.; VIÑAS, I.; TIWARI, B. K. (2017). Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from mushroom by-products. LWT- Food Science and Technology, 77:92-99. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.11.043.
- AKÇA, E. (2005). Soil Atlas of Europe, European Soil Bureau Network Read full-text Source Article: Soil atlas of Europe.
- ALBERTI, M. M.; MEJÍA, S. J.; PÉREZ-CHÁVEZ, A. M.; LIO, V.; ALBERTÓ, E. (2022). Effects of incubation time and “browning” on yield and proximate composition of the edible mushroom *L. edodes*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 65. DOI: 10.1590/1678-4324-2022210246.
- ALBERTÓ, E. (2008). Cultivo Intensivo de los Hongos Comestibles. Hemisferio Sur, ISBN: 878-950-504-598-3, Buenos Aires.
- ANGELO, R. M. S. (2016). Vitamina D, comparativo de absorção à exposição solar versus suplementação: uma revisão. (Trabalho de Conclusão de Curso – Monografia), Curso de Bacharelado em Farmácia, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité – Paraíba – Brasil.
- ATILA, F. (2018). Compositional changes in lignocellulosic content of some agro-wastes during the production cycle of *shiitake* mushroom. Scientia Horticulturae, 245:263-268. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.10.029.
- BADHAM, E. R. (1991). Growth and competition between *L. edodes* and *Trichoderma harzianum* on sawdust substrates. Mycologia 83(4):455. DOI: 10.2307/3760356.
- BALBI, M. E.; FABENI, F.; LAZINSKI, L. M.; MELO, A. C. S.; SOUZA, H. F. (2013). Análise nutricional e perfil aminoacídico de cogumelos *shiitake* (*L. edodes*, *Agaricaceae*). Visão Acadêmica, 14(4). DOI:[10.5380/ACD.V14I4.35107](https://doi.org/10.5380/ACD.V14I4.35107).
- BARROS, L.; BAPTISTA, P.; CORREIA, D. M.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B.; FERREIRA, I. C. F. R. (2007). Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. Food Chemistry, 105(1):140–145.

- BETT, C. F. & PERONDI, M. A. (2011). Análise do mercado de cogumelos comestíveis e medicinais: uma prospecção de alternativa de renda para a agricultura familiar na região sudoeste do Paraná. *Synergismus scyentifica*, 6:1-8.
- BEYER, M. B. (1997). The effect of chelating agents on the later break yields of *Agaricus bisporus*. *Canadian Journal of Botany*, 75:402-407. DOI: 10.1139/b97-043.
- BICKLE, M.; DELLEY, P. A.; SCHMIDT, A.; HALL, M. N. (1998). Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *The EMBO Journal*, 17(8):2235-2245. DOI: 1093/emboj/17.8.2235.
- BISEN, P. S.; BAGHEL, R. K.; SANODIYA, B. S.; THAKUR, G. S.; PRASAD, G. B. (2010). *L. edodes*: a macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*. 17(22):2419-30. DOI: 10.2174/092986710791698495.
- BOONSONG, S.; KLAYPRADIT, W.; WILAI PUN, P. (2016). Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. *Agriculture and Natural Resources*, 50(2):89-97. DOI: [10.1016/j.anres.2015.07.002](https://doi.org/10.1016/j.anres.2015.07.002).
- BROWN, P.; GILL, S.; ALLEN, S. (2000). Metal removal from wastewater using peat. *Water Research*, 34(16):3907-3916. DOI: [10.1016/S0043-1354\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00152-4)
- BRUHN, J. & MIHAIL, J. (2009). Forest farming of *shiitake* mushrooms: Aspects of forced fruiting. *Bioresource Technology*, 100(23):5973-5978. DOI: [10.1016/j.biortech.2009.01.079](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.079)
- CAPRA, R. S. & TONIN, F. B. (2019). Ascensão do cultivo de cogumelos comestíveis no brasil. VIII Jornada Científica e Tecnológica. Disponível em: <http://www.jornacitec.fatecbt.edu.br/index.php/VIIIJTC/VIIIJTC/paper/viewFile/1755/2174>.
- CARNEIRO, A. A.; FERREIRA, I. C.; DUEÑAS, M.; BARROS, L.; SILVA, R.; GOMES, E.; SANTOS-BUELGA, C. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *L. edodes*. *Food Chemistry*, 138:2168–2173. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.12.036.
- CHANG, S. T. (2008). Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods. *Mushrooms as functional foods*. New Jersey: John Wiley & Sons. DOI: 10.1002/9780470367285.ch1

- CHANG, S., & MILES, G. P. (2004). Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effects and Environmental Impact (p. 436). Boca Raton, FL: CRC Press. DOI: [10.1201/9780203492086](https://doi.org/10.1201/9780203492086)
- CHANG, S.T. (2018). Mushroom and Mushroom Biology. DOI: 10.1201/9780203753682-1.
- CHEN, A. (2005). *Shiitake* bag cultivation. In: Chang ST, Quimio TH. editors. Mushroom grower's handbook. MushWorld, p. 88–90. ISSN 1739-1377.
- CHEUNG, P. C. K. (2013). Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. Food Science and Human Wellness, 2(3–4):162–166. DOI: 10.1016/j.fshw.2013.08.001.
- CHEUNG, P.C.K. (2010). The nutritional and health benefits of mushrooms. Nutrition Bulletin, 35, 292–299. DOI: 10.1111/j.1467-3010.2010.01859.x.
- CHITTARAGI, A.; KUMAR, A.; SINGH, S. (2020). International Journal of Botany Studies Optimization of the spawn of *shiitake* mushroom [*L. edodes* (Berk.) Pegler]. DOI: 10.13140/RG.2.2.31884.74885.
- DABA, A. S.; KABEIL, S.; BOTROS, W. A.; EL-SAADANI, M. (2008). Production of mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Egypt as a source of nutritional and medicinal food. World Journal of Agricultural Sciences 4(5):630-634.
- DAYANI, S.; SABZALIAN, M.; MOEINI, M.; SALIMI, R. (2017). Supplementing the growing substrate with wheat-milling residues to improve *shiitake* mushroom yield and nutritional quality. International Journal of Vegetable Science. 24:1-15. DOI: 10.1080/19315260.2017.1419396.
- DELPECH, P. & OLIVIER, J. M. (1991) Cultivation of *shiitake* on straw based pasteurized substrates. Mushroom Science, 12:523–528.
- DI PIERRO, F.; BERTUCCIOLI, A.; CAVECCHIA, I. (2020). Possible therapeutic role of a highly standardized mixture of active compounds derived from cultured *L. edodes* mycelia (AHCC) in patients infected with 2019 novel coronavirus. Minerva Gastroenterologica e Dietologica, 66(2):172-6. DOI: 10.23736/S1121-421X.20.02697-5.
- DIAS, E. S. (2010). Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. Ciência e Agrotecnologia 34(4):795-803. DOI: 10.1590/S1413-70542010000400001.

- DONOGHUE, J. & DENISON, W. (2003). Commercial production of *shiitake* (*L. edodes*) using whole-log chips of *Quercus*, *Lithocarpus* and *Acer*. In: Royse J. editor. Mushroom Biology and Mushroom Products. Pennsylvania: Penn State Univ. Press. p. 265-75
- DZURENOVA, S.; ZIMMERMANN, B.; KOHLER, A.; REITZEL, K.; NIELSEN, U. G.; DUPUY-GALET, B. X.; LEIVERS, S.; HORN, S. J.; SHAPAVAL, V. (2021). Calcium affects polyphosphate and lipid accumulation in mucoromycota fungi. Journal of Fungi, 7(4). DOI: [10.3390/jof7040300](https://doi.org/10.3390/jof7040300)
- ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; ASATIANI, M. (2015). *Shiitake* medicinal mushroom, *L. edodes* (Higher *Basidiomycetes*) productivity and lignocellulolytic enzyme profiles during wheat straw and tree leaf bioconversion. International Journal of Medicinal Mushrooms, 17(1):77-86. DOI: 10.1615/intjmedmushrooms.v17.i1.80.
- ELIUZ, E. A. E. (2022) Antibacterial activity and antibacterial mechanism of ethanol extracts of *L. edodes* (*shiitake*) and *Agaricus bisporus* (button mushroom). International Journal of Environmental Health Research, 32:8, 1828-1841, DOI: [10.1080/09603123.2021.1919292](https://doi.org/10.1080/09603123.2021.1919292)
- FAN, L.; PAN, H.; WU, Y.; CHOI, K. W. (2005) Pest and disease management in *shiitake* bag cultivation. In: *Shiitake* cultivation. Mushroom growers' handbook 2. MushWorld, Seul. Pp. 192-198.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2022). World Food Situation. Available online: <https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>.
- FARIA, K. K.; CORREA, M.; MANSANI, G. (2022). Cogumelos e segurança alimentar: A fungicultura como estratégia de minimizar ou compensar perdas na produção de alimentos. Cadernos de Agroecologia - ISSN 2236-7934 - Anais Da Reunião Técnica Sobre Agroecologia, 17(3).
- FERREIRA, D. F. (2019). SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. Revista Brasileira De Biometria, 37(4):529-535. DOI: <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>.
- FINIMUNDY, T. C.; GAMBATO, G.; FONTANA, R.; CAMASSOLA, M.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; HESS, J.; HENRIQUES, J. A.; DILLON, A. J.; ROESCH-ELY, M. (2013).

Aqueous extracts of *L. edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity. *Nutrition Research*, 33(1):76-84. DOI: 10.1016/j.nutres.2012.11.005.

FRANCHI, J. G. (2006). Diagnóstico das turfas no brasil: histórico da utilização, classificação, geologia e dados econômicos. *Revista Brasileira de Geociências*, vol. 36 (I - Suplemento): 179-190.

GAITÁN-HERNÁNDEZ, R. & MATA, G. (2004) Cultivation of edible mushroom *L. edodes* (*shiitake*) in pasteurized wheat straw. Alternative use of geothermal energy in Mexico. *Engineering in Life Sciences*, 4:363-367. DOI: 10.1002/elsc.200420042.

GAITÁN-HERNÁNDEZ, R. & CORTÉS, G. M. N. (2014). Improvement of yield of the edible and medicinal mushroom *L. edodes* on wheat straw by use of supplemented *spawn*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2):467-474. DOI: 10.1590/S1517-83822014000200013.

GAITÁN-HERNÁNDEZ, R.; ESQUEDA, M.; GUTIÉRREZ, A.; SÁNCHEZ, A.; BELTRÁN-GARCÍA, M.; MATA, G. (2006). Bioconversion of agrowastes by *L. edodes*: the high potencial of viticulture residues. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71:432–39. DOI: 10.1007/s00253-005-0241-1.

GAITÁN-HERNÁNDEZ, R.; LÓPEZ-PEÑA, D.; ESQUEDA, M.; GUTIÉRREZ, A. (2019). Review of Bioactive Molecules Production, Biomass, and Basidiomata of *shiitake* Culinary-Medicinal Mushrooms, *L. edodes* (*Agaricomycetes*). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 21(9):841–850. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2019031849.

GAITÁN-HERNÁNDEZ, R.; ZAVALA, M. A. B.; AQUINO-BOLAÑOS, E. N. (2017). Productivity, Physicochemical Changes, and Antioxidant Activity of *shiitake* Culinary-Medicinal Mushroom *L. edodes* (*Agaricomycetes*) Cultivated on Lignocellulosic Residues. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 19(11):1041–1052. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2017024521.

GANLEY, R. J.; SNIEZKO, R. A.; NEWCOMBE, G. (2008) Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. *For Ecol Manag* 255:2751–2760. DOI: 10.1016/j.foreco.2008.01.052.

- GAO, S.; HUANG, Z.; FENG, X.; BIAN, Y.; HUANG, W.; LIU, Y. (2020). Bioconversion of rice straw agroresidues by *L. edodes* and evaluation of non-volatile taste compounds in mushrooms. *Scientific Reports*, 10:1814. DOI: [10.1038/s41598-020-58778-x](https://doi.org/10.1038/s41598-020-58778-x).
- GBOLAGADE, J. S.; FASID, I. O.; AJAYI, E. J.; SOBOWALE, A. A. (2006). Effect of physico-chemical factors and semi-synthetic media on vegetative of *Lentinus subnudus* (Berk.), and edible mushroom from Nigeria. *Food Chem* 99:742–747. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.08.052.
- GNATOWSKI, T.; SZATYŁOWICZ, J.; BRANDYK, T.; KECHAVARZI, C. (2009). Hydraulic properties of fen peat soils in Poland, *Geoderma*, 154(3–4):188-195. DOI: 10.1016/j.geoderma.2009.02.021.
- GONG, W. B., XU, R., XIAO, Y., ZHOU, Y. & BIAN, Y. B. (2014). Phenotypic evaluation, and analysis of important agronomic traits in the hybrid and natural populations of *L. edodes*. *Scientia Horticulturae*, 179:271–276. DOI: 10.1016/j.scienta.2014.09.044.
- GRÜNDEMANN, C.; GARCIA-KÄUFER, M.; SAUER, B. (2015). Comparative chemical and biological investigations of  $\beta$ -glucan-containing products from *shiitake* mushrooms. *Journal of Functional Foods*, 18:692–702. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615004077>.
- HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V; PERALTA, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits – an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, p. 1–22. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x.
- HIRAIDE, M. (2006) The smell and odorous components of dried *shiitake* mushroom, *L. edodes* III: substances that increase the odorous compound content. *Journal of Wood Science*, 52:265-69. DOI: 10.1007/s10086-005-0758-z.
- HIRAIDE, M.; MIYAZAKI, Y.; SHIBATA, Y. (2004) The smell and odorous components of dried *shiitake* mushroom, *L. edodes* I: relationship between sensory evaluations and amounts of odorous components. *Journal of Wood Science*, 50:358-64. DOI: 10.1007/s10086-003-0568-0.
- HIRAIDE, M.; NAKASHIMA, T.; FUJIWARA, T. (2010) The smell and odorous components of dried *shiitake* mushroom, *L. edodes* VI: increase in odorous compounds of dried

*shiitake* mushroom cultivated on bed logs. Journal of Wood Science, 56:483-487. DOI: 10.1007/s10086-009-1129-y.

HUSSAIN, S. (2020). Rice production under climate change: Adaptations and mitigating strategies. In book: Environment, Climate, Plant and Vegetation Growth, 1:26, Springer Nature. DOI: 10.1007/978-3-030-49732-3-26.

ITO, T.; URUSHIMA, H.; SAKAUE, M.; YUKAWA, S.; HONDA, H.; HIRAI, K.; IGURA, T.; HAYASHI, N.; MAEDA, K.; KITAGAWA, T.; KONDO, K. (2014). Reduction of adverse effects by a mushroom product, active hexose correlated compound (AHCC) in patients with advanced cancer during chemotherapy—the significance of the levels of HHV-6 DNA in saliva as a surrogate biomarker during chemotherapy. Nutrition and Cancer, 66. DOI: 10.1080/01635581.2014.884232.

IRRI – International Rice Research Institute (2023). Rice Straw Management. Disponível em: <https://www.irri.org/rice-straw-management>.

JIANG, L.; WALCZYK, D.; MCINTYRE, G.; BUCINELL, R. (2016). A new approach to manufacturing biocomposite sandwich structures: Mycelium-based cores. Proceedings of the ASME 11th International Manufacturing Science and Engineering Conference. At: Blacksburg, Virginia, USA. American Society of Mechanical Engineers. DOI: 10.1115/MSEC2016-8864

JIANG, Y., QIAN, H., HUANG, S., ZHANG, X., WANG, L., ZHANG, L., SHEN, M., XIAO, X., CHEN, F., ZHANG, H., LU, C., LI, C., ZHANG, J., DENG, A., & ZHANG, W. (2019). Acclimation of methane emissions from rice paddy fields to straw addition. Science Advances, 5(1). DOI: 10.1126/sciadv.aau9038

KALAC, P. (2010). Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: A review for the period 2000–2009. Food Chemistry, 122(1):2-15. DOI: [10.1016/j.foodchem.2010.02.045](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.045).

KALAC, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. Food Chemistry, 113(1):9-16. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.07.077

KALBERER, P. (1998). Influence of the substrate components on the crop yield of *shiitake* (*L. edodes* (Berk.) Singer). Gartenbauwissenschaft, Germany, 63:15-19.

- KALILI, K. M. & VILLIERS, A. (2011). Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *Journal of Separation Science*, 34(8):854-76. DOI: 10.1002/jssc.201000811.
- KANG, M. Y.; RICO, C. W.; LEE, S. C. (2012). In vitro antioxidative and antimutagenic activities of oak mushroom (*L. edodes*) and king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) by products. *Food Science and Biotechnology*, 21:167–73. DOI: 10.1007/s10068-012-0021-5
- KHAN, M. W.; ALI, M.; KHAN, N.; KHAN, M.; REHMAN, A.; JAVED, N. (2013) Effect of different levels of lime and pH on mycelial growth and production efficiency of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.). *Pakistan Journal of Botany* 45:297–302.
- KLEIN, K. (1996). Pattern formation and development of the fungal mycelium. In S.-W. Chiu and D. Moore (eds.), *Patterns in fungal development*, pp. 70–86. Cambridge University Press, Cambridge.
- KOSRE, A.; MAHISH, K. D.; CHANDRAWANSHI N. P. (2021). Current perspective of sustainable utilization of agrowaste and biotransformation of energy in mushroom. *Energy: Crises, Challenges and Solutions*, First Edition. DOI: [10.1002/9781119741503.ch15](https://doi.org/10.1002/9781119741503.ch15).
- KÖHLER, J. R.; CASADEVALL, A. PERFECT, J. (2014). The Spectrum of Fungi That Infects Humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. DOI: 10.1101/cshperspect.a019273.
- KOZARSKI, M. S.; KLAUS, A. S.; NIKNIŠ, M. P.; GRIENSVEN, L. J. L. D. Van; VRVIŠ, M. M.; JAKOVLJEVIŠ, D. M. (2014). Polysaccharides of higher fungi: biological role, structure and antioxidative activity. *Chemical Industry*, 68(3):305–320. DOI:10.2298/HEMIND121114056K.
- LAKHANPAL, T. N. & RANA, M. (2005). Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. *Plant Genetic Resources*, 3(2):288-303. DOI:10.1079/PGR200581
- LEATHAM, G. F. (1986) The ligninolytic activities of *L. edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 24:51-58. DOI: 10.1007/BF00266285.

- LEE, H. S.; PARK, Y. W.; LEE, H. Y.; CHOI, S. G.; KOO, C. D. (2018) Changes of nutrient contents in the log of *Quercus acutissima* by cutting period for *L. edodes* log cultivation. Forest Science and Technology 14(1):33-40. DOI: 10.1080/21580103.2017.1421589.
- LEITNER, C.; HESS, J.; GALHAUP, C.; LUDWIG, R.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; HALTRICH, D. (2002). Purification and characterization of a laccase from the white-rot fungus *Trametes multicolor*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 98(100):497-507. DOI: 10.1385/abab:98-100:1-9:497.
- LI, J.; DUAN, Y.; HU, Z.; YANG, F.; WU, X.; ZHANG, R. (2022). Physiological mechanisms by which gypsum increases the growth and yield of *L. edodes*. Applied Microbiology and Biotechnology, 106(7):2677-2688. DOI: 10.1007/s00253-022-11884-4.
- LIM, S. M. & YIM, H. S. (2012). Determination of optimal extraction time and temperature by Response Surface Methodology to obtain high-level antioxidant activity in culinary - medicinal Oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Higher Basidiomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms, 14(6):593-602. DOI: 10.1615/intjmedmushr.v14.i6.70.
- LIN, Z. & LIN, Z. (1997). JunCao technology. Fuzhou: AsiaPacific Fungi Cultivation Training Center, 129 p.
- LINDER, T. (2018) Assimilation of alternative sulfur sources in fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 34(4):51. DOI: 10.1007/s11274-018-2435-6
- LINO, C. & CARVALHO, P. (2018): Património micológico e micoturismo.. Revista Turydes: Turismo y Desarrollo, 11(24):1-17.
- LIMPENS, J., BERENDSE, F., BLODAU, C., CANADELL, J. G., FREEMAN, C., HOLDEN, J.; ROULET, N.; SCHAEPMAN-STRUB, G. (2008). Peatlands and the carbon cycle: from local processes to global implications – a synthesis. Biogeosciences, 5(5):1475–1491. DOI:10.5194/bg-5-1475-2008.
- LLARENA-HERNÁNDEZ, R. C.; LARGETEAU, M. L.; FARNET, A. M.; FOULONGNE-ORIOLE, M.; FERRER, N.; REGNAULT-ROGER, C.; SAVOIE, J. M. (2013). Potential of European wild strains of *Agaricus subrufescens* for productivity and quality on wheat straw-based compost. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29(7):1243-53. DOI: 10.1007/s11274-013-1287-3.

- LLARENA-HERNANDEZ, R. C.; LARGETEAU, M. L.; FERRER, N.; REGNAULT-ROGER, C.; SAVOIE, J. (2014). Optimization of the cultivation conditions for mushroom production with European wild strains of *Agaricus subrufescens* and Brazilian cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15;94(1):77-84. DOI: 10.1002/jsfa.6200.
- LOGESWARAN, J.; SHAMSUDDIN, A.H.; SILITONGA, A.S.; MAHLIA, T.M.I. (2020). Prospect of using rice straw for power generation: A review. *Environmental Science and Pollution Research International*, Jul;27(21):25956-25969. DOI: 10.1007/s11356-020-09102-7.
- LÓPEZ-CAUCE, B.; URQUÍA, A.; MENCHÉN, L.; HOMMA, K.; BOLÁS-FERNÁNDEZ, F.; GARCÍA-RODRIGUEZ, J. J.; PUERTO, M. (2022). *L. edodes* extract increases goblet cell number and Muc2 expression in an intestinal inflammatory model of *Trichinella spiralis* infection. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 150:112937. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.112937.
- MAHDIZADEH, V.; SAFAIE, N., SALEHI, M.; JAHEDI, A. (2021). Substrate preference of *L. edodes* (Berk.) Pegler strains. *Journal of Crop Protection*, 10(1):63-74. Disponible em: <http://jcp.modares.ac.ir/article-3-45777-en.html>.
- MANERO COLÍN, I. N.; ACOSTA-URDAPILLETA, M. L.; ARCOS, E. M.; MEDRANO-VEJA, F. A. (2012). Cultivo de *L. edodes* en aserrín de jacaranda con nutrientes. In: VÁZQUEZ, J. E. S., MATA, G. (eds) *Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica: Investigación y Desarrollo en un Entorno Multicultural*. El Colegio de la Frontera Sur-Instituto de Ecología, A.C., Tapachula. Pp. 229-239.
- MANZI, P., GAMBELLI, L., MARCONI, S., VIVANTI, V. & PIZZOFERRATO, L. (1999). Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry*, 65:477–482. DOI: 10.1016/S0308-8146(98)00212-X.
- MARTÍNEZ, A. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J. C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8(3):195-204.
- MARTÍNEZ-GUERRERO, M. A.; SIHUANCA, D.; MACÍAS-LÓPEZ, A.; PÉREZ- LÓPEZ, R. I.; MARTÍNEZ-MADRIGAL, J. D.; LÓPEZ-OLGUÍN, J. F. (2012) Characterization and

- production of *shiitake* (*L. edodes*) in Mexico using supplemented sawdust. *African Journal of Biotechnology*, 11(46). DOI: 10.5897/AJB12.266.
- MATA, G & SAVOIE, J. M. (1998). Extracellular enzyme activities in six *L. edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14. DOI: 10.1023/A:1008886521091.
- MATA, G. & SAVOIE, J. (2018). *Shiitake* cultivation on straw: an alternative for subtropical regions. In: Sánchez Vázquez J, Mata G, Royse D. editors. *Updates on Tropical Mushrooms. Basic and Applied Research*, p. 155-34.
- MATA, G.; ORTEGA SÁNCHEZ, C.; PÉREZ MERLO, R. (2011). Inóculo suplementado: Evaluación de un método para optimizar la producción de inóculo para el cultivo de *Pleurotus* en pulpa de café. *Revista Mexicana de Micología*, 34:53-61.
- MATA, G.; SAVOIE, J. M. DELPECH, P.; OLIVIER, J. (1998). Reductions in the incidence of *Trichoderma* spp. using substrate supplementation with peat and an alternative spawn during cultivation of *L. edodes* on pasteurized wheat straw. *Agronomie*, 18(8-9):515-520.
- MATA, G.; VALDEZ, K.; MENDOZA, R.; TRIGOS, A. (2014). HS/GC-MS analyzed chemical composition of the aroma of fruiting bodies of two species of genus *Lentinus* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 16(5):477-84. DOI: 10.1615/intjmedmushrooms.v16.i5.60.
- MORAIS, M.; RAMOS, A.; MATOS, N.; OLIVEIRA, E. (2000). Note. Production of *shiitake* mushroom (*L. edodes*) on lignocellulosic residues. *Food Science and Technology International*, 6:123-128. DOI: 10.1177/108201320000600206.
- MORALES, D.; TEJEDOR-CALVO, E.; JURADO-CHIVATO, N.; POLO, G.; TABERNERO, M.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; LARGO, C.; SOLER-RIVAS, C. (2019). In vitro and in vivo testing of the hypocholesterolemic activity of ergosterol- and  $\beta$ -glucan-enriched extracts obtained from *shiitake* mushrooms (*L. edodes*). *Food and Function*, 10, 7325-7332. DOI: [10.1039/C9FO01744E](https://doi.org/10.1039/C9FO01744E).
- NACZK, M. & SHAHIDI, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, 1054:95–111. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.08.059.

- OHGA, S. & ROYSE, D.J. (2001). Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *L. edodes* on supplemented sawdust. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, 201:111-115. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10741.x.
- OHMASA, M. & CHEONG, M. L. (1999). Effects of culture conditions of *L. edodes*, “shiitake mushroom,” on the disease resistance of *L. edodes* against *Trichoderma harzianum* in the sawdust cultures. In: The 3rd International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products.
- OLIVEIRA, D. H. S.; SILVA, M. I. O.; FONSECA, R. G.; FERREIRA, J. C. S. (2021). The importance of healthy eating as a way to increase immunity through vitamins and minerals. Research, Society and Development, 10(12):103101220305. DOI: 10.33448/rsd-v10i12.20305.
- ÖZÇELİK, E. & PEKŞEN, A. (2007). Hazelnut husk as a substrate for the cultivation of *shiitake* mushroom (*L. edodes*). Bioresource Technology, 98:2652–2658. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.09.020.
- PARDO-GIMÉNEZ, A.; PARDO, J. E.; DIAS, E. S.; RINKER, D. L.; CAITANO, C. E. C.; ZIED, D. C. (2020). Optimization of cultivation techniques improves the agronomic behavior of *Agaricus subrufescens*. Scientific Reports, 10:8154. DOI: [10.1038/s41598-020-65081-2](https://doi.org/10.1038/s41598-020-65081-2).
- PHAT, C.; MOON, B.; LEE, C. (2016). Evaluation of umami taste in mushroom extracts by chemical analysis, sensory evaluation, and an electronic tongue system. Food Chemistry, 192:1068–1077. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.113.
- PRZYBYLOWICZ, P. & DONOGHUE, J. (1990) *Shiitake* growers handbook. The art and science of mushroom cultivation. Kendall/Hunt, Dubuque
- PURI, S. (2011). Agricultural wastes as substrate for *spawn* production and their effect on *shiitake* mushroom cultivation. International Journal of Science and Nature, vol. 2(4):733-736.
- DESHMUKH, R., KHARDENAVIS, A. A., & PUROHIT, H. J. (2016). Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. Indian Journal of Microbiology, 56(3):247-264. DOI: 10.1007/s12088-016-0584-6.

- REIS, F. S.; BARROS, L.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. F. R. (2012). Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2):191-197. DOI: 10.1016/j.fct.2011.10.056.
- REIS, G. C., CUSTÓDIO, F. B., BOTELHO, B. G., GUIDI, L. R., & GLORIA, M. B. A. (2020). Investigation of biologically active amines in some selected edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 86: 103375. DOI: [10.1016/j.jfca.2019.103375](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103375).
- REVERBERI, M.; DI MARIO, F.; TOMATI, U. (2004).  $\beta$ -Glucan synthase induction in mushrooms grown on olive mill wastewaters. *Applied Microbial and Cell Physiology* 66:217–225. DOI 10.1007/s00253-004-1662-y.
- RINKER, D. L. (1991). The influence of heat treatment, genotype, and other cultural practices on the production of *shiitake* mushrooms on sawdust. In: International Congress on Science and Cultivation of Edible Fungi, 13, Dublin. Proceedings, p.497-502.
- RITZ, B. W.; NOGUSA, S.; ACKERMAN, E. A.; GARDNER, E. M. (2006). Supplementation with active hexose correlated compound increases the innate immune response of young mice to primary influenza infection. *The Journal of Nutrition*, 136(11):2868–2873. DOI: 10.1093/jn/136.11.2868.
- ROMAN, B. E.; BELI, E.; DURIANCIK, D. M.; GARDNER, E. M. (2012). Short-term supplementation with active hexose correlated compound improves the antibody response to influenza B vaccine. *Nutrition Research*, 33(1):12–17. DOI: 10.1016/j.nutres.2012.11.001.
- ROP, O.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T. (2009).  $\beta$ -glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews*, 67:624–631. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2009.00230.x.
- ROSZCZYK, A.; TURŁO, J.; ZAGOZDŃ, R.; KALETA, B. (2022). Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from *L. edodes*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23:8980. DOI: 10.3390/ijms23168980.
- ROY, A.; KUMAR, A.; BARUAH, D.; TAMULI, R. (2021). Calcium signaling is involved in diverse cellular processes in fungi. *Mycology*, 12(1):10–24. DOI: [10.1080/21501203.2020.1785962](https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1785962).

- ROYSE, D. (1985). Effect of *spawn* run time and substrate nutrition on yield and size of the *shiitake* mushrooms. *Mycologia*, 77(5):756-62. DOI: 10.2307/3793284.
- ROYSE, D. J. & SANCHEZ, J. E. (2007). Ground wheat straw as a substitute for portions of oak wood chips used in *shiitake* (*L. edodes*) substrate formulae. *Bioresource Technology*, 98: 2137–41. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.08.023.
- ROYSE, D. J. (1996). Specialty mushrooms. In: Janick, J. (ed.). *Progress in New Crops*. ASHS Press, Arlington, p. 464-475.
- ROYSE, D. J. (2009). Cultivation of *shiitake* on Natural and Synthetic Logs. College of Agricultural Sciences, Penn State University, University Park, PA, USA.
- ROYSE, D. J.; BAARS, J.; TAN, Q. (2017). Current overview of mushroom production in the world. In: ZIED, D. C.; PARDO-GIMENEZ, A. *Edible and medicinal mushrooms: technology and applications*, 2:5-13. DOI: 10.1002/9781119149446.ch2.
- SALES-CAMPOS, C. (2008). Aproveitamento de resíduos madeireiros e da agroindústria regional para o cultivo de fungos comestíveis de ocorrência na região amazônica. 182 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- SALMONES, D.; MATA, G.; RAMOS, L. M.; WALISZEWSKI, K. N. (1999). Cultivation of *shiitake* mushroom, *L. edodes*, in several lignocellulosic materials originating from the subtropics. *Agronomie*, 19:13-19. hal-00885909.
- SANTOS, E. R. D. (2015). Material Complementar ao livro *Sistemática Vegetal I: Fungos*. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.
- SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; ARAUJO FILHO, J. C.; OLIVEIRA, J. B.; CUNHA, T. J. F. (2018). *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Brasília: Embrapa Produção de Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos. ISBN: 9788570358004.
- SANUMA, O. I.; Sanuma, J.; Sanuma, K.; Sanuma, L. R.; Sanuma, M.; Sanuma, M.; Apiamö, R. M.; Sanuma, S. (2016). *Enciclopédia dos Alimentos Yanomami (Sanöma): cogumelos*. São Paulo: Instituto Socioambiental. Série Saberes da Floresta.
- SAVOIE, J. M. & MATA, G. (1999). The antagonistic action of *Trichoderma* sp. hyphae to *L. edodes* hyphae changes in lignocellulolytic activities during cultivation in wheat straw.

World Journal of Microbiology and Biotechnology, 15:369-373. DOI: 10.1023/A:1008979701853.

SAVOIE, J. M.; DELPECH, P.; BILLETE, C.; MATA G (2000). Inoculum adaptation changes the outcome of competition between *L. edodes* and *Trichoderma* spp. during *shiitake* cultivation on pasteurized wheat straw. Mushroom Science, 15:667-674.

SAVOIE, J. M.; MATA, G.; BILLETTE, C. (1998). Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma* spp. and *shiitake*, *L. edodes*, Applied Microbiology and Biotechnology, 49:589-593. DOI: 10.1007/s002530051218.

SCHUMACHER, V. M., SANTOS, A., COLLING, A., & MÜLLER, E. (2013). Caracterização de turfas brasileiras para uso em energia. Revista Brasileira de Energias Renováveis, 2(2):49-62. DOI: 10.5380/rber.v2i2.30948.

SEO, D. & KOO, C. (2019). Effect of light wavelengths on the mycelial browning of *L. edodes* strain. Sanjo 701ho. The Korean Journal of Mycology, 47(1):63-73.

SERNA-DÍAZ, M. G.; MERCADO-FLORES, Y.; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, A.; ANDUCHO-REYES, M. A.; MEDINAMARÍN, J.; TUOH-MORA, J. S.; TÉLLEZ-JURADO, A. (2020). Use of barley straw as a support for the production of conidiospores of *Trichoderma harzianum*. Biotechnology Reports e00445. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00445.

SHARMA, S.; KHANNA, P. K.; KAPOOR, S. (2013). Effect of supplementation of wheat bran on the production of *shiitake* (*L. edodes* (Berk) Peglar) using wheat straw and sawdust substrates. The Bioscan, 8(3):817-820.

SHIFENG, Y.; YANG, X.; TIANJI, H.; JIAN, Z.; JUNPENG, L.; YUHUA, G.; YINBING, B. (2017). Effects of incorporating rice straw in *L. edodes* cultivation substrates on mycelial growth and selected fruit body parameters. Acta Edulis Fungi, 24(3):30–34.

SINGER, R. & HARRIS, B. (1987). Mushrooms and truffles: botany, cultivation and utilization. Ciesnmitt: Koeltz Scientific Books, p. 273-278.

SMITH, J. A.; MATHEW, L.; GAIKWAD, A., RECH, B.; BURNEY, M. N.; FARO, J. P.; LUCCI, J. A.; BAI, Y.; OLSEN, R. J.; BYRD, T. T. (2019). From Bench to Bedside: Evaluation of AHCC Supplementation to Modulate the Host Immunity to Clear High-Risk Human Papillomavirus Infections. Frontiers in Oncology, 9:173. DOI: 10.3389/fonc.2019.00173.

- SMITS, G. J.; VAN DER ENDE, H.; KLIS, F. M. (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology*, 147:781–794. DOI: 10.1099/00221287-147-4-781.
- SOUSA, M.; COSTA, L.; SOUZA, T.; ZIED, D.; RINKER, D.; SOUZA, E. Enzyme activity and biochemical changes during production of *L. edodes* (Berk.) Pegler. *Food Science and Technology*, 39(3):774-780. DOI: 10.1590/fst.38517.
- STAMETS, P. (2000). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. 3rd ed. Berkeley: Ten Speed Press.
- SUDHEEP, N. M. & SRIDHAR, K. R. (2014). Nutritional composition of two wild mushrooms consumed by the tribals of the Western Ghats of India. *Mycology*, 5(2):64–72. DOI: 10.1080/21501203.2014.917733.
- SUN, L.; LIU, Q.; BAO, C.; FAN, J. (2017). Comparison of free total amino acid compositions and their functional classifications in 13 wild edible mushrooms. *Molecules*, 22:1–10. DOI: 10.3390/molecules22030350.
- TANG, L.; JIAN, H.; SONG, C.; BAO, D.; SHANG, X.; WU, D.; TAN, Q.; ZHANG, X. (2013). Transcriptome analysis of candidate genes and signaling pathways associated with light-induced brown film formation in *L. edodes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(11):4977-89. DOI: 10.1007/s00253-013-4832-y.
- TARUSHI, S. D. & SUD, A. (2021). Evaluation of different sawdust substrates for *spawn* production of *shiitake* mushroom [*L. edodes* (Berk.)]. *Mushroom Research*, 29(2).
- THAKUR, M. (2020). Advances in mushroom production: key to food, nutritional and employment security: A review. *Indian Phytopathology*. 73(2). DOI: 10.1007/s42360-020-00244-9.
- TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. *Microbiologia-12ª Edição*. Artmed Editora, 2016.
- URBEN, A. F.(ed.). (2017). *Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada: biotecnologia e aplicações na agricultura e na saúde*. Brasília: Embrapa.
- USDA (United States Department of agriculture). Economic Research Service | Situation and Outlook. Rice Outlook: October 2022.

- UTEPBERGENOVA, G. & BAITUGANOV, A. (2019). Herpesviruses and AHCC. International Congress on Nutrition and Integrative Medicine. Sapporo, Japan.
- VALENZUELA-COBOS, J.; Guevara-Viejó, F.; Cárdenas-Cobo, J.; Lazo, R.; Noriega, D.; Grijalva, A.; Garcés, F. (2021). Production of biomass and exopolysaccharides obtained from *Pleurotus* hybrid strains under different pHs to remove heavy metals in aquaculture effluents. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 25(2):615-622. DOI: 10.21608/ejabf.2021.166248.
- VIEIRA JUNIOR, W. G. (2021). Caracterização genética e diferentes condições de cultivo em *Agaricus subrufescens* (Dissertação), UNESP Jaboticabal, SP.
- VIKINESWARY, S. & CHANG, S. T. (2013). Edible and medicinal mushrooms for sub-health intervention and prevention of lifestyle disease. *Technology Trends*, jul-sep:33–43.
- VILLARES, A.; MATEO-VIVARACHO, L.; GUILLAMÓN, E. (2012). Structural features and healthy properties of polysaccharides occurring in mushrooms. *Agriculture*, 2(4):452–471. DOI: 10.3390/agriculture2040452.
- VINCETI, B.; TERMOTE, C.; ICKOWITZ, A.; POWELL, B.; KEHLENBECK, K.; HUNTER, D. (2013). The contribution of forests and trees to sustainable diets. *Sustainability*, 5(11):4797–4824. DOI: 10.3390/su5114797.
- VIVEK, N.; NAIR, L.M.; MOHAN, B.; NAIR, S.C.; SINDHU, R.; PANDEY, A.; SHURPALI, N.; BINOD, P. (2019). Bio-butanol production from rice straw—recent trends, possibilities, and challenges. *Bioresource Technology Reports*, 7:100224. DOI: 10.1016/j.biteb.2019.100224
- WAHYUDIN, E.; SYUKUR, R.; YUSUF, I.; KATU, S.; ISKANDAR, M. H.; MUSLIMIN, L. HIV and AHCC. (2017). International Congress on Nutrition and Integrative Medicine. Sapporo; Japan.
- WANG, X. M.; ZHANG, J.; WU, L. H.; ZHAO, Y. L.; LI, T.; LI, J. Q.; WANG, Y. Z.; LIU, H. G. (2014). A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. *Food Chemistry*, 15(151):279–285. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.062.

- XU, L.; FANG, X.; WU, W.; CHEN, H.; MU, H.; GAO, H. (2019). Effects of high-temperature pre-drying on the quality of air-dried *shiitake* mushrooms (*L. edodes*). Food Chemistry, 285:406-13. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.01.179.
- YAMAGUCHI, S.; YOSHIKAWA, T.; IKEDA, S.; NINOMIYA, T. (1971). Measurement of the relative taste intensity of some L- $\alpha$ -amino acids and 5'-nucleotides. Journal of Food Science, 36:846–849. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1971.tb15541.x
- YANG X, ZHANG Y, KONG Y, ZHAO J, SUN Y, HUANG M. (2019). Comparative analysis of taste compounds in *shiitake* mushrooms processed by hot-air drying and freeze drying. International Journal of Food Properties, 22(1):1100-11. DOI: 10.1080/10942912.2019.1628777.
- YANG, J.; WANG, G.; NG, T. B.; LIN, J.; YE, X. (2016). Laccase Production and Differential Transcription of Laccase Genes in *Cerrena* sp. in Response to Metal Ions, Aromatic Compounds, and Nutrients. Frontiers in Microbiology, 6. DOI: [10.3389/fmicb.2015.01558](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01558)
- YANG, W.J., DU, H.J., MARIGA, A.M., PEI, F., MA, N. & HU, Q.H. (2017). Hot air-drying process promotes lignification of *L. edodes*. LWT-Food Science and Technology, 84:726–732. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.06.039.
- YOO, S.; LEE, H.; MARKKANDAN, K.; MOON, S.; AHN, J.; JI, S.; Markkandan, K.; Moon, S.; Ahn, Y. J.; Ji, S.; Ko, J.; Kim, S.; Ryu, H.; Hong, C. P. (2019). Comparative transcriptome analysis identified candidate genes involved in mycelium browning in *L. edodes*. BMC Genomics, 20(121). DOI: 10.1186/s12864-019-5509-4
- ZANETTI, A. L. & RANAL, M. A. (1997). Suplementação da cana-de-açúcar com guandú no cultivo de *Pleurotus* sp. "Florida". Pesquisa Agropecuária Brasileira, 32(9):959-964.
- ZHANG Y, LI S, WANG X, ZHANG L, CHEUNG P. (2011). Advances in lentinan: isolation, structure, chain conformation and bioactivities. Food Hydrocolloids, 25:196–206. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2010.02.001.
- ZHANG Z, SONG H, PENG Z, LUO Q, MING J, ZHAO G. (2012). Characterization of stipe and cap powders of mushroom (*L. edodes*) prepared by different grinding methods. Journal of Food Engineering, 109(3):406-413. DOI : 10.1016/j.jfoodeng.2011.11.007.

- ZHANG, Y.; GENG, W.; SHEN, Y.; WANG, Y.; DAI, Y. (2014). Edible Mushroom Cultivation for Food Security and Rural Development in China: Bio-Innovation, Technological Dissemination and Marketing. *Sustainability*, 6:2961-2973. DOI:10.3390/su6052961.
- ZIED, D. C.; MACIEL, W. P.; MARQUES, S. C.; SANTOS, D. M. S.; RINKER, D. L.; DIAS, E. S. (2016). Selection of strains for *shiitake* production in axenic substrate. *World. J. Microbiol. Biotechnol*, 32:168. DOI: 10.1007/s11274-016-2115-3.
- ZIED, D. C.; PARDO, J. E.; TOMAZ, R. S.; MIASAKI, C. T.; PARDO-GIMÉNEZ, A. (2017) Mycochemical characterization of *Agaricus subrufescens* considering their morphological and physiological stage of maturity on the traceability process. *BioMed Research International*, 2713742. DOI: 10.1155/2017/2713742.
- ZIED, D. C.; PARDO-GIMÉNEZ, A.; PARDO, J. E.; DIAS, E. S.; CARVALHO, M. A.; MINHONI, M. T. A. (2013). Effect of the cultivation practices on the  $\beta$ -glucan content of *Agaricus subrufescens* basidiocarps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* DOI: 10.1021/jf403584g.