

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

**Bruno de Souza Rocha**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE INDUÇÃO DE  
PRIMÓRDIOS EM DIFERENTES MASSAS DE SUBSTRATO**

Dracena

2026

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

**Bruno de Souza Rocha**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE INDUÇÃO DE**  
**PRIMÓRDIOS EM DIFERENTES MASSAS DE SUBSTRATO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas  
– Unesp, Câmpus de Dracena como parte das  
exigências para conclusão do curso.

Orientador: Prof. Dr. Diego Cunha Zied  
Coorientador: Prof. Dr. Wagner Gonçalves Viera Júnior

Dracena

2026



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Câmpus de Dracena



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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

Título: “Avaliação de métodos de indução de primórdios em diferentes massas de substrato.”

Modalidade: Trabalho de **Atividades de pesquisa**

Autor: Bruno de Souza Rocha

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

Co-orientador(es): Prof. Dr. Wagner Gonçalves Vieira Junior

Número de Créditos: 12

Data da aprovação e correção de acordo com as sugestões da Banca: 24/06/2026

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** DIEGO CUNHA ZIED  
Data: 30/06/2026 08:42:00-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ANA CAROLINA FIRMINO  
Data: 30/06/2026 12:35:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** PAMELA GOMES NAKADA FREITAS  
Data: 30/06/2026 16:26:32-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Diego Cunha  
Zied

Profa. Dra. Ana Carolina  
Firmino

Profa. Dra. Pâmela  
Gomes Nakada Freitas

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Bruno de Souza Rocha, nascido em 25 de junho de 2002, na cidade de Presidente Prudente/SP. Filho de Matheus Cristóvão da Rocha e Maria Angélica Oliveira de Souza. Estudou em escolas públicas durante toda a sua vida, incluindo o ensino médio, realizado na Etec Prof. Dr. Antônio Eufrásio de Toledo - Colégio Agrícola de Presidente Prudente. Ingressou na FCAT/UNESP de Dracena/SP em 2022 no curso de Engenharia Agrônômica. Membro ativo do CECOG (Centro de Estudos em Cogumelos) desde 2023, onde passou a ser orientado pelo Prof. Dr. Diego Cunha Zied. Participou de visitas técnicas, dias de campo, eventos presenciais e online, entre eles o CIC, Escola de verão da UNESP/FCAV Câmpus de Jaboticabal, e o ENPC (Encontro Nacional dos Produtores de Cogumelos) o qual fez parte da comissão organizadora. Ao longo da graduação, teve três projetos PIBIC aprovados, todos na linha de pesquisa de produção de cogumelos, entre eles, este que está sendo apresentado.

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai Matheus Cristóvão da Rocha e a minha mãe Maria Angélica Oliveira de Souza, que me educaram e me possibilitaram mais essa conquista, exemplos de vida fundamentais para a minha vida pessoal e profissional. Aos meus familiares e amigos que sempre estiveram comigo nessa caminhada, oferecendo apoio, incentivo e confiança nos momentos mais desafiadores.

## **AGRADECIMENTOS**

Expresso, primeiramente, minha profunda gratidão a Deus, por conceder-me a força necessária e por guiar os meus passos ao longo de toda a minha trajetória. Estendo meus sinceros agradecimentos aos meus pais e a toda a minha família, cujo apoio incondicional e dedicação foram alicerces fundamentais. Em especial, agradeço aos meus avós e ao meu tio Tiago e minha tia Fran, que foram fontes constantes de incentivo e motivação durante esta jornada.

Dedico, ainda, um agradecimento muito especial à minha namorada, Ana Clara Santana Santos, e a toda a sua família, pelo apoio incondicional desde o início da minha graduação. Nos momentos em que mais precisei, vocês prontamente me estenderam a mão e tornaram essa conquista possível. Serei eternamente grato por cada esforço empreendido para que a realização deste sonho se concretizasse.

Aos amigos e colegas do Centro de Estudos em Cogumelos (CECOG), manifesto o meu genuíno reconhecimento. A presença constante de vocês na condução dos meus experimentos, aliada ao suporte e às valiosas orientações, foi imprescindível para a execução primorosa de todas as atividades.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Diego Cunha Zied, registro a minha gratidão pelos sábios conselhos, pelo companheirismo, bem como pela confiança e paciência a mim dedicadas. Reservo também um agradecimento especial aos meus estimados amigos Wagner Gonçalves Viera Junior, Asser Botelho Santana, Adriano Taffarel Camargo de Paula e Lucas da Silva Alves. O auxílio, o encorajamento e as orientações prestadas por vocês durante esta importante etapa foram imprescindíveis.

Por fim, dirijo meus sentimentos aos meus irmãos de república. Sou imensamente grato pelo carinho e pelo respeito com que sempre me trataram. Guardarei na memória os momentos incríveis que vivenciamos, unidos como uma verdadeira família. Encerro este ciclo não apenas com o título de Engenheiro Agrônomo, mas com a certeza de que me tornei um ser humano muito melhor graças às vivências que compartilhamos na república. Minha mais profunda e sincera gratidão a todos.

E não menos importante, gostaria também de agradecer a CNPq por financiar essa pesquisa.

“Tu não temerás os terrores noturnos, nem a flecha que voa à luz do dia, nem a peste que se propaga nas trevas, nem o mal que grassa ao meio-dia. Caiam mil homens à tua esquerda e dez mil à tua direita, tu não serás atingido.” (*Salmos* 91:5-7).



## RESUMO

A produção de cogumelos é uma prática sustentável, mas que necessita de melhorias, como no cultivo de *Lentinula edodes* (Berk) Pegler, que apresenta alta demanda de água e mão de obra. Nesse contexto, este estudo propôs substituir o método tradicional de indução de primórdios por imersão por um método de injeção de água. Foram comparados dois métodos de indução de primórdios (imersão e injeção) e dois formatos de blocos de cultivo: cubo retangular (2 kg) e cilíndrico (3,5 kg). O substrato, composto por serragem de eucalipto (72%), farelo de trigo (12,5%), farelo de arroz (12,5%),  $\text{CaCO}_3$  (1%) e  $\text{CaSO}_4$  (2%), foi inoculado com a linhagem LED 19/11 e incubado por 80 dias a  $26 \pm 5$  °C e  $85 \pm 15\%$  de umidade. Após esse período, os blocos foram lavados e transferidos para o ambiente de produção. A frutificação foi induzida por imersão ou por injeção de água, e a produção foi avaliada ao longo de quatro fluxos de colheita. Os blocos de 2 kg apresentaram maior rendimento com imersão (16,62%), enquanto os blocos de 3,5 kg responderam melhor à injeção (13,01%), demonstrando produção mais homogênea. O aumento da quantidade de substrato contribuiu para maior estabilidade da colheita ao longo dos ciclos de produção. As injeções de água mostraram-se uma alternativa viável, reduzindo o manuseio e facilitando a produção em larga escala. O uso dessa técnica demonstra grande importância na redução do uso de água e também na necessidade de mão de obra no cultivo.

**Palavras-chave:** Produção de cogumelos; shiitake; métodos de cultivo; otimização hídrica.

## ABSTRACT

Mushroom production is a sustainable practice but requires improvements, such as in *Lentinula edodes* (Berk) Pegler cultivation, which has high water and labor demands. In this context, this study proposed replacing the traditional primordia induction method by submersion with a water injection method. Two primordia induction methods (submersion and injection) and two cultivation block formats were compared: rectangular cube (2 kg) and cylindrical (3.5 kg). The substrate, composed of eucalyptus sawdust (72%), wheat bran (12.5%), rice bran (12.5%), CaCO<sub>3</sub> (1%), and CaSO<sub>4</sub> (2%), was inoculated with strain LED 19/11 and incubated for 80 days at 26 ± 5 °C and 85 ± 15% humidity. After this period, the blocks were washed and transferred to the production environment. Fruiting was induced either by submersion or water injection, and production was evaluated over four harvest flushes. The 2 kg blocks had higher yields with submersion (16.62%), while the 3.5 kg blocks responded better to injection (13.01%), showing more homogeneous production. Increasing the substrate quantity contributes to greater harvest stability across production cycles. Water injections proved to be a viable alternative, reducing handling and facilitating large-scale production. The use of this technique demonstrates great importance in reducing water use and also the need for labor in cultivation.

**Keywords:** mushroom production; shiitake; cultivation methods; water optimization

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### CAPÍTULO II

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> Equipment for water injections. The device has a total length of 29.2 cm and comprises a tapered perforation tube measuring 19 cm up to the drill limiter. Its operation is supported by the integration of flexible hoses, hydraulic connectors, sealing elements, and a pressurized water source..... | 33 |
| <b>Figure 2.</b> Total production (g) of <i>Lentinula edodes</i> across different production flushes, with variations in block weight and primordia induction methods.....                                                                                                                                               | 33 |
| <b>Figure 3.</b> Generalized Linear Mixed Model (GLMM) Analysis for the behavior of fresh mushroom harvest data of <i>Lentinula edodes</i> produced in blocks with different substrate quantities and different water stress methods for fruiting induction.....                                                         | 38 |
| <b>Table 1.</b> Chemical analysis of the substrate for <i>Lentinula edodes</i> cultivation.....                                                                                                                                                                                                                          | 30 |
| <b>Table 2.</b> Yield of <i>Lentinula edodes</i> according to different water induction methods for fruiting and varying block weights.....                                                                                                                                                                              | 35 |
| <b>Table 3.</b> Weight gain of <i>Lentinula edodes</i> blocks with different substrate amounts after being subjected to two different fruiting induction methods.....                                                                                                                                                    | 36 |

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LED 19/11 - *Lentinula edodes* 19/11

## SUMÁRIO

|                                                      |    |
|------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO I .....                                     | 14 |
| 1. REVISÃO DE LITERATURA.....                        | 15 |
| 1.1 O reino Fungi e seu papel ecológico .....        | 15 |
| 1.1.1 Ciclo reprodutivo .....                        | 16 |
| 1.2 Shiitake – <i>Lentinula edodes</i> .....         | 17 |
| 1.2.1 Aproveitamento de resíduos .....               | 18 |
| 1.2.2 Sistema de cultivo axênico .....               | 19 |
| 1.3 Indução de primórdios.....                       | 20 |
| 2. OBJETIVOS .....                                   | 23 |
| 2.1 Objetivo Geral .....                             | 23 |
| 2.2 Objetivos específicos.....                       | 23 |
| REFERÊNCIAS.....                                     | 23 |
| CAPÍTULO II .....                                    | 27 |
| 1. Introduction.....                                 | 28 |
| 2. Materials and Methods.....                        | 29 |
| 2.1 Substrate Production .....                       | 29 |
| 2.2. Spawn Production .....                          | 30 |
| 2.3. Production and Harvesting .....                 | 31 |
| 2.4. Fruiting Induction.....                         | 31 |
| 2.5. Analyzed Variables and Experimental Design..... | 34 |
| 3. Results.....                                      | 34 |
| 4. Discussion.....                                   | 38 |
| 5. Conclusions.....                                  | 42 |
| References.....                                      | 43 |

## **CAPÍTULO I**

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 O reino Fungi e seu papel ecológico

O reino Fungi compreende um grupo de organismos de grande relevância ecológica, econômica e biotecnológica, desempenhando funções fundamentais na manutenção dos ecossistemas e apresentando ampla aplicabilidade em diversos setores produtivos. Espécies fúngicas são utilizadas em processos industriais relacionados à produção de alimentos, medicamentos, enzimas, biocombustíveis e compostos de interesse comercial, além de possuírem importância para as indústrias farmacêutica, têxtil e alimentícia, entre outras (Lima et al., 2025).

Do ponto de vista biológico, os fungos são organismos eucariontes, heterotróficos por absorção, de substâncias orgânicas presentes no meio. Esses organismos são caracterizados pela ausência de clorofila, pela presença de parede celular constituída predominantemente por quitina e pelo acúmulo de glicogênio como principal substância de reserva energética. Sua reprodução pode ocorrer por mecanismos sexuais e assexuais, geralmente envolvendo a produção e disseminação de esporos, estruturas responsáveis pela perpetuação e dispersão das espécies (Alexopoulos; Mims; Blackwell, 1996; Webster; Weber, 2007).

A diversidade do reino Fungi é considerada extremamente elevada. Estimativas recentes indicam a existência de aproximadamente 2,2 a 3,8 milhões de espécies em escala global, embora apenas cerca de 120 mil tenham sido devidamente descritas e reconhecidas pela ciência até o presente momento (Hawksworth e Lücking, 2017). Tal discrepância evidencia o amplo potencial de descoberta de novas espécies e ressalta a necessidade de estudos voltados à taxonomia, ecologia e conservação da diversidade fúngica (Rani et al., 2023).

Entre os principais grupos taxonômicos pertencentes ao reino Fungi, destaca-se a classe Agaricomycetes, inserida no filo Basidiomycota. De acordo com Kirk et al. (2008), aproximadamente um quinto das espécies fúngicas conhecidas encontra-se agrupado nesse clado. Os representantes de Agaricomycetes são

predominantemente fungos filamentosos, caracterizados pela formação de estruturas reprodutivas macroscópicas especializadas, denominadas corpos de frutificação ou basidiomas. Essas estruturas desempenham papel fundamental no ciclo de vida desses organismos, uma vez que são responsáveis pela produção e liberação dos esporos, permitindo a reprodução e a dispersão das espécies (Rani et al., 2023).

### **1.1.1 Ciclo reprodutivo**

A maioria dos fungos que apresentam estruturas reprodutivas macroscópicas, visíveis sem o auxílio de instrumentos ópticos, pertence aos filos Ascomycota e Basidiomycota. Dentre esses grupos, os basidiomicetos se destacam por abrigarem a maior parte das espécies de cogumelos comestíveis conhecidas e exploradas comercialmente (Kirk et al., 2008; Boontawon et al., 2021).

Nos fungos pertencentes ao filo Basidiomycota, o micélio vegetativo coloniza o substrato e, quando submetido a condições ambientais favoráveis, dá origem às estruturas reprodutivas conhecidas como basidiomas. Essas estruturas são responsáveis pela formação e liberação dos esporos, desempenhando papel fundamental na perpetuação e disseminação das espécies. A emissão dos basidiomas depende de diversos fatores, dentre os quais se destacam a composição e a disponibilidade de nutrientes do substrato, bem como condições adequadas de temperatura, umidade e aeração, tanto em ambientes naturais quanto em sistemas de cultivo controlados (Chang; Miles, 2004; Webster; Weber, 2007).

No cultivo de cogumelos comestíveis em condições laboratoriais, a propagação vegetativa por fragmentação do micélio constitui uma prática amplamente empregada, pois possibilita a manutenção das características genéticas e produtivas da cepa selecionada. Quando os fragmentos miceliais são inoculados em substratos apropriados e submetidos a condições adequadas de temperatura e umidade, ocorre a colonização do material e, posteriormente, a formação dos corpos de frutificação, popularmente conhecidos como cogumelos (Noa; Ghinda, 2022).



## 1.2 Shiitake – *Lentinula edodes*

O *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, popularmente conhecido como shiitake, é uma das espécies de cogumelos comestíveis de maior importância econômica e uma das mais produzidas em escala mundial. Sua origem está associada a países do leste asiático, especialmente China, Japão e Coreia do Sul, regiões nas quais seu cultivo e consumo possuem longa tradição (Chen et al., 2016; Silva et al., 2005). Morfologicamente, o shiitake caracteriza-se por apresentar basidiomas de coloração marrom a marrom-avermelhada, com píleo espesso e carnoso, inicialmente convexo e posteriormente mais achatado, sustentado por um estipe de consistência fibrosa (Sokovic et al., 2018).

A formação e o desenvolvimento dos corpos de frutificação de *L. edodes* são fortemente influenciados pelas condições ambientais. A incidência luminosa exerce papel importante na diferenciação morfológica dos basidiomas, afetando a pigmentação do píleo, o crescimento do estipe e o fototropismo positivo observado nessa espécie. Por outro lado, concentrações elevadas de dióxido de carbono favorecem o alongamento do estipe, ao mesmo tempo em que podem inibir a expansão do píleo e reduzir a produção de esporos. A manutenção de elevada umidade relativa do ar, em torno de 90 a 95%, favorece a maturação dos basidiomas, enquanto temperaturas mais amenas, inferiores às ideais para o crescimento micelial, são mais adequadas para a indução da frutificação. Adicionalmente, valores de pH próximos a 4,0 e a disponibilidade de compostos de reserva, como glicogênio, trealose e manitol, previamente acumulados pelo micélio, são fatores essenciais para o adequado desenvolvimento dos corpos de frutificação (Herman; Bleichrodt, 2022).

Durante o processo de desenvolvimento, os basidiomas passam por diferentes estágios morfológicos. Na fase inicial, correspondente aos primórdios, as margens do píleo permanecem curvadas em direção ao interior, recobrando o véu parcial. A formação dessas estruturas ocorre a partir da diferenciação do micélio dicariótico quando submetido a condições ambientais favoráveis. À medida que o cogumelo atinge a maturidade, ocorre o rompimento do véu, expondo as lamelas localizadas na face inferior do píleo, estruturas nas quais são produzidos os basidiósporos responsáveis pela reprodução da espécie (Eira; Bueno, 2005).

Além do interesse comercial decorrente de suas características sensoriais, o shiitake apresenta elevado valor nutricional, sendo considerado uma importante fonte de proteínas, aminoácidos essenciais, fibras alimentares e vitaminas. Adicionalmente, a espécie possui diversos compostos bioativos, incluindo esteróis, lipídios e outras moléculas com potencial medicinal, às quais são atribuídas propriedades terapêuticas de interesse para a saúde humana (Sawan et al., 2021; Yu et al., 2022).

### 1.2.1 Aproveitamento de resíduos

A produção de cogumelos comestíveis está associada ao aproveitamento de resíduos oriundos das atividades agrícolas e agroindustriais, promovendo a conversão desses materiais lignocelulósicos em alimentos de elevado valor nutricional. Dessa forma, a fungicultura representa uma alternativa ambientalmente sustentável, uma vez que os fungos possuem elevada capacidade metabólica para degradar e transformar compostos orgânicos complexos por meio de processos microbiológicos. Entretanto, para que essa atividade apresente viabilidade técnica e econômica, é necessário o controle adequado de fatores químicos, físicos, ambientais e tecnológicos, os quais influenciam diretamente a eficiência dos processos produtivos (Zied et al., 2020).

Nesse contexto, a produção de cogumelos encontra-se alinhada aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU), iniciativa criada com o propósito de enfrentar desafios globais relacionados à erradicação da pobreza, redução da fome, promoção da saúde, garantia do acesso à educação e preservação dos recursos ambientais (ONU, 2015).

Considerando tais aspectos, o cultivo de cogumelos comestíveis pode ser compreendido como uma estratégia capaz de contribuir para o desenvolvimento sustentável e para a promoção da segurança alimentar. A possibilidade de utilização de substratos renováveis e de baixo custo, aliada ao elevado valor nutricional desses organismos, confere importância crescente à atividade em âmbito mundial. Espécies como o shiitake (*Lentinula edodes*), o champignon-de-paris (*Agaricus bisporus*) e o shimeji (*Pleurotus ostreatus*) destacam-se por apresentarem potencial para

complementar a dieta humana e contribuir para a oferta de alimentos nutritivos e produzidos de forma mais sustentável (Chang; Miles, 2004).

### 1.2.2 Sistema de cultivo axênico

O cultivo de shiitake (*Lentinula edodes*) em blocos axênicos constitui atualmente o sistema de produção mais difundido em escala mundial, uma vez que proporciona maiores rendimentos e reduz o período necessário para obtenção dos corpos de frutificação em comparação ao cultivo tradicional realizado em toras de madeira. Além disso, os blocos podem ser elaborados a partir de resíduos provenientes de diferentes atividades agroindustriais, favorecendo o aproveitamento desses materiais (Cuquel, 2023).

Em razão da utilização de subprodutos agroindustriais, esse sistema é considerado uma alternativa de baixo impacto ambiental. Adicionalmente, o cultivo em blocos axênicos apresenta elevada eficiência biológica, maior produtividade e menor duração do ciclo produtivo quando comparado ao método convencional em toras (Chen, 2005; Kobayashi et al., 2020).

A técnica baseia-se na inoculação do micélio de *L. edodes* em substratos formulados principalmente com serragem de madeira, correspondendo a aproximadamente 80% da composição, acrescida de cerca de 20% de suplementos ricos em amido, como farelo de trigo e farelo de arroz (Nabhan et al., 2025). Esses componentes favorecem o adequado desenvolvimento do micélio e possibilitam elevadas produções mesmo em áreas reduzidas (Pascholati; Marassatto; Stangarlin; Brand, 2014). No preparo do substrato, também é realizada a correção da acidez por meio da adição de carbonato de cálcio, visando proporcionar condições mais adequadas ao crescimento fúngico (Zied et al., 2016).

Após a mistura homogênea dos componentes, o substrato deve ser umedecido até atingir aproximadamente 70% de umidade. Em seguida, procede-se à esterilização em autoclave, sob temperatura de 121 °C durante quatro horas (Sousa et al., 2019). Concluído esse processo, o material deve permanecer em resfriamento por cerca de 24 horas. Posteriormente, a inoculação é realizada em condições

assépticas, preferencialmente em câmara de fluxo laminar, utilizando-se uma quantidade de inóculo correspondente a 2% do peso total do bloco (Calgaroto, 2019).

Para o acondicionamento do substrato, empregam-se sacos de polipropileno de alta densidade providos de filtro para troca gasosa (Ávila et al., 2023). Anteriormente à produção dos cogumelos, ocorrem as fases de corrida micelial e de formação da capa micelial. A corrida do micélio é conduzida em temperaturas entre 18 e 24 °C, com duração variando de 28 a 35 dias. Na etapa seguinte, observa-se o aparecimento de uma coloração castanho-amarronzada nos blocos, juntamente com pequenas protuberâncias conhecidas popularmente como “pipocas”. Durante essa fase, a temperatura ideal situa-se entre 20 e 22 °C, sendo que sua duração pode variar entre 50 e 70 dias (Vieira Júnior, 2025).

Com o objetivo de melhorar a aeração interna do substrato, recomenda-se a realização do desprendimento dos blocos, prática que consiste em separar cuidadosamente o substrato das paredes dos sacos de cultivo, sem que estes sejam abertos (Ávila et al., 2023). A frutificação ocorre, em média, após aproximadamente 100 dias da inoculação. Nessa etapa, os blocos são transferidos para a câmara de produção, onde são mantidos sob temperatura em torno de 19 °C e umidade relativa próxima de  $90 \pm 2\%$ , condições favoráveis ao desenvolvimento dos basidiomas (Shen et al., 2008).

### **1.3 Indução de primórdios**

A formação dos corpos de frutificação em basidiomicetos é influenciada por diferentes fatores ambientais, que podem atuar de forma isolada ou em associação. Esses fatores podem ser classificados em físicos e fisiológicos. Entre os fatores físicos, destacam-se a luminosidade, a temperatura e os danos mecânicos, enquanto os fatores fisiológicos estão relacionados à disponibilidade de nutrientes, à composição gasosa do ambiente e à ação de hormônios. Apesar dos avanços no entendimento da biologia dos fungos, os mecanismos pelos quais cada um desses fatores atua na indução da frutificação em basidiomicetos ainda não são completamente compreendidos (Sakamoto, 2018).

Com a expansão do cultivo de *Lentinula edodes*, diversas empresas especializadas na preparação de substratos comerciais e na produção de blocos contendo micélio fisiologicamente maduro passaram a fornecer esses materiais para diferentes regiões e países, com o objetivo de viabilizar a formação dos corpos de frutificação. Para prolongar a vida útil durante o transporte, esses blocos de substrato são frequentemente armazenados sob baixas temperaturas ou submetidos ao congelamento. Nessas condições, a exposição ao frio associada às vibrações decorrentes do transporte constitui um importante estímulo ambiental para a indução da frutificação em *L. edodes* (Song et al., 2025).

Os resultados obtidos por Song et al. (2021) contribuem para a compreensão da influência dos fatores fisiológicos e ambientais sobre a indução da frutificação em *Lentinula edodes*. De acordo com os autores, quando o período de incubação é suficientemente prolongado, a formação dos corpos de frutificação pode ocorrer mesmo na ausência de estímulos ambientais específicos. No entanto, a aplicação desses estímulos favorece a antecipação da frutificação e promove melhorias nas características agronômicas dos basidiomas, refletindo em maior número e tamanho dos corpos de frutificação (Song et al., 2021).

A exposição a baixas temperaturas constitui um importante estímulo ambiental para os fungos, uma vez que condições térmicas adversas podem comprometer a sobrevivência do micélio vegetativo. Em resposta a esse estresse, a reprodução sexuada é desencadeada, favorecendo a formação dos corpos de frutificação e a disseminação da espécie (Sakamoto, 2018).

A redução da temperatura é amplamente empregada como um estímulo para a indução da formação dos corpos de frutificação em diversas espécies de cogumelos. Esse mecanismo tem sido descrito para espécies de importância comercial, como *Lentinula edodes* (Nakazawa et al., 2008), *Agaricus bisporus* (Morin et al., 2012) e *Flammulina velutipes* (Sakamoto et al., 2002), evidenciando a relevância das variações térmicas no desencadeamento do processo de frutificação em basidiomicetos (Stamets, 2011).

A água desempenha papel fundamental no desenvolvimento dos basidiomas, contribuindo para a manutenção do turgor celular e favorecendo processos como o alongamento do estipe e a expansão do píleo. Além disso, mais de 90% da composição dos corpos de frutificação é constituída por água (Herman; Bleichrodt, 2022). Com base nesse princípio, os produtores realizam o desbaste dos primórdios

e ajustam fatores ambientais passíveis de controle, como luminosidade, disponibilidade hídrica, temperatura e concentração de dióxido de carbono, com o objetivo de otimizar a utilização dos carboidratos acumulados pelo micélio e obter basidiomas com formato adequado e elevada produtividade (Song et al., 2025). Em *Lentinula edodes*, a colheita é geralmente realizada quando as margens do píleo ainda se encontram levemente curvadas para o interior ou quando este apresenta aproximadamente 60 a 70% de expansão, estágio em que os cogumelos podem ser comercializados tanto na forma fresca quanto desidratada (Chen, 2001).

Os mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento do corpo de frutificação (basidioma) de *Lentinula edodes* têm sido muito pesquisados (Song et al., 2025). No entanto, como é difícil realizar manipulações genéticas diretas (*in vivo*) nessa espécie, testar hipóteses na prática ainda é um desafio. Por isso, muitos resultados permanecem no campo das previsões, dependendo bastante da comparação de dados por meio de técnicas ômicas (Nagy et al., 2023). Além disso, o uso de amostras diferentes e os variados objetivos de cada pesquisa fazem com que os resultados encontrados na literatura variem bastante, um comportamento que é comum entre os fungos da classe Agaricomycetes (Song et al., 2025).

Para organizar essas informações, Nagy et al. (2023) apresentaram a descrição mais completa até agora sobre os processos moleculares envolvidos no desenvolvimento do basidioma em Agaricomycetes. Os autores construíram esse modelo reunindo dados de estudos anteriores e observando padrões no funcionamento dos genes e suas respectivas funções. Em resumo, o desenvolvimento do corpo de frutificação nesse grupo de fungos pode ser dividido em três fases principais: os eventos iniciais (que envolvem a formação do primórdio e a rápida multiplicação das células), a fase de expansão celular e, por último, os eventos finais, que incluem os processos de maturação sexual e a formação de esporos (Nagy et al., 2023).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto da quantidade de substrato (massa dos blocos) e de diferentes métodos de indução de frutificação (submersão e injeção de água) no desempenho agrônomo e na eficiência operacional do cultivo do cogumelo *Lentinula edodes*.

### 2.2 Objetivos específicos

Analisar a formação de primórdios, a produtividade e a estabilidade produtiva de *L. edodes* cultivado em blocos com diferentes capacidades (2 kg e 3,5 kg) submetidos a diferentes técnicas de estresse hídrico;

Determinar qual método de choque hídrico (submersão clássica ou injeção de água) apresenta melhor resposta fisiológica de acordo com o volume/formato do bloco de substrato;

## REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.

ÁVILA, I. A. F.; ALVES, L. S.; ZIED, D. C. Bioconversion of rice straw by *Lentinula edodes* under different spawn formulations. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 3137-3146, 2023.

BOONTAWON, T. et al. Edible mushrooms: cultivation, bioactive compounds and applications. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 1-31, 2021.

CALGAROTO, B. **Substratos para produção de cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake)**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2019.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms**: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2004.

CHEN, A. W. Cultivation of *Lentinula edodes* on synthetic logs. **Mushroom Grower's Newsletter**, v. 10, p. 3-9, 2001.

CHEN, A. W. Shiitake bag cultivation. In: MUSHWORLD (ed.). **Mushroom Growers Handbook 2: shiitake cultivation**. Seoul: MushWorld, 2005. cap. 4, p. 73-87.

CHEN, L. et al. Genome sequence of the edible cultivated mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) reveals insights into lignocellulose degradation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, e0160336, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160336>. Acesso em: 16 jun. 2026.

CUQUEL, F. L. et al. Shiitake cultivation in axenic blocks containing brewery residue. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 18, n. 1, e2970, 2023.

EIRA, A. F. da; BUENO, F. S. Cultivo do shiitake em substratos. **Centro de Produções Técnicas**, 2005. Disponível em: <https://www.cpt.com.br/artigos/cultivo-do-shiitake-em-substratos>. Acesso em: 15 jun. 2026.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>. Acesso em: 16 jun. 2026.

HERMAN, K. C.; BLEICHRODT, R. Let it flow: mechanisms driving water transport during vegetative growth and fruiting. **Fungal Biology Reviews**, v. 41, p. 10-23, 2022.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. **Dictionary of the Fungi**. 10. ed. Wallingford: CAB International, 2008.

KOBAYASHI, T. et al. Yield of cultivated shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) and fungal communities in logs. **Journal of Forestry Research**, v. 25, p. 269-275, 2020.

LIMA, J. L. R. et al. Desmistificando o reino Fungi por meio de abordagens lúdicas: um relato de experiência. **Revista Brasileira de Pós-Graduação**, v. 20, n. 41, p. 1-17, 2025.

MORIN, E. et al. Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 43, p. 17501-17506, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1206847109>. Acesso em: 16 jun. 2026.

NABHAN, S. et al. **Substrates used for the cultivation of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*): a review**. 2025.

NAGY, L. G. et al. Lessons on fruiting body morphogenesis from genomes and transcriptomes of Agaricomycetes. **Studies in Mycology**, v. 104, n. 1, p. 1-85, 2023.

NAKAZAWA, T.; ANDO, Y.; HATANO, S.; TAMAI, Y. Stimulative effects of light and a temperature downshift on transcriptional expressions of developmentally regulated genes in the initial stages of fruiting-body formation of the basidiomycetous mushroom *Lentinula edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 289, n. 1, p. 67-71, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01367.x>. Acesso em: 16 jun. 2026.



NOA, C.; GHINDA, S. **Cultivo de Shiitake *Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler en residuos agroindustriales de arroz del distrito de Kosñipata, provincia de Paucartambo – región Cusco**. 2022. Tese – Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias, Escuela Profesional de Biología, Cusco, Peru, 2022.

PASCHOLATI, S. F. et al. **Produção de shiitake em toras de eucalipto**. Piracicaba: ESALQ/Casa do Produtor Rural, 2014.

PONTES, M. V. A. et al. The physiology of *Agaricus bisporus* in semi-commercial compost cultivation appears highly conserved among unrelated isolates. **Fungal Genetics and Biology**, v. 112, p. 12-20, 2018.

RANI, M. et al. Edible mushrooms: occurrence, management and health benefits. **Food Materials Research**, v. 3, p. 21, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.48130/FMR-2023-0021>. Acesso em: 16 jun. 2026.

SAKAMOTO, Y. Influências de fatores ambientais na indução, desenvolvimento e maturação de corpos de frutificação em fungos formadores de cogumelos. **Fungal Biology Reviews**, v. 32, n. 4, p. 236-248, 2018.

SAKAMOTO, Y. et al. Protein expressions during fruit body induction of *Flammulina velutipes* under reduced temperature. **Mycological Research**, v. 106, n. 2, p. 222-227, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0953756201005435>. Acesso em: 16 jun. 2026.

SHEN, Q. et al. Effects of substrate moisture content, log weight and filter porosity on shiitake (*Lentinula edodes*) yield. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8212-8216, 2008.

SILVA, E. M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A. M. F. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 283-288, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01669.x>. Acesso em: 16 jun. 2026.

SOKOVIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; ĆIRIĆ, A.; PETROVIĆ, J.; STOJKOVIĆ, D. Mushrooms as sources of therapeutic foods. In: HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M. (ed.). **Therapeutic Foods**. Cambridge: Academic Press, 2018. cap. 5, p. 141-178.

SONG, X. et al. Métodos de cultivo e biologia de *Lentinula edodes*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 109, art. 63, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13387-w>. Acesso em: 16 jun. 2026.

SOUSA, M. A. C. de et al. Enzyme activity and biochemical changes during production of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 774-780, 2019.

STAMETS, P. **Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms**. Berkeley: Ten Speed Press, 2011.

VIEIRA JÚNIOR, W. G. **Avaliação da eficiência e viabilidade do substrato exaurido de cogumelo em ciclos subsequentes de *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes***. 2025.

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to Fungi**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

YU, H. et al. Corncob as a substrate for the cultivation of *Lentinula edodes*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 13, p. 929-939, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01575-y>. Acesso em: 16 jun. 2026.

ZIED, D. C. et al. Selection of strains for shiitake production in axenic substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 168, 2016.

ZIED, D. C.; SÁNCHEZ, J. E.; NOBLE, R.; PARDO-GIMÉNEZ, A. Use of spent mushroom substrate in new mushroom crops to promote the transition towards a circular economy. **Agronomy**, v. 10, n. 9, p. 1239, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy10091239>. Acesso em: 16 jun. 2026.

## **CAPÍTULO II**

## Impact of Substrate Amount and Fruiting Induction Methods in *Lentinula edodes* Cultivation

Bruno de Souza Rocha <sup>1</sup>, Wagner Gonçalves Vieira Junior <sup>2,3</sup>, Adriano Taffarel Camargo de Paula <sup>2</sup>, Asser Botelho Santana <sup>2</sup>, Marcos Antônio da Silva Freitas <sup>1</sup>, Milton Mineo Hirai <sup>1</sup>, Lucas da Silva Alves <sup>2</sup> and Diego Cunha Zied <sup>1,\*</sup>

### 1. Introduction

*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler is a mushroom of Asian origin, with its center of origin in countries such as China, Japan, and South Korea [1]. Commonly known as black mushroom, oak mushroom, and in Brazil and worldwide as shiitake, it has attracted the attention of researchers due to its nutritional, medicinal, and therapeutic properties, as well as its excellent palatability [2,3].

Currently, shiitake is the most widely produced and consumed mushroom in the world, accounting for 22% of global production [4]. In Brazil, shiitake ranks as the third most cultivated mushroom, following white shimeji (*Pleurotus ostreatus* var. Florida) and button mushroom (*Agaricus bisporus*), with an annual production of approximately 2,178,000 kg of fresh mushrooms, generating an economic turnover of approximately 90 million reais [5].

However, this scenario is expected to change, as the main bottleneck in shiitake production is linked to the cultivation method, which requires complex physical infrastructure. These structures are influenced by the size and shape of the substrate blocks, as well as by the technique used to apply water for primordia induction and harvesting. Considering these factors, mushroom growers must carefully design their cultivation systems, taking into account the use of production chambers or greenhouses (with fruiting temperatures between 18 and 20 °C), the number of shelves (i.e., substrate density per square meter), and the proximity to immersion tanks, which are essential for inducing water stress.

Currently, the cultivation block is rectangular cube (20 cm in length × 15 cm in height × 10 cm in depth) and weighs approximately 2 kg [6]. This block design allows for easy handling during both harvesting and the application of water stress (necessary

for primordia induction), considering that a medium-sized mushroom grower typically cultivates around 10,000 blocks per month.

However, in recent decades, shiitake growers have faced significant challenges regarding the labor required for cultivation, as part of operations are performed manually [7]. Therefore, the search for mechanized processes and practices that reduce labor demand is essential, given that the cultivation cycle of *L. edodes* lasts approximately 160 days. This cycle is divided into the vegetative phase (mycelium run and brown cap formation), which lasts 80 days, and the reproductive phase (four harvest cycles), which also lasts 80 days [8].

In Brazil, initiating harvest cycles of *L. edodes* requires, as a fundamental step, the submersion of cultivation blocks in water for approximately 8 to 12 h [9]. This process involves the manual transport of each block from the cultivation chamber to immersion tanks, which are typically located 100 to 300 m away. In light of this context, the present study proposes an alternative method for water-based primordia induction that eliminates the need to relocate the blocks, using portable equipment capable of injecting water directly into the substrate.

## **2. Materials and Methods**

The experiment was conducted at the Centro de Estudo em Cogumelos, Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Dracena campus, Brazil. The study was designed to evaluate the effectiveness of an alternative injection method for inducing shiitake fruiting in comparison to the conventional water submersion method.

### **2.1 Substrate Production**

The substrate was prepared using a formulation commonly used for the production of *L. edodes*: 72% eucalyptus sawdust, 12.5% wheat bran, 12.5% rice bran, 1% calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ), and 2% calcium sulfate ( $\text{CaSO}_4$ ). The chemical analysis of the substrate is presented in Table 1, for which its determination was carried out using the methods proposed by the Brazilian Ministry of Agriculture and Livestock [10,11]. The raw materials were homogenized and mixed with water until

reaching 60% moisture. The substrates were then packed in high-density polyethylene (HDPE) autoclave-resistant plastic bags in two distinct formats (rectangular cube and cylindrical).

The substrate was packed in two different container formats. The rectangular format (20 cm length × 15 cm height × 10 cm depth), currently used in experiments conducted in some countries, was filled with 2 kg of moist substrate, representing the standard quantity adopted in experimental trials. The cylindrical format (25 cm diameter × 50 cm length) was filled with 3.5 kg of moist substrate, new methodologies that are arriving in Europe and America (substrate sold by China and South Korea). The substrates were autoclaved at 121 °C for 4 h. After cooling, inoculation was carried out with 2% spawn under aseptic conditions, followed by incubation at  $25 \pm 2$  °C and  $80 \pm 15\%$  relative humidity for 80 days, until complete mycelial colonization and substrate browning. The chemical characteristics of the substrate are presented in Table 1.

**Table 1.** Chemical analysis of the substrate for *Lentinula edodes* cultivation.

| Variables analyzed      | Unit of measurement | Results            |
|-------------------------|---------------------|--------------------|
| N                       |                     | $0.703 \pm 0.01$   |
| Ca                      | %                   | $0.629 \pm 0.01$   |
| Mg                      |                     | $0.321 \pm 0.01$   |
| S                       |                     | $0 \pm 0.01$       |
| Na                      | mg/kg               | $226.124 \pm 3.85$ |
| C/N ratio               |                     | $75 \pm 1.37$      |
| Electrical conductivity | mS/cm               | $1.768 \pm 0.06$   |
| pH                      |                     | $5.89 \pm 0.09$    |

## 2.2. Spawn Production

LED 19/11 strain was used, isolated from commercial shiitake cultivations named FUNGIBRAS® (22°51'01" S, 48°29'26" W), in Botucatu, SP, Brazil. Inoculum production followed the stages: production of subculture, parent spawn, as well as the spawn, according to the methodology described by Moreaux [12]. The production of

subculture was carried out in Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) medium, while the parent spawn and spawn were grown in a sawdust substrate with the same formulation used in the substrate production.

### 2.3. *Production and Harvesting*

At the end of the 80-day substrate browning period by the fungus, the substrate was removed from the plastic bags, washed with running water, and then transferred to the cultivation chamber with temperature of  $19 \pm 4$  °C, relative humidity of  $85 \pm 15\%$ , and a CO<sub>2</sub> concentration of  $850 \pm 500$  ppm. Harvesting was carried out manually, two to four times a day, always before the full opening of the pileus, which is considered the ideal harvest point.

At the end of each production cycle—characterized by a reduction in primordia formation and, in this study, standardized as occurring after 20 days—the blocks were subjected to primordia induction, using either the immersion technique or the injection method. A total of four production flushes were carried out, resulting in a cultivation period of 160 days, which included 80 days allocated to substrate colonization by the fungus. At the end of each flush, the blocks were subjected to a water shock to induce primordia formation. Subsequently, they were reconditioned, when necessary, in the cultivation chambers, where environmental conditions—temperature, relative humidity, and CO<sub>2</sub> concentration—were kept constant and unaltered throughout the period.

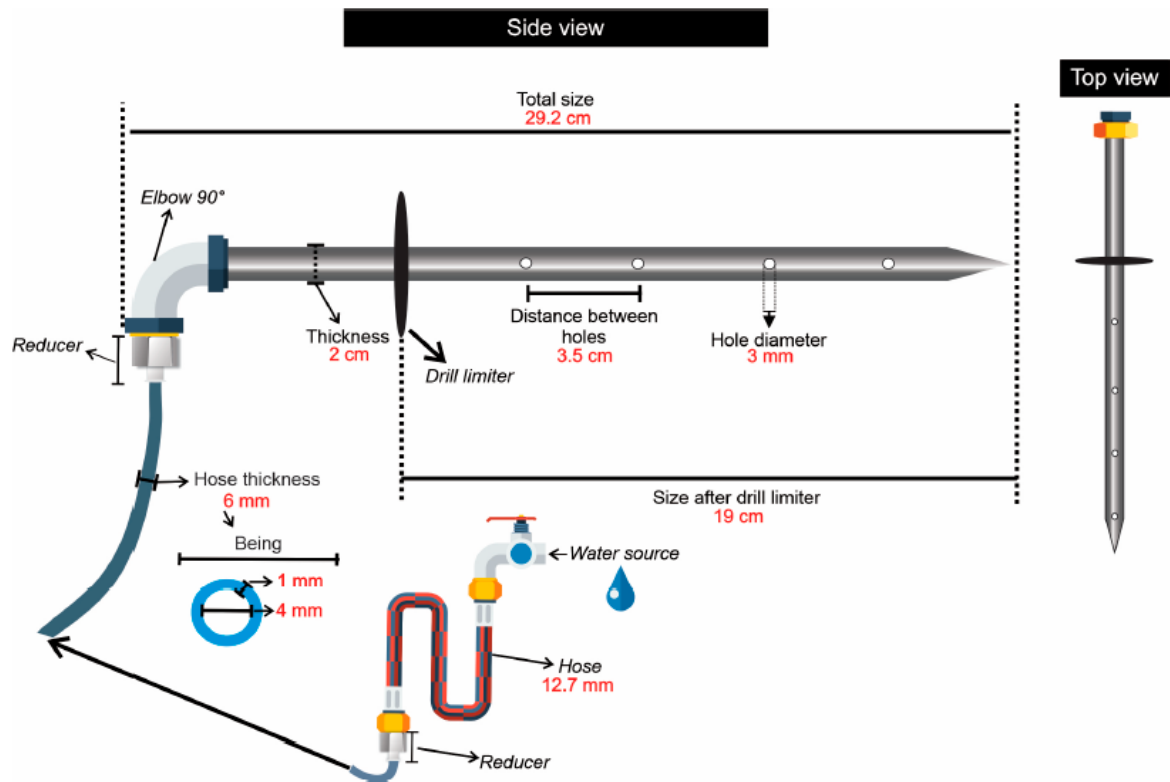
### 2.4. *Fruiting Induction*

For primordia induction, at the end of each harvested flush, two methods were employed: Submersion (traditional method) and injection (Figure 1).

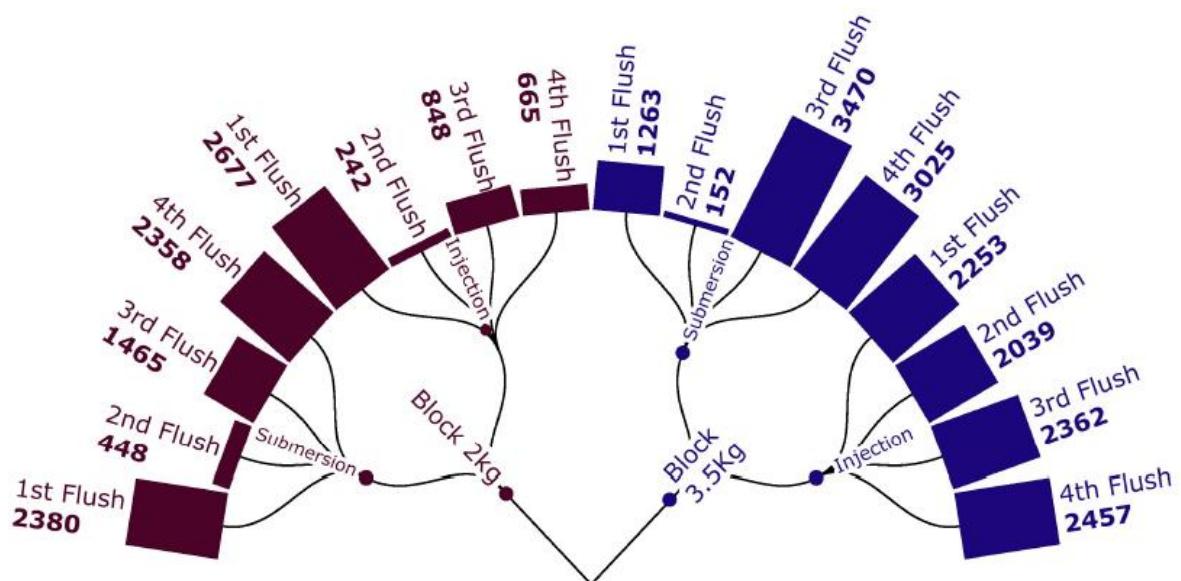
- Submersion method: The substrate (rectangular cube and cylindrical blocks) was transferred to tanks filled with water until they were completely submerged, for 8 h. The tank has a volume measurement of  $2.05 \times 0.57 \times 0.84$  m. After this period, the blocks were removed and relocated to the cultivation chamber, maintaining the previous environmental conditions.

- Injection method: A device with a fine tip, approximately 2 cm in diameter, was introduced into the center of the substrate (rectangular and cylindrical blocks) to a depth of 19 cm. This water injection equipment was designed to facilitate the process of water stress induction. During the procedure, water was injected at a flow rate of 0.045 L per second. The injection rod remained inserted in the block for a duration proportional to the block's weight: 34 s for 2 kg blocks and 60 s for 3.5 kg blocks. To assemble the water injection system for the cultivation blocks, the following materials and configurations were employed, as exemplified in Figure 2:
- The perforation rod was made of stainless steel with a diameter of 6 mm, featuring a 3 cm pointed tip at its end. A depth limiter, also made of stainless steel, was installed to regulate the insertion length of the rod into the cultivation block. This limiter had a circular shape with a 3 cm diameter. A ½" threaded fitting was adapted at the opposite end to connect the rod to the elbow joint.
- The 90° elbow joint was made of galvanized steel with a ½" thickness. One end received the perforation rod, and the other was fitted with a straight male quickconnect fitting (6 mm x ½" threaded) to allow the attachment of the water supply hose.
- A 6 mm hose (3 m in length) was connected through a hose reducer fitting (6 mm to ½"), enabling the transition to a larger diameter hose.
- The ½" hose (10 m in length) was connected to a water tap using a quick-connect coupling system with a ¾" threaded fitting, which served as the water source.
- The average pressure exerted by the injection rod during the water application process was 70 kPa.
- The water used was untreated and sourced directly from an artesian well. It was stored in a conical water tank with a total capacity of 10,000 L, with the following specifications: column height of 6.0 m, cone height of 0.8 m, upper section ("bowl") height of 3.2 m, total height of 10.0 m, column diameter of 0.95 m, and bowl diameter of 1.91 m.





**Figure 1.** Equipment for water injections. The device has a total length of 29.2 cm and comprises a tapered perforation tube measuring 19 cm up to the drill limiter. Its operation is supported by the integration of flexible hoses, hydraulic connectors, sealing elements, and a pressurized water source.



**Figure 2.** Total production (g) of *Lentinula edodes* across different production flushes, with variations in block weight and primordia induction methods.

### 2.5. Analyzed Variables and Experimental Design

The experiment was evaluated based on agronomic parameter, as yield (weight of harvested mushrooms  $\times$  100/initial wet substrate weight), biological efficiency (weight of harvested mushrooms  $\times$  100/initial weight of dry substrate, carried out by dehydration in a forced air oven at a temperature of 105 °C for 24 h), number (counted unit) and weight of mushrooms (fresh mushroom weight/number of mushrooms), Weight gain by water, where for its determination the blocks were weighed before and immediately after carrying out the method, be it submersion or injection, and the calculation was carried out through: difference between mass after induction and the initial mass  $\times$  100/initial mass (values expressed as a percentage). The experiment followed a completely randomized design in a two-factor factorial scheme. The first factor corresponded to different primordia induction methods (submersion and injection), while the second consisted of different block formats: rectangular cube (2 kg) and cylindrical (3.5 kg). Each treatment had 20 replicates, totaling 80 experimental units.

At the end of the study, data were subjected to statistical analysis and Tukey's mean comparison test at a 5% significance. The statistical analyses were performed using R software 4.3.3 [13], while graphical representations were generated using Flourish and Canva (Canva Pty Ltd., London, UK) [14].

## 3. Results

The primordia induction method showed differences in substrate block format/weight. For blocks with an initial weight of 2 kg, the traditional submersion method proved to be more effective in inducing *L. edodes* fruiting. However, in heavier blocks (3.5 kg), the alternative injection technique demonstrated greater efficiency, leading to higher yields (Table 2).

Cultivation blocks of 2 kg achieved a yield of 16.6% when subjected to the submersion method. However, when using the injection method, there was a 33% reduction in yield. In contrast, for blocks weighing 3.5 kg, primordia induction via water

injection resulted in an approximate 13% increase in yield. The same occurs for biological efficiency.

The highest number of mushrooms was observed in the treatments with the greatest productive yields. However, for the 3.5 kg cultivation blocks, no statistically significant differences were identified among the different induction methods. Regarding mushroom weight, the highest average individual weights were recorded in treatments using 3.5 kg cultivation blocks. Nevertheless, no statistically significant differences were detected between the induction methods evaluated.

**Table 2.** Yield of *Lentinula edodes* according to different water induction methods for fruiting and varying block weights.

| Fruiting induction       | Block de 2kg     | Block of 3.5kg |
|--------------------------|------------------|----------------|
| Yield (%)                |                  |                |
| Submersion               | 16.62 ± 0.67 a A | 11.30 ± 0.81 b |
| Injection                | 11.08 ± 0.70 b B | 13.01 ± 0.82 a |
| CV, %                    | 25.96            |                |
| Biological efficiency, % |                  |                |
| Submersion               | 41.55 ± 1.67 a A | 28.25 ± 2.03 b |
| Injection                | 27.7 ± 1.75 b B  | 32.52 ± 2.05 a |
| CV, %                    | 25.96            |                |
| Number of mushroom (u)   |                  |                |
| Submersion               | 10.15 ± 0.67 a A | 7.95 ± 0.68 b  |
| Injection                | 6.90 ± 0.68 b B  | 9.20 ± 0.87 a  |
| CV, %                    | 38.24            |                |
| Mushroom weight (g)      |                  |                |
| Submersion               | 34.63 ± 1.83 b   | 51.93 ± 2.26 a |
| Injection                | 34.20 ± 2.02 b   | 54.66 ± 3.92 a |
| CV, %                    | 26.95            |                |

Averages followed by ± the standard error value. Lowercase letters compare results between columns and uppercase letters compare results between rows. Different letters indicate statistical difference by Tukey's test at 5% significance; absence of letters indicates that the values were not significantly different. At the end of the means obtained for the different primordia induction methods, the coefficient of variation (CV) for the evaluated trait was presented in the central row of the table.

Table 3 presents the water absorption data after applying the primordia induction method before the second and third flush that was statistically significant differences. In the second flush, the 2 kg blocks absorbed more water than the 3.5 kg blocks when submerged in water. Between block sizes, the water injection demonstrated a smaller weight gain, that is, the substrate retained less water.

Unlike the second flush, in the third flush the injection method influenced the weight gain positively in the 2 kg blocks. In addition, for the third flush the weight gain was significantly equal in the 2 kg block.

Regarding production behavior across different flushes, in blocks containing 2 kg of substrate, the submersion method resulted in a production peak in the first flush, followed by a decline in the second, with subsequent recovery until the fourth flush, where the second-highest production was recorded. When using the injection method, the highest production also occurred in the first flush, and the third flush were the second-highest production (Figure 2).

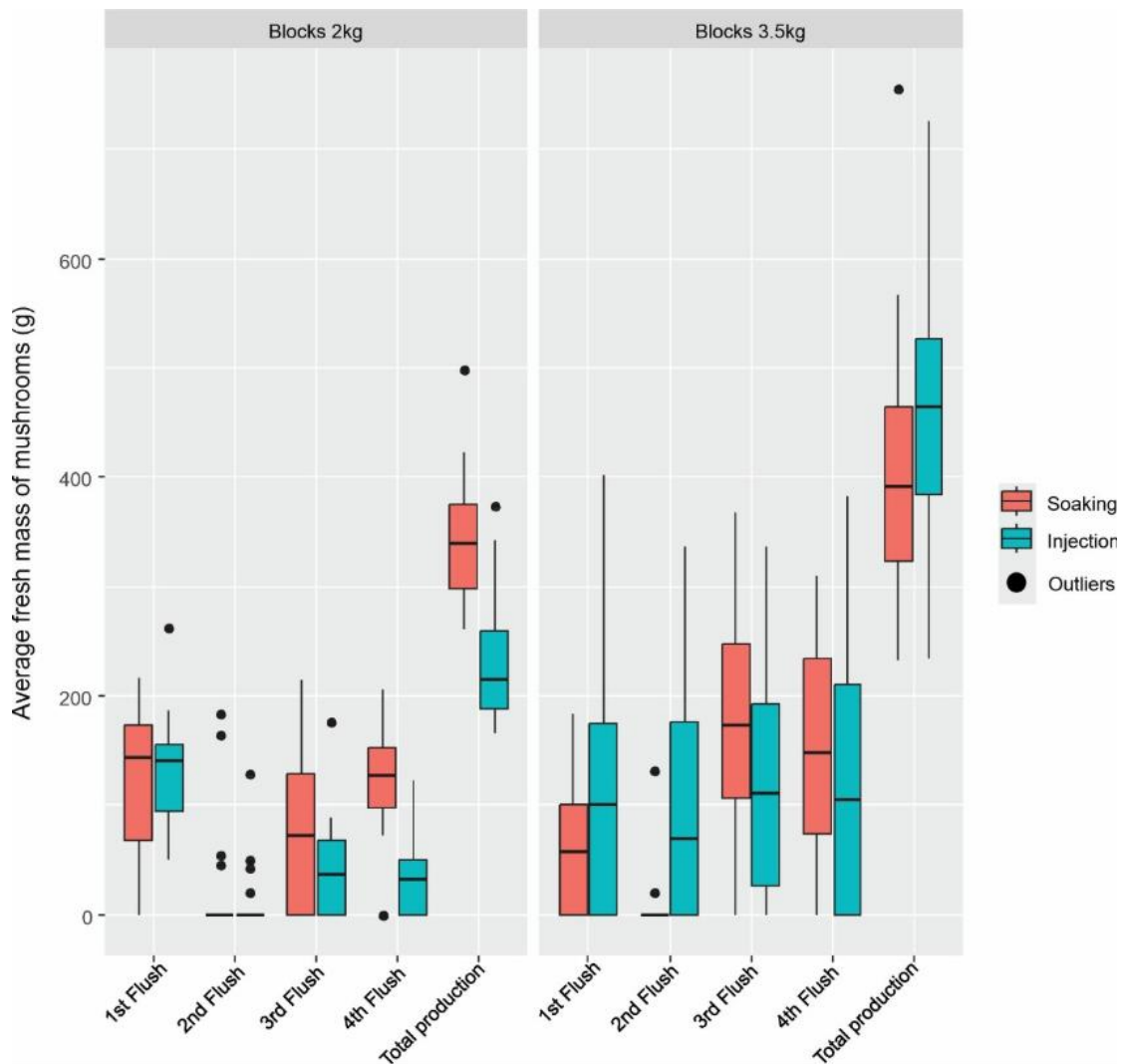
**Table 3.** Weight gain of *Lentinula edodes* blocks with different substrate amounts after being subjected to two different fruiting induction methods.

| Fruiting induction              | Block de 2kg     | Block of 3.5kg   |
|---------------------------------|------------------|------------------|
| Weight gain before 2nd flush, % |                  |                  |
| Submersion                      | 33.11 ± 2.20 a A | 21.12 ± 1.85 b A |
| Injection                       | 18.77 ± 2.11 B   | 13.02 ± 2.10 B   |
| CV, %                           | 33.12            |                  |
| Weight gain before 3rd flush, % |                  |                  |
| Submersion                      | 20.4 ± 1.43      | 18.52 ± 1.54 A   |
| Injection                       | 21.64 ± 0.92 a   | 9.06 ± 1.26 b B  |
| CV, %                           | 33.61            |                  |

Averages followed by ± the standard error value. Lowercase letters compare means between columns and uppercase letters compare means between rows. Different letters indicate statistical difference by Tukey's test at 5% significance; absence of letters indicates that the values were not significantly different.

For 3.5 kg blocks, the production pattern under the submersion treatment was similar to that observed in 2 kg blocks. However, in the injection treatment, production was more uniform across different harvest flushes.

The Generalized Linear Mixed Model (GLMM) analysis revealed differences in *L. edodes* production among the evaluated treatments. The 2 kg blocks exhibited greater data variability, evidenced by the number of outliers, indicating a less homogeneous response to fruiting induction. In contrast, the 3.5 kg blocks showed lower dispersion, suggesting a more stable and consistent process. Additionally, the submersion method exhibited a tendency toward higher yields in the first flush, while injection showed similar or superior performance in total production, especially in the larger-mass blocks. These results indicate that increasing the substrate quantity contributes to greater harvest stability across production cycles (Figure 3).



**Figure 3.** Generalized Linear Mixed Model (GLMM) Analysis for the behavior of fresh mushroom harvest data of *Lentinula edodes* produced in blocks with different substrate quantities and different water stress methods for fruiting induction.

#### 4. Discussion

The yields observed in this study were lower than those reported by other authors [15–18], whose average yield varies around 30%, where higher values are rare and can be presented in some treatments, reaching or approaching 40% in some cases. In the present experiment, the highest yield obtained was 16.62% in the standard treatment, which used rice and wheat bran as supplements and Eucalyptus sawdust as the bulk substrate, with 2 kg blocks. These variations in productivity are considered common depending on the production period of *L. edodes* and may be related mainly to the season of the year, as well as its meteorological variations

[19,20]. In previous experiments conducted under fully controlled conditions, only minor variations in yield were observed using the same strain applied in the present study [18,21,22]. Therefore, it is expected that under semicontrolled conditions—which are more susceptible to environmental fluctuations—a reduction in yield may occur.

During the experimental period, low winter temperatures and low relative humidity likely compromised the productive potential of *L. edodes* [23], as well as the constant fluctuations in temperature and environmental variables [24,25] due to the transition from summer/autumn to winter. However, due to the uniformity of the experimentation, ensured by the completely randomized design, the reliability of comparisons between the two primordia induction techniques evaluated was not compromised.

The number of mushrooms was directly related to the yields obtained, meaning higher productivity (%) resulted in a greater mushroom number. Additionally, cultivation in 3.5 kg blocks resulted in a higher mushroom mass, which may positively impact quality. Larger mushrooms are preferred both in the market, due to their greater commercial acceptability [26,27], and by growers, as harvesting fewer but larger mushrooms reduces labor demand [28].

Regarding the use of injections as an alternative method for primordia induction, it proved efficient when used in blocks with a larger substrate quantity (3.5 kg), demonstrating a reduction in the operational labor of the cultivation process as well as a more rational use of water in mushroom farming. It should be noted that when using this method, it is important to be careful with blocks contaminated with *Trichoderma* spp., due to the introduction of the same equipment (skewer) into different blocks.

During colonization and browning, an estimated weight loss of around 15% occurs, varying according to the substrate used and whether it is carried out in a light-exposed environment. In dark environments, this loss can be reduced to approximately 16% [29]. During the cultivation process, shiitake blocks lose weight primarily due to mushroom harvests and water evaporation. The primordia induction process through water stress also serves to rehydrate the blocks, which is crucial for mushroom development.

Before the first induction process, weight gain variation among the blocks did not result in statistically significant differences between treatments, because all blocks were washed in running water. However, before the second induction, the 3.5 kg blocks showed a lower capacity for water absorption, even with a prolonged injection time (60 s) compared to the 2 kg blocks (34 s). This phenomenon may be associated with greater fungal biomass development within the blocks, as white-rot fungi can hinder water penetration in lignocellulosic materials [30]. Given that the primary composition of the substrate used in this study was eucalyptus sawdust, this factor may have influenced the water absorption dynamics. This process occurs due to capillary forces acting on the material, and over time, as cultivation progresses, water diffusion into the wood fibers reduces, leading to a shorter water relaxation time in the logs [31].

The difference in response between 3.5 kg and 2 kg blocks may be related to the efficiency of water absorption during hydration treatments. In the injection method, the direct introduction of water into the substrate interior promotes more uniform hydration, particularly in larger blocks. Conversely, in the submersion method, the exposure time may not have been sufficient for the water to reach the center of the larger blocks, which could explain their lower performance compared to the smaller blocks, which absorb water more rapidly due to their reduced volume.

The greater variability observed in the data from the 2 kg blocks compared to the 3.5 kg blocks may be related to the fruiting induction method, as the data exhibited distinct patterns between the two procedures. In the submerged induction method, the blocks were removed from the cultivation environment and submerged in water under uncontrolled conditions for approximately 8 h. In contrast, the injection method was performed within the cultivation chamber, with minimal changes in temperature, relative humidity, and gas concentration. Furthermore, smaller blocks tend to reach water saturation more rapidly than larger ones, which may influence the physiological response of the mycelium.

The goal of applying stress to shiitake blocks is to stimulate the development of primordia, and this stress can be administered through various methods, including mechanical and hydraulic techniques. In commercial cultivation environments, these stimuli are carefully planned and monitored, with techniques including temperature



reduction, increased humidity, ventilation, and lighting adjustments. These changes alter the fungal metabolism and direct its energy toward mushroom formation [32].

Typically, primordia induction involves immersing blocks or logs in water, often chilled, to increase stress on the mycelium, thereby promoting its development [33]. Mechanical shock, in turn, is applied by subjecting logs to strong impacts at one end after immersion, which also stimulates mushroom production [30]. In general, most shiitake strains respond better to induction when submerged in water, with immersion times ranging from 8 to 72 h [34,35].

Labor shortages in mushroom production are a recurring concern, as reported in both previous and recent studies [36,37]. This factor represents one of the main costs in the production chain, and, together with current climate changes, has driven the adoption and development of new technologies in mushroom farming. These innovations aim not only to maintain good productivity levels but also to promote greater environmental balance [18,38]. Therefore, simplifying or eliminating certain processes can contribute to reducing production costs.

Another relevant issue concerns the rational use of freshwater, a resource that is becoming increasingly scarce on a global scale. Mushroom production requires a considerable amount of water throughout the entire production process. It is estimated that obtaining 1 kg of mushrooms requires approximately 9 L of water, depending on the species [39]. When considering the water demand for producing the raw materials used in cultivation, this value can reach around 4072 L of water for obtaining 100 g of protein or 282 L for generating 100 kcal, depending on the species [40]. Although these values are lower than those recorded for other production chains, such as pork, which requires approximately 12,696 L for the same amount of protein [41], optimizing water consumption in mushroom farming remains a relevant concern.

For fruiting induction in approximately 120 shiitake blocks weighing 3.5 kg, the traditional immersion method requires a total water volume of approximately 1000 L. Moreover, the blocks absorb an average of 19.82% of their initial weight, as observed in our study (Table 3). On the other hand, the injection induction method requires approximately 324 L of water (considering 60 s per block at a flow rate of 0.045 L per second) for the same number of blocks, representing a 67.6% reduction in water consumption. These results suggest that the injection technique may be an efficient

alternative for reducing water waste, contributing to sustainability in shiitake cultivation. However, further studies are necessary to evaluate the efficiency of this method without compromising production yields.

From an economic perspective, the construction of a masonry tank for the submersion of approximately 120 *Lentinula edodes* blocks requires an area of around 3.7 m<sup>3</sup>, with an average cost of USD 60.45 per m<sup>3</sup> (Value according to direct conversion from Real (R\$) to Dollar (USD) through quotation from the Central Bank of Brazil) [42], totaling approximately USD 223.66. This estimate does not include additional expenses related to waterproofing, plumbing systems, faucets, grates, and other components necessary for complete block submersion, which may vary significantly among producers.

In comparison, the assembly of a water injection system—comprising approximately 100 m of hose and four simultaneous applicators—requires an investment of about USD 189.87. This cost includes all connectors, hoses, and the professional fabrication of the water injection needle. The system is capable of inducing up to 1900 production blocks in a single 8 h workday, operated by just one person and without the need to remove the blocks from the cultivation chamber.

Additionally, there is a notable reduction in water consumption. With the average cost of 1 m<sup>3</sup> of water estimated at approximately USD 0.019 [43], this method results in an estimated saving of USD 107.06 per production cycle, contributing to greater process efficiency and sustainability.

## 5. Conclusions

The results demonstrate that the choice of primordia induction method should consider the substrate block size. For 2 kg blocks, immersion was more efficient, while for 3.5 kg blocks, water injection performed better and provided greater production stability. Additionally, the injection method reduced handling and water consumption, offering a viable alternative for large-scale cultivation. The water and operational efficiency of this method may represent a significant advancement in mushroom farming, especially in the face of resource and labor shortages.

## References

1. Ahmad, I.; Arif, M.; Xu, M.; Zhang, J.; Ding, Y.; Lyu, F. Therapeutic values and nutraceutical properties of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*): A review. *Trends. Food. Sci. Technol.* 2023, 134, 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.03.007>.
2. Fukushima-Sakuno, E. Bioactive small secondary metabolites from the mushrooms *Lentinula edodes* and *Flammulina velutipes*. *J. Antibiot.* 2020, 73, 687–696. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0354-x>.
3. Roszczyk, A.; Turło, J.; Zagożdżon, R.; Kaleta, B. Immunomodulatory properties of polysaccharides from *Lentinula edodes*. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 8980. <https://doi.org/10.3390/ijms23168980>.
4. Royse, D.J.; Baars, J.; Tan, Q. Current overview of mushroom production in the world. In *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2017; pp. 5–13. <https://doi.org/10.1002/9781119149446.ch2>.
5. Sánchez, J.E.; Zied, D.C.; Albertó, E. Edible mushroom production in the Americas. In *Proceedings of the 9th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, Shanghai, China, 12–19 November 2018; pp. 2–11.
6. Atila, F. Compositional changes in lignocellulosic content of some agro-wastes during the production cycle of shiitake mushroom. *Sci. Hortic.* 2019, 245, 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.029>.
7. Zied, D.C.; Maciel, W.P.; Marques, S.C.; da Silveira e Santos, D.M.; Rinker, D.L.; Dias, E.S. Selection of strains for shiitake production in axenic substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 32, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2115-3>.
8. Xu, S.; Wang, F.; Fu, Y.; Li, D.; Sun, X.; Li, C.; Song, B.; Li, Y. Effects of mixed agro-residues (corn crop waste) on lignin-degrading enzyme activities, growth, and quality of *Lentinula edodes*. *RSC Adv.* 2020, 10, 9798–9807. <https://doi.org/10.1039/C9RA10405D>.
9. Sarhadi, H.R.; Ramezan, D.; Zarabi, M.M.; Pirnia, M.; Dehsorkhi, A.N.; Yousefshahi, B. Evaluation of physical and chemical properties of substrate components in the production process of shiitake mushroom (*Lentinula edodes* (Berk.)

Pegler). J. Plant. Prod. 2021, 28, 131–146.  
<https://doi.org/10.22069/jopp.2021.18521.2732>.

10. Mapa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil Instrução Normativa SDA Nº 17. Métodos Analíticos Oficiais Para Análise de Substratos Para Plantas e Condicionadores de Solo; Secretaria de defesa Agropecuária: Brasília, Brazil, 2017; p. 8.

11. Mapa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil. Manual de Métodos Analíticos Oficiais Para Fertilizantes e Corretivos; Secretaria de Defesa Agropecuária: Brasília, Brazil, 2017; p. 240.

12. Moreaux, K. Spawn Production. In *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2017; pp. 89–128.

13. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016. Available online: <https://www.R-project.org> (accessed on 23 May 2024).

14. Flourish, a Canva UK Operations Limited brand. Data Visualization and Storytelling, London, UK, 2024. Available online: <https://flourish.studio/> (accessed on 25 March 2025).

15. Yu, G.; Li, X.; Zhao, S.; Sun, S.; Yu, Y.; Chen, J.; Cheng, X.H.; Li, W. Waste apple wood: A safe and economical alternative substrate for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Folia. Hortic.* 2022, 34, 1–13.  
<https://doi.org/10.2478/fhort-2022-0014>.

16. Sassine, Y.N.; Nabhan, S.; Rachkidy, E.; El Sebaaly, Z. Valorization of agro-forest wastes (oak acorns, vineyard pruning, and olive pruning) through the cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*) mushrooms. *Heliyon* 2024, 10, e32562.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32562>.

17. Zied, D.C.; Silva, B.D.; Caitano, C.E.C.; Vieira Junior, W.G.; da Silva Freitas, M.A.; Teixeira, P.A.G.; Pardo-Giménez, A. Use of Eucalyptus Charcoal Waste in the Formulation of Substrate for the Cultivation of Two Strains (LED 20/11 and LED 20/12) of *Lentinula edodes*. *Agronomy* 2024, 14, 811.  
<https://doi.org/10.3390/agronomy14040811>.

18. Vieira Junior, W.G.; Caitano, C.E.C.; da Silva Alves, L.; Teixeira, P.A.G.; Noble, R.; Pardo, J.E.; Zied, D.C. From waste to resource: Sustainable reuse of spent shiitake mushroom substrate in subsequent production cycles. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 2025, 200, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2025.106034>.
19. Abilio, D.P.; de Oliveira, G.L.P.; Martins, O.G.; da Silva Motta, S.; Siqueira, O.A.P.A.; de Andrade, M.C.N. Produção de *Lentinula edodes* em toras de híbridos de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*. *Rev. Em Agronegócio E Meio Ambiente* 2020, 13, 1433–  
<https://doi.org/10.17765/2176-9168.2020v13n4p1433-1446>.
20. Urban, A.F. Produção de Cogumelos Por Meio de Tecnologia Chinesa Modificada: Biotecnologia e Aplicações na Agricultura e na Saúde, 3rd ed.; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA): Brasília, Brazil, 2017; p. 274.
21. Castro, C.P.D.; Abreu, C.G.D.; Moraes, T.S.J.D.; Zied, D.C.; Siqueira, F.G.D.; Dias, E.S. Shiitake mushroom cultivation in composted substrate: Is it possible? *Ciênc. Agrotec.* 2024, 48, e013224.
22. Avila, I.A.F.; da Silva Alves, L.; Zied, D.C. Bioconversion of rice straw by *Lentinula edodes* under different spawn formulations. *Braz. J. Microbiol.* 2023, 54, 3137–3146.
23. Kim, I.Y.; Kim, S.C.; Noh, J.H.; Choi, S.G.; Lee, W.H.; Ko, H.G.; Park, H.S.; Koo, C.D. Effects of productivity of *Lentinula edodes* according to the control of high-temperature environment in summer. *J. Mushroom* 2015, 13, 288–293.  
<https://doi.org/10.14480/JM.2015.13.4.288>.
24. Kobayashi, N.; Wada, N.; Yokoyama, H.; Tanaka, Y.; Suzuki, T.; Habu, N.; Konno, N. Extracellular enzymes secreted in the mycelial block of *Lentinula edodes* during hyphal growth. *AMB Express.* 2023, 13, 36. <https://doi.org/10.1186/s13568-023-01547-6>.
25. Song, X.; Shang, X.; Zhang, M.; Yu, H.; Zhang, D.; Tan, Q.; Song, C. Cultivation methods and biology of *Lentinula edodes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2025, 109, 63.
26. Shah, T.D. Analysis of consumer perceptions regarding mushroom consumption in their regular diet: A case of Western-India (Gujarat). *Sarhad J. Agric.* 2021, 37, 613–621.

27. Cianni, R.; Pippinato, L.; Mancuso, T. A systematic review on drivers influencing consumption of edible mushrooms and innovative mushroom-containing products. *Appetite* 2023, 182, 106454. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2023.106454>.
28. Li, C.; Xu, S. Edible mushroom industry in China: Current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2022, 106, 3949–  
<https://doi.org/10.1007/s00253-022-11985-0>.
29. Jung, J.Y.; Hong, S.C.; Rinker, D.L.; Choi, M.S.; Lee, B.H.; Yang, J.K. Effects of nutrient composition on yield and quality of mushroom in *Lentinula edodes* cultivation using softwood sawdust. *J. Korean. Wood. Sci. Technol.* 2010, 38, 124–134.
30. Frankl, J. Changes in swelling and water absorption of wood degraded by brown rot fungi. *Adv. Mater. Res.* 2013, 778, 818–822.  
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.778.818>.
31. Ogawa, K.; Yashima, T. Enhanced water uptake in the longitudinal direction by shiitake mycelium in shiitake cultivation logs: Increase in effective diffusion coefficient based on mass of liquid water uptake. *Wood. Sci. Technol.* 2021, 55, 1237–1267.  
<https://doi.org/10.1007/s00226-021-01313-6>.
32. Kumar, P.; Eid, E.M.; Al-Huqail, A.A.; Širić, I.; Adelodun, B.; Abou Fayssal, S.; Valadez-Blanco, R.; Goala, M.; Ajibade, F.O.; Choi, K.S.; Kumar, V. Kinetic studies on delignification and heavy metals uptake by shiitake (*Lentinula edodes*) mushroom cultivated on agro-industrial wastes. *Horticulturae* 2022, 8, 316.
33. El Sebaaly, Z.; Assadi, F.; Sassine, Y.N.; Shaban, N. Substrate types effect on nutritional composition of button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Poljoprivreda. Sumarstvo.* 2019, 65, 73–80.
34. Shiomi, H.F.; Minhoni, M.T.D.A.; Machado, J.O.; Cargnelutti Filho, A. Thermal and mechanical shocks affecting the first flush of production of *Lentinula edodes* on *Eucalyptus saligna* logs. *Braz. J. Microbiol.* 2007, 38, 200–203.
35. Mao, L.; Cone, J.W.; Hendriks, W.H.; Sonnenberg, A.S. Wheat bran addition improves *Ceriporiopsis subvermisporea* and *Lentinula edodes* growth on wheat straw, but not delignification. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 2020, 259, 114361.
36. Raut, J.K. Current status, challenges and prospects of mushroom industry in Nepal. *Int. J. Agric. Econ.* 2019, 4, 154–160. <https://doi.org/10.11648/j.ijae.20190404.13>.
37. Sexsmith, K.; Huerta-Arredondo, I.; Gorgo-Simcox, M.; Palacios, E.; Griffin, M.A. Farm Labor Shortage in the Pennsylvania Mushroom Industry: A Gender-

- Sensitive Comparison of Farmer and Farmworker Perspectives. *Rural. Sociol.* 2024, 89, 404–430. <https://doi.org/10.1111/ruso.12546>.
38. Kim, M.J.; Jeong, Y.S.; Kim, E.; Jang, Y.; Ka, K.H. Selection of *Lentinula edodes* sawdust cultivation cultivars suitable for sawdust block medium cultivation. *Korea J. Mycol.* 2023, 51, 81–90. <https://doi.org/10.4489/KJM.20230009>.
39. Robinson, B.; Winans, K.; Kendall, A.; Dlott, J.; Dlott, F. A life cycle assessment of *Agaricus bisporus* mushroom production in the USA. *Int. J. LCA* 2019, 24, 456–467. <https://doi.org/10.1007/s11367-018-1456-6>.
40. Silva, S.T.D.; Atapattu, N.S.B.M.; Kumara, K.L.W. The Water Footprint of Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) Cultivation under Small-scale Polybag Farming Conditions in Sri Lanka. *J. Agric. Sci. –Sri Lanka* 2023, 18, 172–182. <https://doi.org/10.4038/jas.v18i2.10251>.
41. Mekonnen, M.M.; Hoekstra, A.Y. A global assessment of the water footprint of farm animal products. *Ecosystems* 2012, 15, 401–  
<https://doi.org/10.1007/s10021-011-9517-8>.
42. Governo do Brasil, Tabelas de Preços Referencias Para o Segmentos Específicos de Obras. Available online: [https://www.gov.br/mdr/pt-br/assuntos/seguranca-hidrica/projeto-sao-francisco/Tabelas\\_de\\_Precos\\_Referenciais\\_PISF\\_e\\_Segmentos\\_especificos\\_de\\_obras\\_\\_\\_RL.pdf](https://www.gov.br/mdr/pt-br/assuntos/seguranca-hidrica/projeto-sao-francisco/Tabelas_de_Precos_Referenciais_PISF_e_Segmentos_especificos_de_obras___RL.pdf) (accessed on 23 April 2025).
43. Agência IBGE notícias, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Em 2020, Para Cada R\$ 1,00 Gerado Pela Economia Foram Consumidos 6,2 Litros de Água. Available online: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/37054-em-2020-para-cada-r-1-00-gerado-pela-economia-foram-consumidos-6-2-litros-de-agua> (accessed on 23 April 2025).