

Avaliação do crescimento micelial de linhagens de shiitake, da produção em toras de eucalipto e de alterações físicas da madeira

Meire Cristina Nogueira de Andrade^{1*}, Fred Willians Calonego¹, Marli Teixeira de Almeida Minhoni², Elias Taylor Durgante Severo² e João Kopytowski Filho¹

¹Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Energia na Agricultura, Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Fazenda Lageado, s/n. Cx. Postal 237, 18603-970, Botucatu, São Paulo, Brasil. ²Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Fazenda Lageado, Botucatu, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: mcnandrade@hotmail.com

RESUMO. Avaliou-se o crescimento micelial das linhagens de shiitake LE-95/01, LE-96/18, LE-96/13, LE-98/55, LE-98/47, LE-95/02, LE-95/06 e LE-95/07, a sua produção em toras de eucalipto e as conseqüentes alterações em características físicas da madeira em decorrência da inoculação com a linhagem LE-96/18. O crescimento micelial foi avaliado em meio de cultura SA (serragem enriquecida com farelo-ágar) a 25°C. No cultivo em toras, cada linhagem foi inoculada em 40 toras de *Eucalyptus grandis* com 1 m de comprimento e 9 a 14 cm de diâmetro. As toras foram mantidas em estufa climatizada, com temperatura de 25°C ± 3 e umidade relativa entre 75-90%, durante 6 meses. Em seguida, foi realizado um “choque de indução”, seguido da produção de basidiomas. Verificou-se que: (1) a linhagem LE-95/01 obteve as maiores produções, mesmo tendo crescimento mais lento no teste *in vitro*; (2) houve crescimento lento da linhagem LE-95/06 *in vitro* e baixa produção de basidiomas; (3) o teor de umidade das toras inoculadas com a linhagem LE-96/18 sofreu aumento ao longo do cultivo, enquanto a massa específica sofreu diminuição.

Palavras-chave: *Lentinula edodes*, shiitake, crescimento micelial, produção, toras, massa específica.

ABSTRACT. Evaluation of mycelium growth of shiitake strains, of production in *Eucalyptus* logs and of physical alteration of the wood. The growth rate of 8 strains of shiitake (LE-95/01, LE-96/18, LE-96/13, LE-98/55, LE-98/47, LE-95/02, LE-95/06 and LE-95/07), the production of these in *Eucalyptus* logs at the first flush, and consequent alterations in physical characteristics of the wood due the inoculation with the strain LE-96/18 were evaluated. The mycelium growth was inoculated in SA medium (sawdust enriched with crumb-agar), in the absence of light, at 25°C. In log cultivation, each strain was inoculated in 40 logs of *Eucalyptus grandis* with 1 meter length and 9 to 14 cm of diameter. The logs were maintained at 25°C ± 3 and relative humidity of 75-90%, for 6 months. Subsequently, the first flush was accomplished, and it was verified: (1) the lineage LE-95/01 obtained the largest production and slower mycelium growth *in vitro*; (2) there was slow growth of the strain LE-95/06 and low mushrooms production; (3) the moisture of the logs inoculated with strain LE-96/18 increased along the cultivation, whereas the specific mass decreased.

Key words: *Lentinula edodes*, shiitake, mycelium growth, production, logs, specific mass.

Introdução

O cogumelo *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler é conhecido popularmente como Shiitake. Contudo na China, recebe também os nomes de Xiang-gu, Dong-gu, Cogumelo aroma, entre outros; na França é conhecido como Lentin, enquanto nos Estados Unidos, como Cogumelo da floresta (Chen, 2005). O Shiitake é o segundo cogumelo mais cultivado no

mundo (Oei, 2005), cuja ordem de crescimento no período de 1986 a 1997 foi de 400% (Chen, 2005).

Seu cultivo teve início na China, por volta de 960 D.C., e, em 1500, foi introduzido no Japão pelos agricultores chineses (Przybylowicz e Donoghue, 1990). Posteriormente, foi expandido para os demais países da Ásia Oriental (Levanon *et al.*, 1993), tornando-se para esses países um produto agrícola e industrial importante (Chang e Miles, 1989). Nas

Américas Central e do Sul, o cultivo comercial vem se desenvolvendo nos últimos 25 anos, especialmente desde 1990 (Lahmann e Rinker, 1991).

Embora existam duas formas de cultivo (em toras e o axênico), o mais utilizado no Brasil é o sistema em toras, sendo o eucalipto a espécie arbórea mais utilizada, devido a sua maior disponibilidade e custo baixo.

Os fatores que podem interferir na produtividade do shiitake são: linhagem, substrato, diâmetro das toras, condições climáticas, número de orifícios inoculados e métodos de manejo (San Antonio, 1981; Andrade, 2003; Minhoni et al., 2005).

A escolha das linhagens é um fator de fundamental importância para se obter sucesso no cultivo de Shiitake, pois elas podem diferir quanto à velocidade de crescimento micelial, à temperatura e a umidades ótimas de incubação e de “frutificação”, à, resistência a fungos contaminantes, ao tamanho e forma dos basidiomas e à produtividade (Teixeira, 2000; Campbell e Racjan, 1999; Przybylowicz e Donoghue, 1990).

Desse modo, este trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento micelial de 8 linhagens de Shiitake *in vitro*, sua produção em toras e as conseqüentes alterações em características físicas da madeira.

Material e métodos

Foram realizados dois experimentos no período de Julho/2004 a Fevereiro/2005, ambos conduzidos nas dependências do Departamento de Produção Vegetal/Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências (FCA) Agrárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Estado de São Paulo.

As linhagens de *Lentinula edodes* utilizadas nos experimentos foram: LE-95/01, LE-96/18, LE-96/13, LE-98/55, LE-98/47, LE-95/02, LE-95/06 e LE-95/07, as quais estavam mantidas em óleo mineral estéril à temperatura de 8°C na Micoteca do Módulo de Cogumelos - FCA/ Unesp.

No primeiro experimento, *in vitro*, avaliou-se o crescimento micelial das linhagens de *L. edodes*. Em câmara de fluxo laminar, discos de matriz secundária dessas linhagens foram inoculados no centro de placas de Petri contendo o meio SA (serragem enriquecida com farelo-ágar). Esse meio de cultura foi preparado a partir da infusão de 80 g de serragem de eucalipto úmida (enriquecida com 10% de farelo de trigo, 10% de farelo de arroz e 1% de calcário calcítico), em um litro de água fervente durante 15 minutos, sendo, em seguida, filtrado em peneira do tipo comum (uso doméstico) de malha fina e algodão. Posteriormente, foi disposto em frascos

Duran (capacidade de 1 L), completando-se seu volume para 1 L e submetendo-o ao processo de tinalização, ou seja, autoclavou-se a 121°C por 30 minutos e, após 24 horas, adicionou-se ágar, autoclavou-se novamente a 121°C por mais 30 minutos, seguido de resfriamento do meio de cultura até, aproximadamente, 45-50°C. Assim preparado, o meio foi vertido em placas de Petri previamente esterilizadas. Posteriormente, as placas foram incubadas em BOD a 25±1°C até que uma das linhagens atingisse $\frac{3}{4}$ da placa.

Durante esse período, a cada 48 horas a partir da data de inoculação, foram feitas avaliações do crescimento micelial das linhagens do *L. edodes* por meio de medição do crescimento radial do micélio na superfície do meio. Com o uso de uma régua graduada em milímetros, foram feitas quatro medidas em sentidos diametralmente opostos, estabelecendo-se uma média para cada uma das repetições.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada tratamento (linhagem) constou de 9 repetições, cada qual correspondente a uma placa de Petri. Após análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

No segundo experimento, em toras, foram utilizadas árvores de *Eucalyptus grandis*, de primeiro corte, com seis anos de idade, cultivadas na Estação Experimental de Ciências Florestais, Esalq/USP, localizada no município de Itatinga, Estado de São Paulo. Foram obtidas 320 toras medindo 1 m de comprimento e diâmetro entre 9 e 14 cm. Após o corte, as toras foram transportadas para as dependências do Módulo de Cogumelos, FCA/ Unesp, onde foram colocadas em posição horizontal, até a inoculação no dia seguinte.

Para a inoculação das toras, utilizou-se inóculo (micélio do fungo desenvolvido em substrato) de todas as linhagens de *L. edodes*. Inicialmente, foram abertos orifícios alinhados em sentido longitudinal à tora, em um padrão de “zig-zag”, com auxílio de uma furadeira elétrica e broca de aço para madeira de 12 mm de diâmetro e 20 mm de profundidade. O número total de orifícios foi equivalente a quatro vezes o diâmetro da tora, distanciado cerca de 5 cm entre linhas e cerca de 10 cm entre orifícios de uma mesma linha. Imediatamente após a abertura dos orifícios, eles foram preenchidos com o inóculo e, na seqüência, vedados com parafina liquefeita a 125–130°C.

As toras inoculadas foram colocadas em uma estufa em 4 pilhas de 80 toras, sendo cada pilha composta de 10 níveis de 8 toras, espaçadas em torno

de 5 cm entre si. Os níveis de toras de cada pilha tiveram direções diferentes, de modo que níveis consecutivos formaram um ângulo de 90° entre si. A irrigação foi diária, com auxílio de mangueira, mantendo a umidade relativa do ar entre 75-90% e temperatura a 25 ± 3°C. As toras permaneceram nessas condições por 8 meses.

Após o período de incubação, a formação de basidiomas foi estimulada artificialmente. Para isso, as toras foram transferidas para um tanque de alvenaria e presos ao fundo com o auxílio de uma corrente para que não flutuassem. Em seguida, as toras foram submersas em água por um período de 24 horas. Posteriormente, as toras foram dispostas em outra estufa onde permaneceram em posição vertical inclinada, com espaçamento de 10 cm entre elas, sendo mantidas úmidas, por meio de irrigação diária, até o aparecimento dos primórdios. A umidade relativa do ar foi mantida em torno de 75% e a temperatura, a 25 ± 3°C.

Os basidiomas foram colhidos quando o píleo apresentou abertura em torno de 80%, o que ocorreu entre o 5° e 8° dias após a indução. Porém, no 8° dia, todos os basidiomas foram colhidos, mesmo os que não alcançaram abertura de 80%. Após a colheita, as toras inoculadas com a linhagem LE-96/18 foram novamente incubadas por mais 2 meses.

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados com 8 tratamentos (linhagens de shiitake) e 40 repetições por tratamento (toras). Após análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Quanto à avaliação de características físicas da madeira, foram selecionadas 30 toras ao acaso, das quais foi retirado um disco de 5 cm de espessura, logo após o corte e com 3, 6 e 8 meses após a inoculação com a linhagem LE-96/18. Todos os discos foram identificados. O teor de umidade, bem como a massa específica básica desses discos foram determinados com base em massa seca, através das Equações 1 e 2. Para tanto, utilizou-se uma balança de precisão de 0,1 g e uma estufa com regulagem de temperatura a 103 ± 2°C.

$$U \% = \frac{M_U - M_S}{M_S} * 100 \quad (1)$$

$$\rho = \frac{M_S}{V_V} \quad (2)$$

onde:

U% = teor de umidade com base na massa seca da madeira, %;

M_U = massa úmida da madeira, g;

M_S = massa seca da madeira, g;

ρ = massa específica básica da madeira, g (cm³)⁻¹;

V_V = volume no estado verde da madeira, cm³.

Resultados e discussão

No experimento *in vitro*, observou-se diferença significativa no crescimento micelial das linhagens de *L. edodes* (Tabela 1). Em 2 dias de incubação, a linhagem LE-95/06 apresentou o maior crescimento micelial enquanto os menores crescimentos foram observados para as linhagens LE-95/01, LE-96/18 e LE-95/02. Em 4 dias de incubação, verificou-se maior crescimento micelial na linhagem LE-98/55 e o menor na linhagem LE-95/02. Em 6 dias de incubação, novamente a linhagem LE-98/55 apresentou maior crescimento micelial e as linhagens LE-95/02 e LE-95/06, os menores. Finalmente, em 8 e 10 dias de incubação, a linhagem LE-98/55 prevalece com o maior crescimento, juntamente com a linhagem LE-96/13, e o menor crescimento foi observado na linhagem LE-95/06.

Esses resultados evidenciam que há diferenças na velocidade de colonização micelial entre linhagens de *L. edodes*, conforme já verificado por Teixeira (2000). De acordo com a mesma autora, as linhagens também diferenciam quanto às características morfológicas dos basidiomas (tamanho, cor, forma).

Embora a linhagem LE-95/06 tenha tido um bom crescimento micelial em 2 dias de incubação, este tornou-se lento. A linhagem LE-98/55, por sua vez, teve comportamento inverso, ou seja, em 2 dias de incubação, apresentou crescimento micelial menor que a linhagem LE-95/06 e, no entanto, nas demais avaliações, obteve os melhores resultados (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação do crescimento micelial (mm) de 8 linhagens de *Lentinula edodes*, em meio SA (serragem enriquecida com farelo-ágar), durante 10 dias de desenvolvimento, a 25°C.

Linhagens	Período de incubação, dias				
	2	4	6	8	10
LE-98/55	7,78b ⁽¹⁾	21,78a	38,67a	56,11a	73,22a
LE-96/13	7,33bc	20,22b	36,89ab	54,56a	71,78a
LE-95/07	7,78b	20,78ab	35,11b	49,67b	64,22b
LE-98/47	7,00cd	18,44c	31,89c	44,55d	61,00cd
LE-95/01	6,33d	17,22d	31,44c	47,22c	61,89bc
LE-96/18	6,33d	17,33d	31,00c	45,11cd	59,22d
LE-95/02	6,56d	16,00e	27,22d	40,11e	52,56e
LE-95/06	9,56a	19,11c	27,44d	35,67f	45,33f

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Os resultados obtidos no experimento em toras demonstraram que o número de basidiomas (NB) produzidos pelas linhagens LE-95/01 e LE-96/18 foi significativamente superior às linhagens LE-95/07 e LE-95/06 (Tabela 2).

Quanto ao diâmetro do píleo (DP), a linhagem LE-95/06 foi significativamente inferior quando comparado à linhagem LE-95/01 (Tabela 2).

Em relação à massa fresca de basidiomas (MFB), a linhagem LE-95/01 foi significativamente superior às linhagens LE-95/06, LE-95/07, LE-95/02 e LE-98/47 (Tabela 2). Quanto às outras linhagens, todas tiveram comportamento semelhante entre si.

A rápida velocidade de micelição geralmente é vista como um fator positivo na produção de shiitake. No entanto nem sempre esse fato é garantia de uma boa produção. Prova disso é a linhagem LE-95/07 que, embora tenha tido maior crescimento micelial quando comparada à linhagem LE-95/01 *in vitro* (Tabela 1), em termos de produção, obteve número de basidiomas (NB) e massa fresca de basidiomas (MFB) inferiores (Tabela 2). A linhagem LE-95/06 por sua vez, embora tenha obtido maior crescimento micelial que a linhagem LE-95/01 aos 2 e 4 dias de incubação *in vitro* (Tabela 1), obteve resultados de produção inferiores à LE-95/01 (Tabela 2).

Tabela 2. Número total médio de basidiomas por tora (NB), diâmetro médio do píleo (DP) e da massa fresca média de basidiomas (MFB) no primeiro choque de indução.

Tratamento	NB	DP (cm)	MFB (g)
LE-95/01	8,45a ⁽¹⁾	4,78a	82,03a
LE-96/18	8,38a	4,08ab	69,83ab
LE-96/13	6,80ab	4,00ab	65,60ab
LE-98/55	5,23ab	3,70ab	49,08ab
LE-98/47	5,21ab	3,97ab	43,92b
LE-95/02	5,15ab	3,80ab	42,68b
LE-95/07	3,10b	3,95ab	40,65b
LE-95/06	3,88b	2,79b	32,60b

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na Tabela 3 verifica-se a análise de variância levando-se em consideração o efeito do tempo de produção da linhagem LE-96/18 sobre o teor de umidade das toras de *E. grandis*. Como o valor de p foi inferior a 0,05, conclui-se que houve diferença significativa entre o teor de umidade da madeira com o período de produção do fungo.

Tabela 3. Análise de variância do teor de umidade da madeira no período de produção da linhagem LE-96/18.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	3	28944,38	9648,128	11,504	<0,001
Resíduo	97	81353,37	838,695		
Total	100	110297,75			

Considerando-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os teores de umidade da madeira, durante a produção da linhagem LE-96/18, foi realizado o teste de Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de probabilidade. A Tabela 3 demonstra que, pelo

menos um dos períodos entre 0 e 8 meses diferem entre si. Na Tabela 4 são apresentados os teores de umidade da madeira durante o ciclo de cultivo da linhagem LE-96/18.

Entre as possíveis causas do aumento do teor de umidade da madeira de *Eucalyptus grandis* estão a incubação das toras em ambiente com umidade relativa do ar elevada, a sua imersão em água e a sua degradação pelo fungo, fato esse evidenciado pela diminuição da massa seca dos discos de madeira.

Tabela 4. Teste de Tukey para comparação de médias do teor de umidade da madeira entre os tratamentos.

Tempo (meses)	Umidade (%)
0	89,53 a ⁽¹⁾
3	120,81 b
6	124,86 b
8	146,14 c

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste paramétrico de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 5, pode-se verificar o quadro de análise de variância levando-se em consideração o efeito do tempo de produção do LE-96/18 sobre a massa específica básica das toras de *E. grandis*. Como o valor de p foi inferior a 0,05, conclui-se que houve diferença significativa entre a massa específica básica da madeira com o período de cultivo da linhagem LE-96/18.

Tabela 5. Análise de Variância da massa específica básica da madeira no período de produção da linhagem LE-96/18.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	3	0,0269	0,00895	14,908	<0,001
Resíduo	97	0,0582	0,000600		
Total	100	0,0851			

Considerando-se que houve diferença significativa entre as massas específicas básicas da madeira durante a produção do fungo, foi realizado o teste de Tukey para comparação de médias ao nível de 95% de probabilidade. Na Tabela 6, demonstra-se que, pelo menos, um dos períodos entre 0 e 8 meses difere entre si.

Tabela 6. Teste de Tukey para comparação de médias da massa específica básica da madeira entre os tratamentos.

Tempo (meses)	Massa específica básica $g(cm^3)^{-1}$
0	0,377 a
3	0,370 a
6	0,348 b
8	0,334 b

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste paramétrico de Tukey a 5% de probabilidade.

Conclusão

O crescimento micelial do shiitake varia em função das linhagens, de modo que a linhagem LE-98/55 obteve crescimento micelial mais rápido,

enquanto a linhagem LE-95/06 foi mais lenta.

A produção do *L. edodes* em toras varia com a linhagem, de modo que a linhagem LE-95/01 resultou em maior produção de basidiomas, enquanto a linhagem LE-95/06 foi a menos produtiva.

O crescimento do fungo nas toras causa alterações em suas propriedades físicas, conforme observado após a sua inoculação com a linhagem LE-96/18, o que diminuiu a massa específica básica da madeira.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fernando Seixas (Esalq/USP) e ao Eng. Florestal e Agrônomo Rildo Moreira e Moreira (Horto Florestal de Itatinga, Estado de São Paulo) pelo fornecimento das toras de eucalipto.

Referências

ANDRADE, M.C.N. *Controle de fungos contaminantes no cultivo do cogumelo comestível shiitake (Lentinula edodes) em toras de eucalipto (Eucalyptus urophylla)*. 2003. Dissertação (Mestrado em Agronomia)–Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2003.

CAMPBELL, A.C.; RACJAN, M. The commercial exploitation of the white rot fungus *Lentinula edodes* (shiitake). *Int. Biodeter. Biodeg.*, Amsterdam, v. 43, p. 101-107, 1999.

CHANG, S.T.; MILES, P.G. *Edible mushrooms and their cultivation*. Boca Raton: CRC Press, 1989.

CHEN, A. W. What is shiitake? *In: Shiitake cultivation*. Korea: MushWord, 2005. cap. 1, p. 3-32.

LAHMANN, O.; RINKER, D.L. Historical development of commercial mushroom production in central and South America. *In: PROCEEDINGS PHASE OF A SHIITAKE (Lentinula edodes) CULTURE*, v. 3. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 221-40.

LEVANON, D. *et al.* Bulk treatment of substrate for the cultivation of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) on straw. *Biores. Technol.*, Essex, v. 45, p. 63-64, 1993.

MINHONI, M.T.A. *et al.* *Cultivo de Lentinula edodes (Berk.) Pegler - (Shiitake)*. 2. ed. Botucatu: Fepaf, 2005.

OEI, P. *Mushroom cultivation*. 3. ed. Netherlands: Backhuys Publishers, 2005.

PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J. *Shiitake grower's handbook: the art and science of mushroom cultivation*. Dubuque: Kendall, 1990.

SAN ANTONIO, J.P. Cultivation of the shiitake mushroom. *Hortscience*, Alexandria, v. 16, n. 2, p. 151-156, 1981.

TEIXEIRA, E.M. *Caracterização isoenzimática e molecular de Lentinula edodes e avaliação da produção em função da espécie de eucalipto e clima*. 2000. Tese (Doutorado em Biotecnologia)–Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

Received on November 17, 2005.

Accepted on August 08, 2006.