

# Crescimento micelial de dois isolados de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, em resíduos lignocelulósicos

Sandra Maria Gomes-da-Costa<sup>1\*</sup>, Ladislau Beims Coimbra<sup>2</sup> e Eraldo Schunck da Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.  
<sup>2</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. <sup>3</sup>Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: smgcosta@uem.br

**RESUMO.** Com a finalidade de verificar o crescimento micelial de dois isolados, 42 e 47, de *Lentinula edodes*, utilizaram-se os substratos: serragens de *Eucalyptus* sp., de *Grevillea robusta* e de *Melia azedarach*; resíduo de algodão e folhas de *Panicum maximum* em diferentes composições e suplementados com farelos de soja e de arroz. Verificou-se crescimento micelial por meio de medidas do raio avaliadas pela Análise de Dados Longitudinais. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística (Manova). O crescimento foi significativamente diferente ao longo do tempo e este influenciou marcadamente o comportamento dos isolados nos diferentes resíduos. Observaram-se quatro padrões de comportamento para o isolado 42 e cinco, para o 47. As serragens de *Eucalyptus* sp. e de *G. robusta* mostraram-se as mais propícias ao crescimento dos dois isolados de *L. edodes*, confirmando ser essa espécie essencialmente de hábito lignícola.

**Palavras-chave:** resíduo de algodão, serragens, shiitake.

**ABSTRACT.** Mycelial growth of two isolated strains of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler in lignocellulose residue. With the purpose of verifying the mycelial growth of two isolated strains of *Lentinula edodes* – 42 and 47 –, the following substrates were used: sawdusts of *Eucalyptus* sp, *Grevillea robusta* and *Melia azedarach*; cotton residue and leaves of *Panicum maximum*, in different compositions and complemented with crumbs of soy and rice. Mycelial growth was verified through radius measurements as evaluated by Longitudinal Data Analysis. The obtained data was submitted to statistical analysis (Manova). The growth was significantly different along time, and this influenced remarkably the behavior of the isolated strains in the different residues. Four patterns of behavior were observed for isolate 42, and five for number 47. The sawdusts of *Eucalyptus* sp and of *G. robusta* proved to be the most favorable for growing the two isolates of *L. edodes*, confirming this species to be essentially lignous.

**Key words:** cotton residue, sawdusts, shiitake.

## Introdução

Os fungos são utilizados pela humanidade há milhares de anos, como alimento e para fins medicinais e biotecnológicos (Chang e Miles, 2004). Hoje, o número total de espécies, conservativamente, é estimado em 1.500.000 e cerca de 1.700 novas espécies são descobertas a cada ano, compondo o segundo maior reino (Raven *et al.*, 2001).

Na sua maioria, os cogumelos, utilizados como alimento e medicamento, encontram-se dentro da classe dos Basidiomycetes (Bononi *et al.*, 1995), colocando *Agaricus* spp., *Lentinula* spp. e *Pleurotus* spp. como responsáveis por 69% da produção mundial (Ferreira, 1998). A produção e consumo de cogumelos comestíveis, no Brasil, aumentaram a partir da década de 70, pelas suas propriedades nutricionais e medicinais (Paula *et al.*, 2001).

Esses organismos têm a capacidade de produzir enzimas que degradam lignina, celulose e hemicelulose, convertendo-os em nutrientes para seu crescimento (Chang e Miles, 2004; Chen, 2005). A possibilidade de usar resíduos agroindustriais, como fonte de produção para cogumelos, gera oportunidade de reciclagem, conseqüentemente, benefícios ao ambiente. Desta forma, outras técnicas de cultivo são aplicadas, na tentativa de otimizar o tempo do processo de formação de basidiomas, baseando-se na experiência adquirida com o cultivo de outros cogumelos comestíveis e testando diversos substratos, à base de resíduos agroindustriais (Tratch e Keiser, 2004).

Conhecido como “shiitake”, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, de origem asiática, é considerado, pelos orientais, como “elixir da vida” pelos seus

valores nutricionais, paladar e propriedades medicinais, tais como efeitos benéficos nas doenças cardiovasculares, diminuição dos níveis de colesterol no sangue, ação supressora sobre os tumores carcinogênicos, estimulação da produção de interferon, ação como estabilizante na dieta da vitamina B, entre outros (Sasaki *et al.*, 2001; Ishikawa *et al.*, 2001). É uma espécie lignícola, com ampla distribuição, cujo cultivo tem aumentado aceleradamente nos últimos anos, ocupando o segundo lugar na produção mundial (Delpech e Olivier, 1991).

Considerando a expansão do cultivo de shiitake em locais diferentes do seu habitat natural, o crescimento da demanda do seu consumo e sua produção tradicional em troncos de *Eucalyptus* spp., há necessidade da investigação sobre a utilização de substratos alternativos de fácil disponibilidade e a introdução de novas técnicas para o cultivo que promovam rápido crescimento micelial. Visando acelerar o processo de desenvolvimento e produtividade do mesmo, este trabalho analisou o crescimento micelial de dois isolados de *L. edodes*, em diferentes resíduos vegetais, oriundos da região de Maringá, Estado do Paraná.

### Material e métodos

O crescimento dos isolados 42 e 47 de *L. edodes*, cedidos pela Coleção de Culturas do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, foi testado em sete substratos, com as seguintes composições: **A**: resíduo de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (casca do fruto + fibras + casca de sementes (80%) + farelo de soja (10%) + farelo de arroz (10%); **C 80%**: folhas de capim-colonião (*Panicum maximum* Jacq.) (80%) + farelo de soja (10%) + farelo de arroz (10%); **E 80%**: serragem de *Eucalyptus* sp. (80%) + farelo de soja (10%) + farelo de arroz (10%); **E 60%**: serragem de *Eucalyptus* sp. (60%) + resíduo de algodão (20%) + farelo de soja (10%) + farelo de arroz (10%); **G 80 %**: serragem de *Grevillea robusta* Cunn. (80%) + farelo de soja (10%) + farelo de arroz (10%); **G 60%**: serragem de *Grevillea robusta* Cunn. (60%) + resíduo de algodão (20%) + farelo de soja (10%) + farelo de arroz (10%); **SB 80%**: serragem de santa-bárbara (*Melia azedarach* Linn.) (80%) + farelo de soja (10%) + farelo de arroz (10%).

As folhas de capim-colonião e a serragem de santa-bárbara foram obtidas de podas, sendo secas ao sol, por três dias, e o resíduo de algodão, da Cooperativa Agroindustrial de Maringá (Cocamar). As demais serragens, fornecidas por madeireiras da região de Maringá, Estado do Paraná, passaram pelo mesmo processo de secagem, e os farelos de arroz e

soja, já secos, foram adquiridos de agroindústrias da mesma região. Os substratos foram triturados em partículas de tamanho  $1\text{ cm} \leq p \leq 0,5\text{ cm}$  e levados à estufa a 105°C, por 24 horas, para a obtenção do teor de umidade. Posteriormente, calculou-se a quantidade de água destilada a ser adicionada para se obter 70% de umidade, em cada substrato.

De cada substrato, pesaram-se 15 g que foram colocados em placas de Petri (9 cm de diâmetro), sendo o conjunto autoclavado a 121°C, por 90 min. Inoculou-se, no centro geométrico de cada placa de Petri, em câmara de fluxo laminar contínuo, um disco (9 mm de diâmetro) de meio de cultura BDA, previamente colonizado com o fungo. O material preparado manteve-se em estufa incubadora a  $25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$  e 75% de umidade relativa do ar, sendo exposto à luz fluorescente (emissão luz do dia), por 4 h dia<sup>-1</sup>. Para cada substrato, realizaram-se cinco replicatas. Para avaliação do crescimento micelial, usou-se gabarito, determinado na tampa da placa de Petri. Duas retas perpendiculares cujo ponto de cruzamento coincidia com o centro do inóculo. As medidas foram tomadas a partir da borda do disco do inóculo até o limite de crescimento do micélio. Em cada placa de Petri, tomaram-se quatro registros de crescimento por leitura (um em cada quadrante). Considerou-se, como ponto de partida, 72 horas após a inoculação, realizando-se medidas do raio micelial a cada três dias até que o substrato estivesse totalmente colonizado. O crescimento micelial total obteve-se diretamente das medidas do raio, e a taxa de crescimento micelial, pela diferença entre medidas consecutivas.

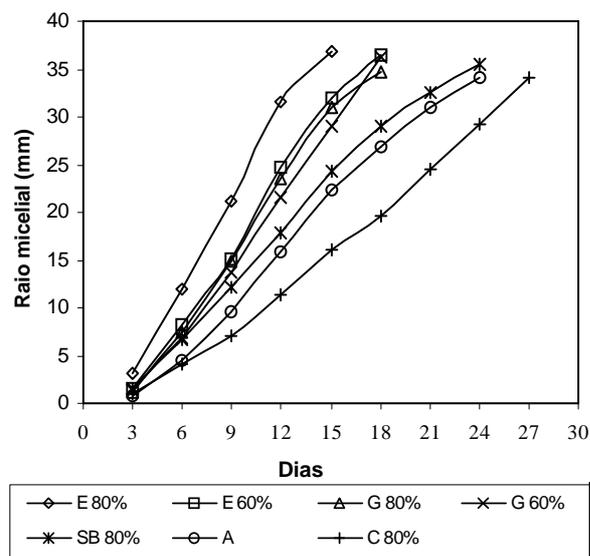
Avaliou-se o crescimento micelial, utilizando a análise de dados longitudinais (Andrade e Singer, 1986). Tomaram-se cinco medidas das repetições em todos os tratamentos, para cada condição de avaliação. Testaram-se as hipóteses de igualdade entre os tratamentos, influência do tempo e o comportamento dos tratamentos ao longo do tempo, para os dois isolados de *L. edodes*. Consideraram-se cinco momentos de medidas do crescimento micelial até o 15º dia, em todos os substratos, parâmetro este usado por causa da obtenção de total colonização, nesse período, em um deles. Para verificar se os isolados tiveram ou não o mesmo comportamento, em relação ao crescimento micelial, nos diferentes tratamentos, utilizou-se a Análise de Variância Multivariada (Manova), (Johnson e Wichern, 1982), para duas populações (linhagens 42 e 47), sete tratamentos de substratos e cinco repetições para comparações das médias. Entre os tratamentos, utilizou-se o teste de comparações

múltiplas de Scheffé, sendo utilizado nas análises nível de 5% de significância.

## Resultados

A análise do crescimento micelial do isolado 42 demonstrou que o substrato que proporcionou maior crescimento, em um menor tempo, foi E 80%, atingindo 36,8 mm de raio em 15 dias, seguido pelos substratos: E 60% (36,4 mm), G 60% (36,3 mm) e G 80% (34,7 mm), todos, em 18 dias. Em 24 dias, o crescimento micelial atingiu, em SB, 35,5 mm de raio e em A, 34,2 mm. Em C 80%, alcançou 34,2 mm, em 27 dias.

Os substratos E 60%, G 60% e G 80%, apresentaram crescimento micelial paralelo e coincidente. Os dados demonstraram que, em SB 80% e em A, o crescimento foi paralelo, mas não coincidente, significando que o comportamento foi igual em ambos, embora mais lento no A. Nos substratos E 80% e C 80% o crescimento do isolado 42 diferiu, significativamente, dos demais, sendo maior, no primeiro, e menor, no segundo. Portanto, foi possível observar quatro padrões de comportamento para este isolado (Figura 1).



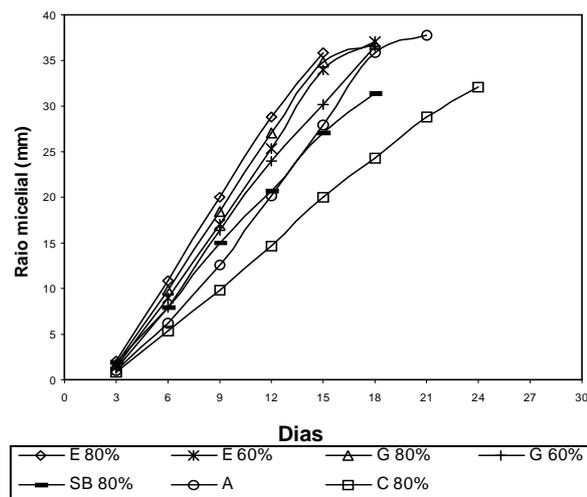
**Figura 1.** Crescimento micelial (mm) do isolado 42, em diferentes substratos.

O substrato que possibilitou maior crescimento do isolado 47 foi, também, E 80%, em que se alcançou 35,8 mm, em 15 dias de colonização, seguido pelos substratos E 60% (37,1 mm), G 80% (36,8 mm), G 60% (36,5 mm), todos, em 18 dias. Em A, o micélio cresceu 37,7 mm, em 21 dias, e em C 80%, atingiu 32,1 mm, em 24 dias. Em SB 80%, o raio micelial chegou a 31,4 mm, em 18 dias.

Os substratos de E 80% e G 80% proporcionaram

maior crescimento micelial, apresentando crescimento paralelo, mas não coincidente. O crescimento em E 60% e G 60% foi paralelo e coincidente. Assim, o isolado 47 demonstrou cinco comportamentos distintos: E 80% e G 80%; E 60% e G 60%; A; SB 80% e C 80%.

Os comportamentos diferenciados, observados na colonização dos diferentes substratos pelos dois isolados, ao longo do tempo (condições de avaliação), indicam que este interferiu, significativamente (Figuras 1 e 2).

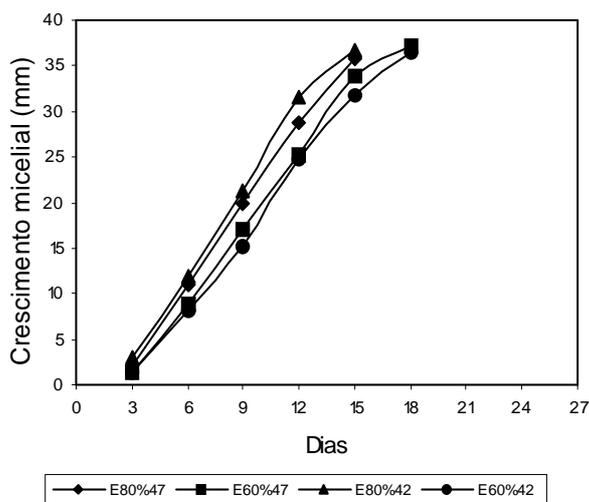


**Figura 2.** Crescimento micelial (mm) do isolado 47, em diferentes substratos.

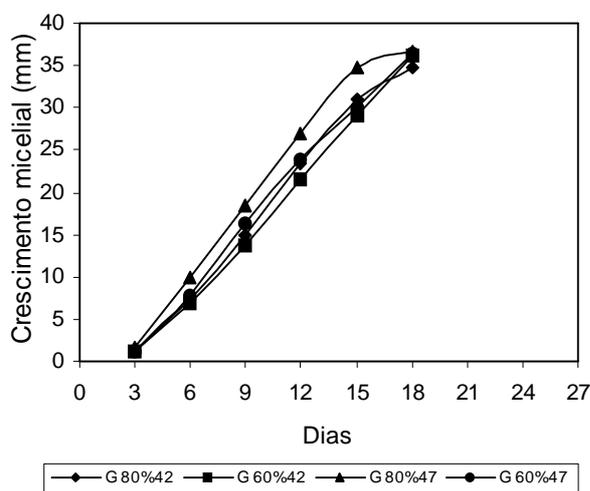
Para a comparação entre populações (isolados 42 e 47) dentro de cada substrato, a análise estatística de Lambda de Wilks (Johnson e Wichern, 1982) demonstrou que, para E 80%, E 60%, G 60% e SB 80, não ocorreram diferenças significativas ( $p > 0,01$ ) em relação ao crescimento micelial, e que os comportamentos dos isolados, em cada um destes substratos, ao longo do tempo, foram semelhantes (Figuras 3, 4 e 5). Constataram-se, entretanto, diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) para os demais substratos testados (G 80%, A e C 80%), observando-se melhor desempenho do isolado (Figuras 4 e 6).

Os substratos E 80 e 60% e G 80 e 60% proporcionaram melhor crescimento micelial dos dois isolados (Figuras 3 e 4). Os menores crescimentos de ambos os isolados foram verificados em SB 80%, A e C 80% (Figuras 5 e 6). Em relação aos isolados, o isolado 47 obteve crescimento mais rápido do que o isolado 42 em G 80% e em A, embora o micélio do 42 apresentou-se mais vigoroso.

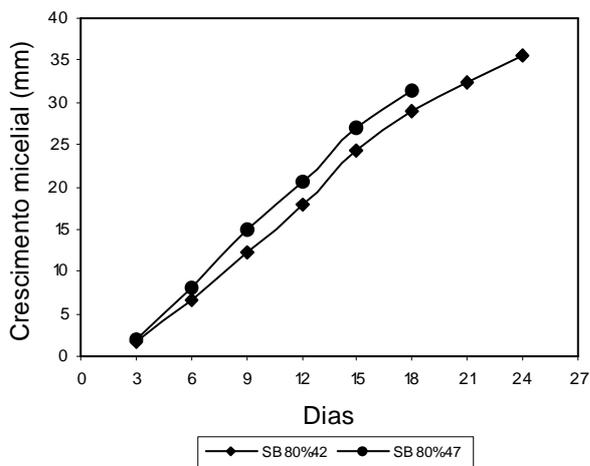
As maiores taxas de crescimento do isolado 42 foram observadas, por ordem decrescente, em E 80% > E 60% > G 80% > G 60% > SB 80% > A > C 80% (Tabela 1).



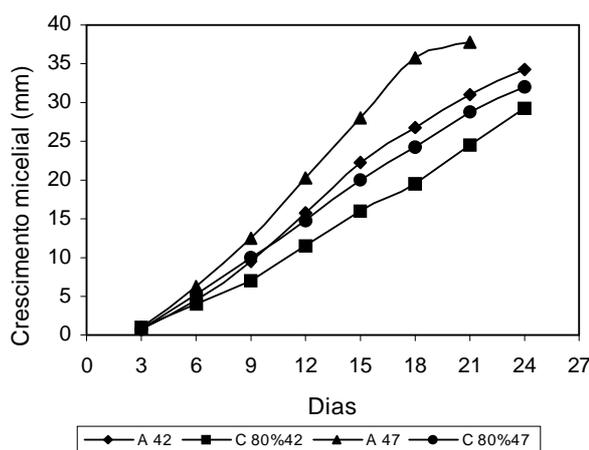
**Figura 3.** Comparativo dos dois isolados de *L. edodes*, nos substratos compostos por *Eucalyptus* sp.



**Figura 4.** Comparativo dos dois isolados de *L. edodes*, nos substratos compostos por *G. robusta*.



**Figura 5.** Comparativo dos dois isolados de *L. edodes*, nos substratos compostos por santa bárbara.



**Figura 6.** Comparativo dos dois isolados de *L. edodes*, nos substratos compostos por resíduo de algodão e capim-col ni o.

Nos substratos E 80%, E 60% e SB 80%, a taxa de crescimento 42 foi crescente nos seis primeiros dias de coloniza o, permanecendo relativamente constante por determinados períodos, dependendo do substrato. Em C 80%, a taxa de crescimento também foi crescente até o sexto dia, embora o comportamento do fungo tenha sido diferente daquele observado nos demais substratos, verificando-se flutua es na taxa de crescimento. Nos substratos G 80%, G 60% e A, o crescimento micelial comportou-se de forma semelhante ao observado nos substratos citados anteriormente, porém a taxa de crescimento foi crescente até o 12  dia de coloniza o.

**Tabela 1.** Média das medidas da taxa de crescimento micelial ( $\text{mm dia}^{-1}$ ) da linhagem 42 de *L. Edodes*, em diferentes substratos. Média e desvio padrão de cinco repeti es.

Dia	E 80%	E 60%	G 80%	G 60%	SB 80%	A	C 80%
3	3,1 (0,6)	1,5 (0,6)	1,2 (0,3)	1,3 (0,2)	1,6 (0,5)	0,8 (0,2)	0,9 (0,2)
6	8,9 (0,2)	6,6 (0,5)	6,2 (0,4)	5,6 (0,5)	5,0 (0,3)	3,7 (0,8)	3,2 (1,3)
9	9,3 (0,4)	6,9 (1,1)	7,5 (0,9)	6,8 (0,3)	5,5 (0,9)	5,0 (0,8)	3,0 (0,8)
12	10,4 (1,1)	9,6 (0,6)	8,6 (1,1)	7,9 (0,7)	5,7 (0,4)	6,2 (2,0)	4,2 (0,7)
15	5,2 (1,1)	7,3 (1,5)	7,5 (2,5)	7,5 (0,8)	6,5 (0,4)	6,5 (1,5)	4,6 (0,4)
18	-	4,5 (1,7)	3,7 (1,0)	7,2 (0,7)	4,6 (1,1)	4,6 (1,4)	3,5 (1,9)
21	-	-	-	-	3,5 (1,6)	4,1 (1,7)	5,1 (0,9)
24	-	-	-	-	3,0 (1,3)	3,3 (1,3)	4,7 (0,5)

E = serragem de *Eucalyptus* sp; G = serragem de *G. robusta*; SB = serragem de santa-bárbara; A = resíduo de algodão e C = folhas de capim-col ni o em p . Os valores 80 e 60% referem-se aos substratos sem e com resíduo de algodão, respectivamente.

As maiores taxas de crescimento do isolado 47 foram observadas, na mesma seq ncia da citada para o isolado 42, com exce o feita aos substratos SB 80% e A ( $E\ 80\% > E\ 60\% > G\ 80\% > G\ 60\% > A > SB\ 80\% > C\ 80\%$ ) (Tabela 2). Nos substratos E 80%, E 60%, G 80%, SB 80% e C 80%, observou-se taxa de crescimento crescente nos seis primeiros dias, permanecendo relativamente constante, em diferentes períodos, para cada substrato. No

substrato G 60%, obteve-se taxa de crescimento crescente até o 9º dia. No substrato A, a taxa de crescimento aumentou lentamente até o 12º dia.

**Tabela 2.** Média das medidas da taxa de crescimento micelial (mm dia<sup>-1</sup>) da linhagem 47 de *L. Edodes*, em diferentes substratos. Média e desvio-padrão de cinco repetições.

Dias	E 80%	E 60%	G 80%	G 60%	SB 80%	A	C 80%
3	2,1 (0,2)	1,4 (0,2)	1,7 (0,4)	1,2 (0,3)	1,9 (0,5)	1,1 (0,1)	0,8 (0,3)
6	8,8 (0,6)	7,6 (0,6)	8,1 (0,7)	6,7 (1,3)	6,1 (1,0)	5,1 (0,9)	4,5 (0,4)
9	9,1 (0,3)	8,0 (0,7)	8,6 (0,4)	8,5 (0,8)	6,9 (1,4)	6,4 (0,7)	4,6 (0,6)
12	8,8 (0,9)	8,3 (0,9)	8,6 (0,5)	7,5 (1,5)	5,8 (1,2)	7,6 (0,7)	4,8 (0,3)
15	7,0 (0,6)	8,7 (0,9)	7,7 (0,9)	6,1 (2,5)	6,3 (2,8)	7,7 (0,5)	4,9 (0,6)
18	-	3,1 (1,0)	2,0 (0,4)	6,4 (2,7)	4,4 (3,1)	7,9 (0,8)	4,7 (0,8)
21	-	-	-	-	-	2,0 (0,9)	4,5 (1,4)
24	-	-	-	-	-	-	3,3 (1,2)

E = serragem de *Eucalyptus* sp; G = serragem de *G. robusta*; SB = serragem de santa-bárbara; A = resíduo de algodão e C = folhas de capim-colonião em pó. Os valores 80 e 60% referem-se aos substratos sem e com resíduo de algodão, respectivamente.

Verificou-se diminuição da taxa de crescimento de ambos os isolados em E 80%, E 60%, G 80%, SB 80% e A, por causa do final da colonização dos substratos. Em C 80%, esse decréscimo foi verificado somente para a linhagem 47. Em G 60%, no entanto, o comportamento dos dois isolados foi semelhante, mas a taxa de crescimento passou a ser constante, não se verificando a redução.

## Discussão

Foi empregada, para analisar o crescimento micelial, a Análise de Dados Longitudinais, que consiste em investigações científicas, em que o interesse é avaliar o comportamento de uma ou mais variáveis-respostas ao longo de uma dimensão específica. De modo geral, essa análise envolve observações de um conjunto de unidades de investigação, neste caso, o fungo, classificados em diferentes subpopulações segundo um ou mais fatores, ou tratamentos sendo, neste, diferentes substratos, ao longo de diversas condições de avaliação, como o tempo que representam as unidades de observações. Essa técnica estatística apresenta vantagens, pois dispõe de condições adequadas para o controle de fatores secundários que podem influenciar na resposta, partindo da avaliação de respostas individuais e da produção de estimadores mais eficientes (Andrade e Singer, 1986).

As espécies de *Lentinula* são, por natureza, degradadoras de madeira. Juntamente com outros basidiomicetos, que atacam os polissacarídeos das paredes celulares dos tecidos vegetais, formam um grupo denominado “fungos de podridão branca”, pois degradam tanto a lignina quanto a celulose e hemicelulose presente no substrato (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Aproximadamente 50-60% do peso seco da

madeira são constituídos de celulose, 10 - 30% de hemicelulose e de 20-30% de lignina. Destes compostos, a lignina possui estrutura mais complexa e, ainda, não totalmente desvendada. As ligações presentes nesta molécula são altamente resistentes à degradação química e são poucos os organismos capazes de utilizá-la para a sua nutrição. O ataque inicial da lignina é feito pelos fungos de podridão branca, através da enzima lacase (Cavallazzi *et al.*, 2005). Não se conhece exatamente o mecanismo de ação desta enzima, e nem mesmo como o fungo utiliza as substâncias resultantes para a sua nutrição. Segundo Rajarathnam e Bano (1987), a produção de lacase e consequente degradação da lignina é maior durante a fase de colonização do substrato pelo micélio.

O uso de substratos variados na produção de fungos é limitado quando, em sua composição, inibe ou estimula a secreção de celulases, hemicelulases e ligninases para a liberação de nutrientes necessários ao crescimento (Buswell *et al.*, 1996). Desta forma, a suplementação com farelos, compondo os substratos, pode promover sua rápida colonização (Rossi *et al.*, 2001).

De forma geral, observou-se que os substratos constituídos por serragens foram colonizados mais rapidamente, exceção feita à serragem de santa-bárbara, quando comparados ao resíduo de algodão e folhas de capim-colonião.

Considera-se, hoje, mais de 100 diferentes cepas de Shiitake, assim, podendo ocorrer grande variação na adaptação destas quanto ao ambiente do seu desenvolvimento (Campbell e Racjan, 1999).

As diferenças, observadas no crescimento e comportamento dos isolados de *L. edodes*, nos diferentes substratos testados, provavelmente se devam à composição química dos mesmos e às diferenças fisiológicas dos isolados.

## Conclusão

Os substratos compostos por serragens de *Eucalyptus* sp. e de *G. Robusta*, proporcionaram melhor crescimento micelial dos dois isolados de *L. Edodes*, sendo mais rápido para o isolado 42, confirmando ser essa espécie essencialmente de hábito lignícola.

Substratos, compostos por resíduo de algodão e por folhas de capim-colonião, constituem resíduos alternativos para o cultivo de *L. edodes*, apesar de o crescimento ser mais lento, provavelmente por conter menor quantidade de lignina.

## Referências

ALEXOPOULOS, C.J. *et al. Introductory mycology*. 3. ed. New York: John Wiley and Sons, 1996.

- ANDRADE, D.F.; SINGER, J.M. *Análise de dados longitudinais*. Campinas: Unicamp, 1986.
- BONONI, V.L.R. et al. *Cultivo de cogumelos comestíveis*. São Paulo: Ícone, 1995.
- BUSWELL, L.A. et al. Ligninolytic enzyme production and secretion in edible mushroom fungi. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MUSHROOM BIOLOGY AND MUSHROOM PRODUCTS, 2., 1996, University Park. *Proceedings...* University Park: Pennsylvania State University, 1996. p. 113-122.
- CAMPBELL, A.C.; RACJAN, M. The commercial exploration of the white rot fungus *Lentinula edodes* (Shiitake). *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, Barking, v. 43, p. 101-107, 1999.
- CAVALLAZZI, J.R.P. et al. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, n. 36, p. 383-387, 2005.
- CHANG, S.T.; MILES, P.G. *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. 2. ed. Shu-Ting Chang: CRC Press, 2004.
- CHEN, A.W. What is Shiitake? In: MUSHROOM Grower's Handbook 2. Seoul: MushWorld, 2005. p. 3-16.
- DELPECH, P.; OLIVIER, J.M. Cultivation of Shiitake on straw based pasteurised substrates. In: MAHER, M.J. (Ed.). *Science and cultivation of Edible fungi*. Rotterdam: Balkema, 1991. p. 523-527.
- FERREIRA, J.E.F. *Produção de cogumelos*. Guaíba: Ed. Agropecuária, 1998.
- ISHIKAWA, N.K. et al. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, v. 32, p. 206-210, 2001.
- JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. *Applied multivariate statistical analysis*. New Jersey: Prentice-Hall, 1982.
- PAULA, D.P. et al. Viabilidade econômica do cultivo de shiitake em diferentes escalas de produção. *Sci. Agric.*, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 431-436, 2001.
- RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. *Pleurotus* mushrooms. Part IA. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. *Food Science and Nutrition*, Philadelphia, v. 26, n. 2, p.157-223, 1987.
- RAVEN, P. et al. *Biologia vegetal*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- ROSSI, I.H. et al. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. *Pesq. Agropecu. Bras.*, Brasília, v. 36, n. 6, p. 887-891, 2001.
- SASAKI, M. et al. MAGE-E1: A new member of the melanoma-associated antigen gene family and its expression in human glioma. *Cancer Res.*, Baltimore, v. 61, p. 4809-4814, 2001.
- TRATCH, R.; KEISER, G.S. Avaliação de isolados de *Lentinula edodes* (Berk) Pegler (shiitake) em diferentes substratos. *Rev. Acad. Cienc. Agr. Amb.*, Curitiba, v. 2, n. 4, p. 11-14, 2004.

Received on July 06, 2007.

Accepted on February 11, 2008.