

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

FLORIANÓPOLIS - SC  
ABRIL DE 1997

R 175  
Ex.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE SEMENTE - INÓCULO DE *Lentinula edodes*  
(SHIITAKE)**

Relatório de estágio curricular apresentado  
à Universidade Federal de Santa Catarina  
pelo acadêmico RODOLFO MORICONI  
FREIRE como uma das exigências do  
curso para obtenção do grau de Eng<sup>o</sup>  
Agrônomo.

Orientador: ELIANE MORETTO

Supervisor: AUGUSTO FERREIRA DA EIRA

Florianópolis - SC  
abril de 1997

53657

## IDENTIFICAÇÃO

**TÍTULO:** PRODUÇÃO DE SEMENTE - INÓCULO DE *Lentinula edodes*  
(SHIITAKE)

**LOCAL:** Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP/BOTUCATU  
(Departamento de Defesa Fitossanitária - Área de Biotecnologia e  
Microbiologia Agrícola) no MÓDULO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS  
(MCC)

**PERÍODO:** 05 DE AGOSTO A 05 DE SETEMBRO DE 1996

**ORIENTADOR:** Prof.<sup>a</sup> ELIANE MORETTO (Departamento De  
Tecnologia de Alimentos - CCA - UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA)

**SUPERVISOR:** Prof.<sup>o</sup> AUGUSTO FERREIRA DA EIRA  
(UNESP/BOTUCATU)

**BANCA EXAMINADORA:**

ELIANE MORETTO

LUCIANO GONZAGA

MARCOS KRIEGER

## APRESENTAÇÃO

O estágio foi realizado durante o período de 05 de agosto a 05 de setembro de 1996 no Módulo de Cogumelos Comestíveis - FCA/UNESP/Botucatu - com orientação do Prof. Augusto Ferreira da Eira (Professor Titular Coordenador dos Projetos) e acompanhamento da equipe técnica.

A partir de 1986, foi criado o Módulo de Cogumelos Comestíveis, no Departamento de Defesa Fitossanitária, área de Biotecnologia e Microbiologia Agrícola da Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA) - UNESP/Botucatu, administrado pela FEPAF (Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais).

O Módulo de Cogumelos Comestíveis desenvolve pesquisas sobre a produção de semente de cogumelos comestíveis e seu cultivo, voltado para condições brasileiras, e repassa a tecnologia para produtores através de cursos, palestras e publicações de apostilas.

Além da pesquisa o Módulo produz semente para comercialização, assim como, cultiva cogumelos, produz equipamentos e toras já inoculadas também para comercialização.

## JUSTIFICATIVA

A crescente demanda de alimentos naturais como alternativa para assegurar uma alimentação saudável é fato atualmente. Neste caso o shiitake apresenta-se como uma boa alternativa, sendo um alimento saboroso que pode ser cultivado naturalmente e possuindo propriedades terapêuticas.

Segundo TATEZAWA (1992) descobertas recentes mostraram que o shiitake apresenta elevados teores de proteínas da mais alta qualidade, fibras dietéticas, vitaminas, sais minerais além de sua atuação farmacêutica como regulador da hipertensão, possuindo propriedades preventivas da gripe e dos processos cancerígenos.

Desta forma o cultivo deste cogumelo tem aumentado, aliado também a fatores de cultivo como: baixos investimentos e pequenos espaços necessários, ajudando como mais uma atividade na propriedade.

Nesse sentido, a produção de semente-inóculo (“spawn”) para atender esta demanda, é mais uma atividade alternativa para atuação do Engenheiro Agrônomo.

Neste sentido, veio o interesse de realizar o estágio com produção de semente-inóculo de cogumelos “shiitake”, junto a Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP/Botucatu (Departamento de Defesa Fitossanitária - Área de Biotecnologia e Microbiologia Agrícola) no MÓDULO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS COGUMELOS .....	3
2.2 SELEÇÃO DE MATRIZES .....	8
2.3 OBTENÇÃO DE MATRIZES.....	10
2.4 CONSERVAÇÃO DA MATRIZ PRIMÁRIA:.....	14
2.5 MATRIZ SECUNDÁRIA .....	15
2.6 PRODUÇÃO DE SEMENTE-INÓCULO (“SPAWN”).....	15
2.7 TIPOS DE INÓCULO (SEMENTE).....	16
2.7.1 CAVILHA .....	17
2.7.2 SERRAGEM .....	17
2.7.3 OUTROS TIPOS DE SEMENTE .....	19
2.8 MEIOS DE CULTURA.....	22
2.9 EMBALAGENS.....	23
2.10 INSTALAÇÕES.....	24
2.11 CONSERVAÇÃO .....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1 PRODUÇÃO DE MATRIZES .....	26
3.2 SUBSTRATO PARA SEMENTE.....	28
3.3 PRODUÇÃO DE MATRIZ SECUNDÁRIA.....	29
3.4 PRODUÇÃO DA SEMENTE (“SPAWN”).....	29
3.5 INSTALAÇÕES.....	30
3.6 EMBALAGENS.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
5. CONCLUSÃO .....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo de cogumelos é comum em grande parte do mundo. Em muitos países europeus, por exemplo, são comuns excursões às matas para coleta de cogumelos utilizados na preparação de pratos, em finais de semana ou férias (BONONI *et al*, 1965). Já em países orientais o consumo de cogumelos é regular, existindo uma grande variedade de pratos utilizando cogumelos. Desta forma gerou-se a necessidade de cultivo de cogumelos.

Os cogumelos mais cultivados são o *Agaricus bisporus* e o *Lentinula edodes*. Segundo ZADRAZIL (1983) *in* EIRA *et al* (1996) o gênero *Agaricus* representava 70% da produção mundial em 1983, enquanto o *Lentinula* cerca de 14%. Este último tendo sua produção dobrada na década entre 1983 e 1993 (FERMOR, 1993 *in* EIRA *et al*, 1996).

O cogumelo *Lentinula edodes* é conhecido como shiitake, cogumelo japonês, cogumelo da floresta e também cogumelo chinês. Registros indicam a China como primeiro a cultivar este cogumelo, perto do ano 1100 D.C., sendo mais tarde introduzido no Japão. Atualmente o Japão é o maior produtor, com mais de 130.000 toneladas por ano.

Segundo Tatzawa (UNGARETTI, 1995) o shiitake desembarcou no ocidente a alguns anos, conquistando paladares mais exigentes nos EUA e em alguns países da Europa, chegando no Brasil no início da década de 90, através de descendentes de origem japonesa.

A partir do momento em que o shiitake começou a ser cultivado, foi necessário desenvolver maneiras de propagar o fungo, para que ele podesse ser inoculado no substrato de cultivo. Segundo QUIMIO *et al* (1990) o primeiro tipo de inóculo foi obtido de suspensão de esporos, o qual era

colocado em furos feitos em toras. Depois desta etapa, a produção de semente-inóculo evoluiu bastante, baseada no conhecimento do ciclo de vida dos fungos aliado às necessidades de cultivo.

PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE (1990) e EIRA *et al* (1996) citam a produção de semente-inóculo (spawn) utilizando como substrato a serragem ou a cavilha, como sendo os meios mais utilizados na produção de semente de *Lentinula edodes*.

O presente trabalho teve por objetivo buscar uma forma de produção de semente-inóculo de *Lentinula edodes*, visando o cultivo tradicional em toras de *Eucalipto*, tendo em vista uma semente com boa produção em condições climáticas de Santa Catarina.



## **2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS COGUMELOS**

O termo cogumelo, em português, pode ser utilizado como sinônimo de fungo, sendo, de modo geral, usado para designar um tipo macroscópico e que tem a forma de guarda-chuva (BONONI *et al*, 1995).

Os fungos constituem um grupo de seres vivos com grande variedade de formas, cores e tamanhos. Há os que são unicelulares e microscópios e os que chegam a ter mais de um metro de diâmetro (BONONI *et al*, 1995).

São organismos eucariontes, aclorofilados e aeróbios. Todos os fungos são heterotróficos, podendo ser saprófitos, parasitas ou simbiontes, mas as substâncias nutritivas são sempre assimiladas por absorção após terem sido parcialmente degradadas por enzimas extracelulares. São divididos em dois grandes grupos, os unicelulares ou leveduras e os pluricelulares ou bolores (RAVEN, EVERT & CURTIS, 1978 *in* BEUX, 1995).

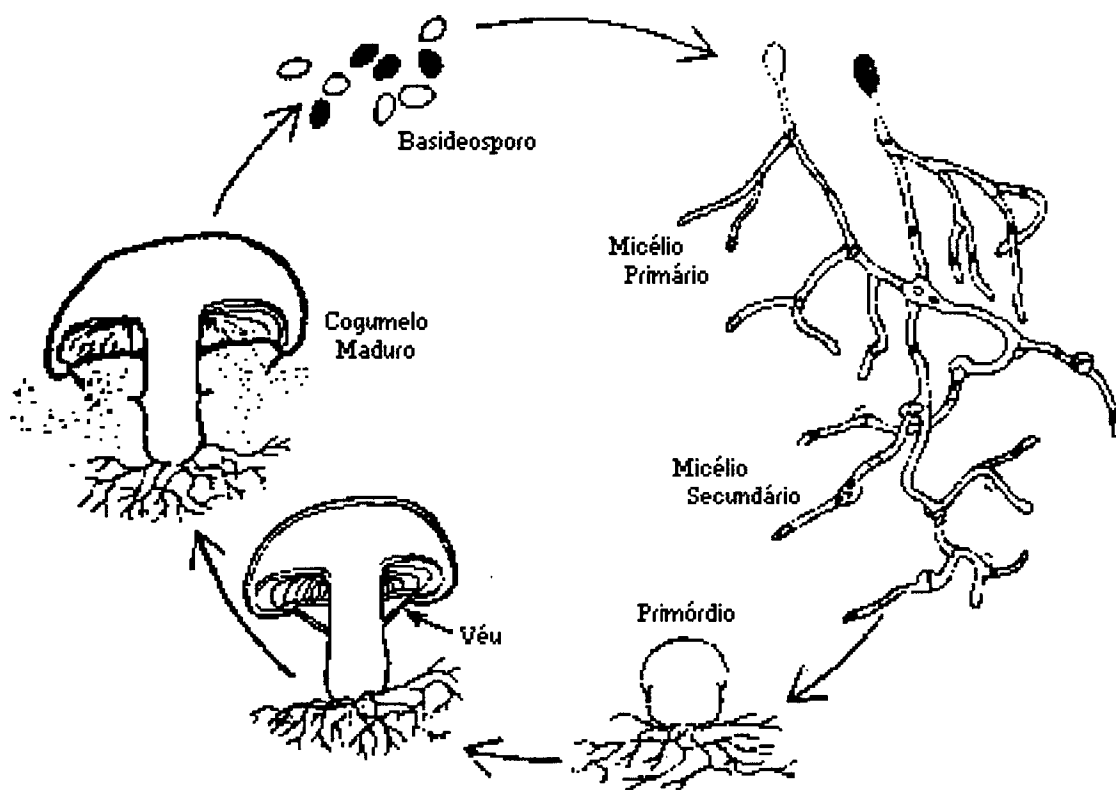
Os fungos reproduzem-se sexuadamente por intermédio de esporos ou assexuadamente (reprodução vegetativa), pela multiplicação de qualquer fragmento do corpo de frutificação ou do micélio (BONONI *et al*, 1995).

A reprodução sexuada inicia-se pela germinação do esporo originado das basídias localizada nas lamelas sob o chapéu, produzindo filamentos denominados de hifas. Primeiro são multinucleadas, mas logo formam-se septos tornando-as mononucleadas. As hifas multiplicam-se no solo ou sobre outro substrato, ou ainda no laboratório, em meio de cultura, formando

o micélio. Pela união de duas hifas de sexualidade diferente mas compatíveis entre si, forma-se o micélio secundário (binucleado), onde ocorre o pareamento dos nucléolos de hifas diferentes e, mais tarde e sob condições ambientais favoráveis, forma-se o micélio terciário que dará origem aos basídios onde ocorre a fusão nuclear, sendo este processo denominado de cariogamia e posteriormente seguido pela meiose que originará os basidiósporos (EIRA et al, 1996). (Fig.1)

O cogumelo é, portanto, um corpo de frutificação com forma característica para cada espécie, formado por diferenciações morfológicas e fisiológicas do micélio. Segundo CHANG & MILES (1989) **apud** BEUX (1995), a formação do micélio terciário (corpo de frutificação) está normalmente condicionada à variação de fatores físicos como decréscimo de temperatura e aumento de umidade.

FIGURA 1: Ciclo de vida do shiitake



Fonte: PRZYBYLOWICZ & DONOGUE (1990)

O cogumelo é formado pelo estipe ou pé e um chapéu denominado píleo. Na superfície inferior do píleo, voltada para o solo, encontra-se em tecido diferenciado, o himênio, formado por lamelas, poros ou tubos através dos quais há a liberação dos esporos (BONONI *et al*, 1995).

Após os fungos serem enquadrados entre os vegetais durante muitos anos, chegou-se à definição que é hoje aceita e que os coloca num reino à parte dos vegetais e animais, denominado de Reino Fungi. Este reino é subdividido em cinco Classes: Chytridiomycetes, Oomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes e Basidiomycetes (BEUX, 1995).

Acredita-se hoje que existam cerca de 200.000 espécies diferentes de fungos, distribuídas na natureza nos diferentes ambientes (BONONI *et al*, 1995).

“São conhecidas cerca de 600 espécies comestíveis, no entanto apenas algumas são comercialmente cultivadas. A grande maioria destas espécies, pertence à Classe dos Basidiomycetes, fungos filamentosos comumente conhecidos como basidiomicetos ou cogumelos. Entre estas apenas o *Agaricus*, o *Lentinula*, o *Pleurotus*, o *Flammulina* e o *Volvvariella* alcançaram níveis de produção mundial como alimento” (CHANG & MILES, 1989 *apud* BEUX, 1995). No Brasil apenas as três primeiras espécies são cultivadas comercialmente.

Segundo ZADRAZIL (1983) *apud* EIRA *et al* (1996) a espécie *Agaricus bisporus* representa 70% da produção mundial e a espécie *Lentinula edodes* cerca de 14%. Esta última conhecida como shiitake, cogumelo japonês, cogumelo da floresta, cogumelo chinês (ZADRAZIL & GRABBE, 1983 *in* EIRA *et al*, 1996) teve sua produção dobrada na década entre 1983 e 1993 (FERMOR, 1993 *in* EIRA *et al*, 1996).

FERRI (1985) **apud** BEUX (1995) caracteriza morfológicamente o basidiocarpo do *Lentinula edodes* da seguinte maneira: o píleo apresenta forma convexa, circular ou reniforme, com 5 cm de diâmetro e de bordas onduladas na maturidade; a coloração da epiderme superior varia de acarelado à marrom-escuro e o himênio é de cor creme.

As lamelas do *Lentinula edodes* são aderidas ao estipe. O estipe é cilíndrico de 3 cm à 7 cm de comprimento e 8 mm à 15 mm de diâmetro, posicionado central ou excêntrica ao píleo, não possui volva nem véu, restos da membrana que cobre certos basidiocarpos (PEGLER, 1983 **apud** BEUX, 1995).

A reprodução assexuada ou vegetativa ocorre por multiplicação de qualquer fragmento do cogumelo, quando sobre um substrato favorável e condições ambientais adequadas, principalmente em relação à umidade e à temperatura (BONONI, 1995).

A classificação atual do shiitake (*Lentinula edodes* Pegler, 1970) segundo STAMETS (1993) **apud** BEUX (1995):

Reino:	Fungi
Divisão:	Mycota
Classe:	Basidiomycetes
Sub Classe:	Holobasidiomycetidae
Ordem:	Agaricales
Família:	Tricholomataceae
Gênero:	<i>Lentinula</i>
Espécie:	<u><i>Lentinula edodes</i></u> Pegler, 1970

Segundo PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE (1990) *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler é o nome científico para shiitake. “(Berk)” é a abreviatura de Berkeley, primeiro a descrever a espécie, mas em gênero diferente. Pegler foi quem colocou a espécie no gênero *Lentinula*. Na literatura encontra-se pelo menos quinze sinônimos para *L. edodes*.

O cultivo de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, conhecido por “shiangu” na China e “shiitake” no Japão, foi originado na China entre o ano de 1000 a 1100 D.C. Nesta época apareceram os primeiros cultivos na região montanhosa da China, localizado nas Províncias de Llung-Chyan, Ching-Yuan e Jung-Ning. Alguns autores acreditam que as técnicas de cultivo desenvolvidas na China foram mais tarde introduzidas no Japão, hoje o maior produtor de *L. edodes* (QUIMIO, CHANG & ROYSE, 1990).

O hábitat natural deste cogumelo compreende a zona temperada do Nordeste Asiático, onde ocorre em troncos de madeira de árvores decíduas, principalmente do gênero *Quercus* spp. (BONONI et al, 1995).

TABELA 1: Terapêutica e valor nutritivo do Shiitake:

Substância nutritiva	Terapêutica	Órgão de pesquisa
Lentinan	Tumores Inibição do câncer	Centro Nacional de Cancerologia, Faculdade de Medicina de Kobe, Faculdade de Medicina de Mie, Faculdade Feminina de Farmácia de Kobe, Universidade de Medicina de Tohoku, Faculdade de Medicina de Toyama
Ácido ribonucléico	Interferon (inibe o vírus) Impede a multiplicação do vírus da gripe	Faculdade de Medicina de Kobe, Universidade de Tohoku, Universidade de Michigan (EUA)
Ertadenin	Abaixa o nível de colesterol e estabiliza a pressão arterial	Centro Nacional de Pesquisas de Saúde, Centro Nacional de Nutrição, Universidade de Tohoku, Universidade da Califórnia (EUA)
Glicoproteína	Impede a multiplicação do vírus da AIDS	Universidade de Yamaguchi
Proteína básica	Impede a infecção por vírus	Universidade de Ibaragi
Ergosterol	Transforma-se em vitamina D e acelera o crescimento do osso	Centro Nacional de Pesquisas de Saúde e outros órgãos
Lentionin	Aroma	Universidade Feminina Ocha-no-mizu
Guanylic acid	Condimentos (sabor)	Universidade Feminina Ocha-no-mizu

Fonte: TATEZAWA (1992)

O interesse pela produção de *Lentinula edodes* não é apenas pelo sabor característico muito apreciado na culinária mundial, mas também pelo seu valor nutricional e medicinal (TATEZAWA, 1992).

No Japão e na China o shiitake tem sido exaltado como o alimento da longevidade desde a antiguidade. Descobertas recentes no campo da ciência mostraram que o shiitake apresenta elevados teores de proteínas de mais alta qualidade, fibras dietéticas, vitaminas, sais minerais além de sua atuação farmacêutica como regulador da hipertensão, possuindo propriedades preventivas da gripe e dos processos cancerígenos (TATEZAWA, 1992), conforme Tabela 1.

Com relação ao cultivo do shiitake, Tatezawa (UNGARETTI, 1995) garante que as exigências são mínimas: requer pouco espaço (apenas um local sombreado), para 2.000 troncos são suficientes 70 m<sup>2</sup> (EIRA et al, 1996), e se adapta aos climas tropical e subtropical. Além disso, por ser de fácil manejo, pode ser conduzido paralelamente à atividade principal da propriedade.

Desta forma a produção de shiitake (*Lentinula edodes*) se torna uma alternativa a mais na propriedade, dispondo de baixos investimentos. Isto já é realidade para 90 produtores do extremo oeste de Santa Catarina, projeto encabeçado pelo Sindicato dos Trabalhadores Rurais dos Municípios, com previsão de ampliar para 350 produtores (PAIM, 1997).

## **2.2 SELEÇÃO DE MATRIZES**

A linhagem utilizada aliada aos nutrientes do substrato são os principais fatores na determinação da qualidade do inóculo. A falta de uma seleção prévia acarreta uma frutificação insatisfatória (BEUX, 1995).

A seleção deve se basear nas condições do ambiente no local de cultivo. Linhagens melhor adaptadas influem em diferentes aspectos: taxa de crescimento, resistência a competição de outros fungos, propensão a frutificação, temperatura ótima para frutificação e qualidade do cogumelo (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).

A temperatura ótima para frutificação se divide em linhagens de calor (10° - 27°C), produzindo melhor no verão; linhagens de frio (7° - 16°C), produzindo em condições de inverno, onde a frutificação geralmente é mais lenta devido a redução do metabolismo; e linhagens adaptadas ao calor e temperaturas mais amenas, assim como, adaptadas ao frio tolerando temperaturas mais altas (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). Deve-se ressaltar que estes tipos de linhagens são descritas para países do hemisfério norte, no caso de países com clima tropical e subtropical a procura de linhagens adaptadas é imprescindível.

A qualidade do cogumelo é baseada no tamanho, forma e espessura do píleo e haste, intensidade do aroma e sabor, densidade da polpa e umidade do cogumelo fresco (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). Muitos destes fatores dependem da linhagem, ou seja, da genética desta linhagem, mas também existe a influência das condições ambientais durante a frutificação. Um exemplo disto seria a coloração meio escura ou clara, influenciada pela intensidade de luz durante a frutificação.

Quanto à taxa de crescimento o shiitake apresenta características de tempo para a colonização da tora e tempo necessário desde a inoculação até a frutificação. Linhagens agressivas são interessantes porque colonizam rapidamente o substrato (tora) e reduzem a possibilidade de contaminação. Porém, a velocidade de colonização não é diretamente relacionada com o tempo até a frutificação. Linhagens de rápida frutificação tendem a ter

colonização agressiva, embora algumas tenham longo período de incubação (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).

No cultivo comercial, onde a incubação se dá em temperatura ambiente não controlada, a linhagem ideal deve ser adaptada a este ambiente, tendo em vista o mercado consumidor que determina a qualidade do cogumelo.

A matriz depois de ser selecionada deve passar por análises laboratoriais, verificando-se o crescimento radial das hifas em placas de Petri, segundo SCHIMIDT & DITTBERNER (1989), TAN & CHANG (1989), OHGA (1990) e SOCCOL (1994) **apud** BEUX (1995).

### **2.3 OBTENÇÃO DE MATRIZES**

A obtenção das matrizes pode ser através de laboratórios especializados. EIRA **et al** (1996) cita algumas cepas encontradas a nível mundial:

- ⇒ Cepa #465 do Instituto Amori (JAPAN) (ATCC #58742) (BADHOM, 1988);
- ⇒ Cepas do Yamamoto Mycological Research Laboratory, Shiitake Society of Japan (ITAVAARA, 1989);
- ⇒ Cepas do Horticultural Research Institute of Ontario Mushroom Culture Collection (RINKER, 1991);
- ⇒ Cepas do Elisc Corporation of Arvonía, Virginia (VAN, 1989).

Para implementar a produção de inóculo (semente), o laboratório deve produzir linhagens próprias, adaptadas a região onde será cultivada. Estas linhagens devem ser isoladas de basidiocarpos existentes em propriedades locais (EIRA **et al**, 1996).



As matrizes podem ser obtidas através de fragmento de basidiocarpos (micélio dicariótico terciário). Segundo EIRA *et al* (1996), esta técnica tem o objetivo de evitar a recombinação genética e manter as características do fungo selecionado, além de manter o poder de frutificação.

O corpo de frutificação ou cogumelo selecionado deve ser muito bem lavado com água destilada. Em câmara de fluxo laminar o basidiocarpo é partido manualmente e da parte interna são retirados fragmentos de 2 a 5 mm (milímetros) com um escalpelo ou alça de platina, colocando-se então no centro do meio de cultura do tubo de ensaio (EIRA *et al*, 1996).

A inoculação é feita em tubos devido a algumas vantagens: a probabilidade de contaminar é menor do que se fossem utilizadas placas de Petri, devido a maior área de trocas gasosas; tem-se uma economia de meio, pois em placas recomenda-se 20 ml (vinte mililitros) enquanto no tubo coloca-se 5 ml (cinco mililitros) e qualquer problema de contaminação perde-se menos meio; e o espaço físico para incubar e armazenar é menor (EIRA *et al*, 1996).

Estas operações devem ser realizadas com muito cuidado e rapidez para evitar contaminações. Deve-se utilizar meio previamente esterilizado, bem como câmara de fluxo laminar, bico de Bunsen e álcool que são utilizados para flambar todos os materiais (pinças, alças, tubos de ensaio com meio inclinado antes e depois de abri-los, durante o processo de transferência de micélio para o meio de cultura) (EIRA *et al*, 1996).

Deve-se inocular o máximo de tubos possíveis, de 30 a 40 tubos, os quais são incubados a 25°C por aproximadamente 15 dias. Durante este período deve-se fazer uma seleção, retirando tubos contaminados com outros fungos e bactérias. Também deve-se dar preferência ao micélio rizomórfico, apresentando um crescimento vigoroso e ramificado (EIRA *et*

al, 1996). Os tubos que apresentarem o crescimento muito lento também devem ser descartados.

Quando o meio estiver totalmente tomado pelo micélio do fungo (*Lentinula edodes*) a matriz esta pronta para produção da matriz secundária ou para ser armazenada.

Segundo EIRA et al (1996) quando se utiliza fragmentos de basidiocarpos, recomenda-se o uso de estreptomicina na dosagem de 20 mg/l, para evitar possíveis contaminações por bactérias, quando faz-se isolamento em placa de Petri. O sulfato de estreptomicina deve ser diluído em 5 ml de água destilada esterilizados, em seguida é adicionado ao meio de cultura esterilizado antes de verter nas placas de Petri.

Após a esterilização aguardar que a temperatura baixe até que seja tolerado pela mão, e verter aproximadamente 20 ml do meio em placas de Petri previamente esterilizada (BONONI et al, 1995). Após a solidificação, as placas deverão ser invertidas para evitar qualquer tipo de contaminação do meio. Esta operação deve ser realizada com o máximo de assepsia, onde recomenda-se a utilização de bico se Bunsen para flambar as bordas dos frascos e das placas antes de abrí-los, devendo ser realizado o mais rápido possível, sempre em câmara de fluxo laminar (EIRA et al, 1996).

Para tubos de ensaio, coloca-se 5 ml de meio de cultura previamente fundido com auxílio de uma pipeta esterilizada, veda-se com algodão, cobre-se com papel sulfite e esteriliza-se em autoclave por 15 minutos a 121°C e, em seguida, deixa-se os tubos em posição inclinada para solidificar (EIRA et al, 1996).

A produção de matriz a partir de esporos (isolamento monospórico e/ou multiespórico) requer uma série de testes de qualidade e capacidade de colonizar o substrato antes de se produzir a semente (“spawn”) para

comercialização, devido a recombinações genéticas que ocorrem neste tipo de reprodução (EIRA et al, 1996).

Segundo EIRA et al (1996) o isolamento utilizando a técnica de multiesporos (suspensão de esporos) pode ser usada na produção de semente de Shiitake (*Lentinula edodes*). Neste caso cada porção da semente pode representar uma linhagem, ou seja, o mesmo substrato (tora) está sendo inoculado com várias linhagens. Isto é importante para obter-se produção em condições naturais muito variáveis durante as diferentes épocas do ano. Além de ser importante para trabalhos de melhoramento genético. Na produção de sementes comerciais não é recomendado.

A técnica consiste em colocar em uma placa de Petri cerca de 20 a 30 papéis manteiga de 2 cm<sup>2</sup> e esterilizar por 30 minutos a 121°C. O basidiocarpo desejado é coletado e colocado na placa de Petri esterilizada, deixando em descanso por 24 horas. Depois coloca-se um dos papéis de 2 cm<sup>2</sup> em um frasco com 1 ml de água estéril para suspender os esporos, agitando-os manualmente. Então coloca-se 1 ml da suspensão de esporos em uma placa de Petri e em seguida verte-se o meio de cultura (20 mL) ou 0,1 mL da suspensão por placa com meio solidificado. As placas são incubadas na ausência de luz à temperatura de 25°C durante 7 - 10 dias (EIRA et al, 1996).

A técnica de cultura monospórica também é usada em programas de melhoramento. Segue-se os mesmos passos da técnica de multiesporos até obter a suspensão de esporos. A partir da suspensão concentrada de esporos em tubo de ensaio, retira-se 1 ml e transfere-se para um tubo de ensaio com 9 ml de água destilada esterilizada, agitando-se manualmente (diluição 1:10). Transfere-se 1 ml da suspensão de 1:10 para um tubo com 9 ml de água esterilizada, agita-se manualmente e obtem-se (1:100), e assim

sucessivamente até 1:10.000. Depois faz-se o plaqueamento da mesma forma que a outra técnica. A incubação é realizada também a 25°C por 5 - 10 dias (EIRA et al, 1996).

Se houver compatibilidade genética as hifas diferentes se unirão formando o micélio secundário. A incompatibilidade genética é notada pela formação da “linha de lise”, onde se vê uma linha separando as hifas diferentes. Na natureza, a compatibilidade ocorre 25% entre os esporos de fungos. A partir da cultura monospórica pode-se isolar as colônias e fazer diferentes cruzamentos (EIRA et al, 1996).

#### **2.4 CONSERVAÇÃO DA MATRIZ PRIMÁRIA:**

Após ser obtida a matriz primária, deve-se conservá-la pelo maior tempo possível. A conservação é feita em geladeira a mais ou menos 4°C, em tubo de ensaio com meio de cultura inclinado e vedado com filme de PVC. Nesta temperatura a atividade metabólica do fungo é baixa e o crescimento e absorção de nutrientes são pequenos. A matriz pode durar até 6 meses desta forma (BONONI et al, 1995).

Outro método para ser utilizado no laboratório é cobrir o micélio com óleo mineral esterilizado, tipo Nujol, no tubo de ensaio e guardar em geladeira à 4°C. Culturas preservadas desta maneira continuarão viáveis após dois anos, no mínimo, sendo necessário renovar este meio de cultura a cada dois anos. Para se obter a linhagem novamente, deve-se inverter o tubo para escorrer o óleo mineral e então incubar a 26°C. Após três semanas, as culturas devem recomeçar o crescimento e podem ser usadas (BONONI et al, 1995).

Pode-se conservar também em nitrogênio líquido ou com liofilização das culturas (BONONI *et al*, 1995; EIRA *et al*, 1996).

## **2.5 MATRIZ SECUNDÁRIA**

A produção de matriz secundária visa facilitar o processo de inoculação do substrato “semente”, aumentando o rendimento durante a fase de produção da “semente”, bem como servir de controle de qualidade das matrizes produzidas quanto ao nível de contaminação deste substrato (EIRA *et al*, 1996).

O substrato utilizado para matriz secundária é igual ao substrato para semente (“spawn”). A inoculação consiste na transferência de pequenos fragmentos de micélio da matriz primária para o substrato da matriz secundária, em condições totalmente assépticas. Deve-se incubar em ausência de luz com temperatura de 25°C, estando totalmente colonizado após 20 a 30 dias (EIRA *et al*, 1996).

## **2.6 PRODUÇÃO DE SEMENTE-INÓCULO (“SPAWN”)**

CHANG & MILES (1989) *apud* BEUX (1995), comentam que o inóculo é conhecido também como “spawn”. O termo é derivado do vocábulo francês “esandre” que significa expandir, propagar. Em português não se tem uma tradução exata desta palavra, sendo utilizado inóculo ou semente.

A semente-inóculo é o substrato no qual o micélio é repicado e após propagação é utilizado como “semente” nos substratos de frutificação (BEUX, 1995). Segundo FERRI (1985) *apud* BEUX (1995) o inóculo

consiste de um suporte nutritivo como cereais, serragem ou madeira, colonizado por filamentos micelianos, cuja função é inseminar o substrato destinado a produzir corpos de frutificação, de forma a fornecer na inoculação vários pontos de contato.

O primeiro tipo de inóculo utilizado foi obtido por suspensão de esporos. Os esporos eram obtidos de basidiocarpos de populações nativas ou de cogumelos cultivados. Os esporos em suspensão eram colocados em furos feitos em toras de madeira. Este método era bruto e inseguro, não chegando a uma cultura pura do fungo (QUIMIO, CHANG & ROYSE, 1990).

“De uma maneira geral, a preparação do inóculo é muito exigente quanto aos métodos de assepsia no laboratório, esterilização dos materiais a serem utilizados, bem como de meio de cultura, além da necessidade de mão de obra qualificada, sendo portanto realizado por poucos laboratórios” (EIRA et al, 1996).

## **2.7 TIPOS DE INÓCULO (SEMENTE)**

A “semente” de shiitake pode ser encontrada basicamente em duas formas: cavilha (“plug”) ou serragem. Também existem outras formas de inóculo (“spawn”), testadas experimentalmente e não muito disponíveis. A escolha do inóculo depende de vários fatores: custo, viabilidade, clima, número de toras e sistema de inoculação (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).

### 2.7.1 CAVILHA

O inóculo em cavilha consiste em pequenos cilindros de madeira colonizado pelo micélio de shiitake. Normalmente os cilindros tem 12 mm (milímetros) de diâmetro e 20 mm (milímetros) de comprimento. Podem ser levemente cônicos para facilitar a inserção na tora. É uma forma vantajosa de inóculo no sentido de não precisar de ferramenta especial para inoculação, além de diminuir o tempo e cuidados necessários na inoculação. E devido a área superficial de exposição ser menor, resiste melhor à situações de seca.

A cavilha foi desenvolvida no Japão, sendo pouco utilizada em outros países. No Brasil a comercialização deste tipo de “semente” é quase insignificante, podendo ser encontrada na APAN (Associação dos Produtores de Agricultura Natural - São Paulo-SP).

Atualmente a produção deste tipo de “semente” tem um custo alto em relação a “semente” produzida em meio de serragem (EIRA et al, 1996).

### 2.7.2 SERRAGEM

O inóculo (semente) é preparado em meio de serragem suplementado com nutrientes variados (HARRIS, 1993).

O meio pode ser formulado com diferentes ingredientes, utilizando inclusive farelos de arroz, de trigo ou quirela de milho, dependendo da disponibilidade e preço (EIRA et al, 1996).

A relação carbono/nitrogênio (C/N) do substrato deve ser semelhante à relação C/N que o fungo está adaptado. Em média o *Lentinula edodes* degrada o substrato com a relação de 30/1 (SONG & CHO, 1987).

É importante que a composição do meio não fique totalmente diferente ao substrato de cultivo, porque desta forma diminui-se a fase de adaptação do fungo ao meio (fase lag), antecipando a fase de crescimento. Desta forma produz-se um inóculo de melhor qualidade (EIRA et al, 1996).

A tabela 2 apresenta um exemplo de formulação utilizado por CHANG & MILES (1989) in EIRA et al (1996):

Tabela 2: Composição do substrato

Serragem	800 g
Farelo de arroz	200 g
Dextrose	30 g
Nitrato de potássio	4 g
Carbonato de cálcio	6 g
Água	2000 ml

Fonte: (CHANG & MILES, 1989).

O substrato é preparado, embalado em frascos de vidro ou sacos de polipropileno e esterilizado em autoclave. Em câmara de fluxo laminar inocula-se o substrato com micélio de *Lentinula edodes*.

A “semente” é inoculada em toras através de inoculadores especiais. TATEZAWA (1994) indica que a quantidade de furos ideal é em número equivalente a 4 (quatro) vezes o diâmetro da tora. Normalmente são abertos de 38 a 40 furos em toras de 1 (um) metro. Os furos tem 12 mm (milímetros) de diâmetro e 20 mm (milímetros) de profundidade.

Este tipo de inóculo requerer um tempo maior no processo de inoculação, necessitando de cuidados especiais com relação a assepsia. Outra desvantagem refere-se a maior suscetibilidade de ressecar durante a etapa de incubação. Isto decorre da natureza do material ter maior área superficial em relação ao volume da “semente” (HARRIS, 1993).



Economicamente o inóculo em serragem custa 35% menos que o inóculo em cavilhas (HARRIS, 1993). O desenvolvimento do micélio começa mais rápido, reduzindo as chances de contaminação da tora.

Devido a estes fatores a grande maioria da comercialização de inóculo é com serragem. No Brasil, isto ocorre, principalmente, porque é mais facilmente encontrado e a mão de obra é barata.

## 2.7.3 OUTROS TIPOS DE SEMENTE

### 2.7.3.1 “COMB SPAWN”

Considerado um novo tipo de “semente” desenvolvida no Japão, seria metade de uma fatia de tora, colonizada pelo *Lentinula edodes* (Figura 2). Utilizando uma serra circular para fazer os cortes, insere-se doze metades de fatia, para toras de 1m de comprimento. O tamanho do corte e das metades das fatias dependem do diâmetro da tora (Tabelas 3 e 4). Segundo HARRIS (1993), o “comb spawn” é produzido em cinco diferentes tamanhos:

FIGURA 2: Formato do “comb spawn”



Fonte: HARRIS (1993)

Tabela 3: MEDIDA DO “COMB SPAWN”

Comprimento (centímetros):	4,5	6,0	7,8	9,5	13,0
Altura (centímetros):	1,3	1,8	2,2	2,7	3,2

Fonte: HARRIS (1993)

Tabela 4: MEDIDA DA TORA

Diâmetro (centímetros):	6,0	6,0-7,9	7,9-10,2	10,2-12,1	12,1
Altura do corte (centímetros):	1,9	2,5	2,9	3,8	4,8

Fonte: HARRIS (1993)

Este método permite que uma pessoa inocule 300 toras de 1m, contra 100 toras por pessoa com “semente” em serragem. É um método que reduz o gasto de energia, são feitas apenas doze cortes, também diminui a contaminação por outros fungos pois o “comb spawn” em contato com a tora promove uma colonização mais rápida (maior área de contato) (HARRIS, 1993).

Este método não é encontrado no Brasil e pode significar um maior custo de produção para o laboratório, pois modifica a maneira atual de produção (HARRIS, 1993).

### 2.7.3.2 INÓCULO EM MEIO LÍQUIDO

Os métodos usuais de produção de *Lentinula edodes* envolvem o uso de inóculo sólido (cereais, serragem ou madeira). No entanto, SONG et al (1989) apud BEUX (1995) utilizaram um meio líquido formulado com glicose, cloreto de amônia, cloreto de cálcio, ácido aspártico, tiamina e sulfato de magnésio e em um fermentador produziram pequenos “pellets” micelianos que serviram como inóculo. Esta massa miceliana foi inoculada em substrato sólido composto por casca de semente de algodão misturada a casca de café. Os corpos de frutificação apareceram 69 dias após a inoculação. Segundo estes autores o inóculo produzido em meio líquido coloniza mais rapidamente o substrato por fornecer maior superfície de

contato. Em contrapartida, RAASKA (1989) e LEATHAM & GRIFFIN (1984) *apud* BEUX (1995) consideram que apesar da biomassa formada ser superior, o inóculo produzido em meio líquido não se adapta facilmente a substratos sólidos e por esta razão não é comercialmente utilizado.

Segundo PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE (1990), o inóculo produzido em meio líquido consiste em suspensão de micélios, o qual é injetado na tora, obtendo-se resultados infelizes. Isto se dá provavelmente devido a pequena área de contato que se estabelece entre o substrato (tora) e o inóculo. Em substrato de serragem, o inóculo produzido em meio líquido tem o poder de infiltrar profundamente, aumentando os pontos de contato e, conseqüentemente, obtendo-se bons resultados referentes a colonização de substrato.

### 2.7.3.3 *INÓCULO EM DISCOS (“SPAWN DISK”)*

O experimento realizado por SAN ANTÔNIO & HANNERS (1983), sugere a utilização de inóculo em meio de grãos para inoculação de toras. O inóculo é colocado em contato direto com a superfície dos cortes da tora e coberto com papel alumínio ou filme de PVC.

Segundo SAN ANTÔNIO & HANNERS (1983) este método mostrou bons resultados no cultivo de cogumelos em toras, tendo como principais vantagens o fácil e rápido processo de inoculação, redução da perda de umidade da tora durante o cultivo e redução de fungos contaminantes devido a proteção nas extremidades da tora.

PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE (1990) comentam o sucesso de pequenos testes utilizando esta forma de inóculo.

## 2.8 MEIOS DE CULTURA

“O meio de cultura deverá oferecer todas as necessidades nutricionais do fungo para que haja um bom desenvolvimento do micélio sem possibilitar o crescimento de contaminantes que são competidores do fungo” (EIRA et al, 1996). O meio mais utilizado em laboratório é o BDA (Batata-dextrose-ágar) que pode ser adquirido em casas de produtos químicos ou ser preparado com uma receita simples (BONONI et al, 1995; EIRA et al, 1996).

Outros meios de cultura poderão ser utilizados, como Milho-dextrose-ágar (MDA), Arroz-dextrose-ágar, Bagaço-dextrose-ágar (BgDA), Serragem-dextrose-ágar (SDA) ou enriquecido com farelo (EIRA et al, 1996).

O meio de cultura utilizado para matriz primária de *Lentinula edodes* normalmente é a base de extrato de serragem-ágar. Segundo EIRA et al (1996) a utilização de meios de cultura muito ricos e completamente diferentes dos substratos de cultivo, podem levar à seleção de mutantes nutricionais (saltações paramorfogênicas adaptadas ao meio) que podem perder características microbiologicamente muito importantes. Uma semente muito vigorosa pode representar uma linhagem desadaptada para o substrato de cultivo (Pesquisa em andamento no Módulo de Cogumelos Comestíveis, FCA/UNESP/Botucatu).

O meio de serragem-dextrose-ágar tem a seguinte composição (Tabela 5):

Tabela 5: Composição do meio serragem-dextrose-ágar

Componente	Quantidade
Ágar	13 g
Dextrose	10 g
Serragem	400 g
Água	1 litro

Fonte: EIRA et al (1996)

A serragem deve ser triturada em liquidificador com água. Faz-se o cozimento da serragem triturada em 500 ml de água, por 10 a 15 minutos, passando em seguida por um filtro de algodão ou gaze, sendo que este extrato deverá ter seu volume completado com água destilada para um litro. O extrato filtrado deve ter o pH corrigido para 6.8 com carbonato de cálcio 5%. Verter o extrato em um frasco e adicionar o ágar e a dextrose, tampar com algodão e recobrir com papel. Em seguida o material deverá ser esterilizado em autoclave por 30 minutos à 121°C.

## 2.9 EMBALAGENS

As embalagens utilizadas na produção de inóculo devem ser resistentes a autoclavagem, ou seja, devem resistir a temperaturas de 121°C por duas horas (EIRA et al, 1996).

A variedade de materiais é grande, sendo atualmente utilizado em frascos de vidro, sacos de prolipropileno (plástico) e a nível de exterior em garrafas “pet” (material plástico) (EIRA et al, 1996).

A escolha do tipo de embalagem deve levar em consideração o seu custo, a proximidade do mercado consumidor (produtores de shiitake) e a qualidade dos materiais (EIRA et al, 1996).

## **2.10 INSTALAÇÕES**

A produção de inóculo engloba atividades realizadas sob condições de extrema assepsia, podendo comprometer completamente a produção se não for seguido (BONONI et al, 1995).

Basicamente o laboratório deve possuir duas alas: uma onde se trabalha sem o controle microbiológico do ambiente e outra onde se mantém o ambiente dentro dos padrões de esterilidade. Na primeira ala se realizam as etapas de cozimento, envazamento e autoclavagem dos substratos utilizados. Na segunda se realizam as manipulações do micélio (BONONI et al, 1995).

A ala não estéril deve ter um galpão para ferramentas e substratos variados (serragem, farelos, gesso, carbonato de cálcio entre outros), bancada para manipulação e envasamento, pia para lavagem do material utilizado, e local para os equipamentos básicos como autoclave, fogão, balança, destilador, geladeira e estufa (BONONI et al, 1995).

## **2.11 CONSERVAÇÃO**

A semente (“spawn”) quando não for bem cuidada ou quando envelhece perde a força de crescimento. Desta forma faz-se necessário uma produção programada da semente (“spawn”) evitando períodos de armazenagem, para que o inóculo seja utilizado em sua total atividade e não receba choque relativos a temperaturas de armazenagem (TATEZAWA, 1992).

Segundo BONONI *et al* (1995) a semente pronta pode ser guardada em geladeira (4°C) por no máximo quatro meses, porém o melhor é utilizá-la recém preparada. Para utilização, retirar da geladeira algumas horas antes do uso e inocular quando estiver à temperatura ambiente.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O estágio foi realizado durante o período de 5 de agosto à 5 de setembro de 1996, em instalações do Módulo de Cogumelos Comestíveis, pertencente ao Departamento de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP, campus de Botucatu.

#### **3.1 PRODUÇÃO DE MATRIZES**

As matrizes utilizadas foram desenvolvidas pelo Módulo de Cogumelos Comestíveis - FCA/UNESP/Botucatu, isoladas de basidiocarpos de várias regiões e Estados brasileiros. Todas obtidas a partir do micélio terciário dicariótico dos basidiocarpos (fragmento de basidiocarpo). Foram classificadas como linhagens de inverno, de verão e precoces.

O corpo de frutificação ou cogumelo selecionado foi cuidadosamente lavado com água destilada. Em câmara de fluxo laminar o basidiocarpo foi partido manualmente e da parte interna retirou-se fragmentos de dois a cinco milímetros, com a ajuda de uma alça de platina, colocando-se então no centro do meio de cultura do tubo de ensaio (previamente preparado).

Estas operações foram realizadas com muito cuidado e rapidez evitando contaminações. Foi utilizado meio previamente esterilizado (será descrito posteriormente), bem como câmara de fluxo laminar, bico de Bunsen e álcool que são usados para flambar todos os materiais (pinças, alças, tubos de ensaio com meio inclinado antes e depois de abri-los, durante o processo de transferência de micélio para o meio de cultura).

O cogumelo foi aproveitado ao máximo, sendo inoculados de 30 a 40 tubos de ensaio. Depois foram colocados em estufas de incubação, a 25°C



por aproximadamente 15 dias. Durante este período foi feita uma seleção, retirando tubos contaminados com outros fungos e bactérias. Também deu-se preferência ao micélio rizomórfico, pois apresenta um crescimento vigoroso e ramificado (EIRA et al, 1996). Os tubos que apresentaram crescimento muito lento também foram descartados.

Quando o meio apresentou-se totalmente tomado pelo micélio do fungo (*Lentinula edodes*) a matriz estava pronta para produção da matriz secundária ou para ser armazenada.

O meio de cultura utilizado para matriz primária de *Lentinula edodes* foi a base de extrato de serragem (serragem-dextrose-ágar-SDA) (Tabela 6).

Tabela 6: Composição do meio SDA

Componente	Quantidade
Ágar	13 g
Dextrose	10 g
Serragem	400 g
Água	1 litro

Fonte: EIRA et al (1996)

A serragem foi triturada em liquidificador com 100 mL de água, fazendo-se o cozimento da serragem triturada em 500 mL de água, por 10 a 15 minutos, passando em seguida por um filtro de algodão ou gaze, sendo que este extrato teve o seu volume completado com água destilada para um litro. O extrato filtrado teve o pH corrigido para 6.8 utilizando-se carbonato de cálcio 5%. Verteu-se o extrato em um frasco e foi adicionado o ágar e a dextrose. Em seguida colocou-se 5 ml do meio em tubos de ensaio, com o auxílio de uma pipeta esterilizada, vedou-se os tubos de ensaio com algodão, cobriu com papel sulfite e esterilizou-se em autoclave por 15

minutos a 1 atm. ou 120°C. Logo após os tubos ainda quente foram colocados em posição inclinada para solidificar.

A conservação foi feita em geladeira a mais ou menos 4°C, em tubo de ensaio com meio de cultura inclinado e vedado com filme de PVC.

Também utilizou-se o método de conservação onde o micélio é coberto com óleo mineral esterilizado, tipo Nujol, em tubo de ensaio e guardado em geladeira à 4°C.

### 3.2 SUBSTRATO PARA SEMENTE

A semente foi produzida em meio de serragem. A formulação está descrita na Tabela 7.

Tabela 7: Composição do substrato de serragem

COMPONENTE	QUANTIDADE
Serragem (comprada)	8 baldes
Serragem (tora verde)	8 baldes
Quirela	12 Kg
Gesso	3 Kg
Calcário	2,5 Kg
Carbonato de cálcio	2 Kg
Água	35 litros

Fonte: EIRA (1996)

Utilizou-se a unidade de balde, com volume de 10 litros, para serragem devido a praticidade no momento de preparar o substrato. A serragem comprada é proveniente de serrarias próximas a cidade (Botucatu-SP). Enquanto a serragem de tora verde é obtida da serragem de toras recém cortadas, através de uma serra circular adaptada a um torno, serrando-se apenas a casca e o córtex.

A mistura dos ingredientes é realizado através de uma betoneira movida por motor elétrico. Primeiramente coloca-se os materiais sólidos, depois da mistura estar homogênea acrescenta-se a água aos poucos (a umidade deve ficar entre 60 e 65%).

O material é colocado em vidros (matriz secundária) e em sacos de polipropileno (semente) através de um funil apropriado. Veda-se o recipiente com algodão e tapa-se com papel. O material é esterilizado através de autoclave à 120°C durante uma hora. O substrato pode ser utilizado quando estiver a temperatura ambiente.

### **3.3 PRODUÇÃO DE MATRIZ SECUNDÁRIA**

A matriz primária é inoculada em substrato de serragem anteriormente preparado. O processo é feito em câmara de fluxo laminar, utilizando bico de Bunsen, álcool, alça de platina. Flambando-se antes a boca, e com alça também flambada, retira-se um pequeno pedaço de micélio e transfere-se para o pote de vidro com substrato de serragem, também flambando a boca. O substrato inoculado é identificado com o nome da matriz.

A matriz secundária foi incubada à 25°C.

### **3.4 PRODUÇÃO DA SEMENTE ("SPAWN")**

A semente foi obtida através da inoculação de pequena quantidade de micélio da matriz secundária no substrato de serragem, sob condições de assepsia.

A inoculação foi realizada com os mesmos cuidados citados anteriormente. Neste caso foi utilizado uma pequena colher com cabo

comprido na manipulação do micélio. O vidro (frasco) com matriz secundária permaneceu inclinado enquanto esteve aberto e com movimentos firmes afrouxou-se a serralha com micélio e retirou-se pequenas quantidades. O recipiente com substrato foi aberto e rapidamente colocou-se o inóculo. Esta operação deve ser feita por duas pessoas. A semente inoculada foi identificada e incubada.

A incubação da semente foi feita em sala de incubação, com temperatura controlada (25°C) através de ar condicionado e termostato ligado a uma resistência elétrica.

### **3.5 INSTALAÇÕES**

A ala não estéril fica em módulo diferente da ala estéril, fazendo com que o material depois de esterilizado fosse transportado por uns 50 metros ao ar livre.

Da mesma forma as salas de incubação para semente ficam no módulo da ala não estéril, tendo que percorrer o mesmo trajeto ao sair da inoculação.

Quanto as salas de incubação de semente, o revestimento interno das paredes é de reboco pintado com tinta de parede e as estantes são de madeira pintada. Algumas das prateleiras são forradas com plástico.

A sala de incubação e conservação de matrizes primárias e secundárias possuem revestimento de cerâmica até a metade das paredes. Os tubos de ensaio com matrizes são guardados em armário de ferro, e as matrizes secundárias em caixas de plástico sobre a sala.

### 3.6 EMBALAGENS

O laboratório utilizou embalagens de vidro com volume de 0,800 litros e sacos de prolipropileno com volume de 1,200 litros de inóculo.

O manejo utilizado para os vidros foi de preencher até  $\frac{3}{4}$  (três quartos) de seu volume, a tampa foi furada (oito milímetros de diâmetro) e o local preenchido com algodão ou papel filtro, sendo coberto depois com papel sulfite ou papel alumínio para serem autoclavados. Esta embalagem foi utilizada para matriz secundária.

Os sacos foram preenchidos até o volume de 1,2 litros de inóculo, fez-se um bocal nos sacos, utilizando-se um pedaço de cano de PVC  $\frac{3}{4}$ ", tapou-se com algodão e depois foi coberto com papel para ser autoclavado. Quando um lote de semente apresentou altos índices de contaminação foi realizado o teste da água. Este teste consistiu em encher 100 sacos de semente contaminadas com água e observar indícios de furos nos sacos, ainda observando o local do furo.

Em seguida o substrato foi autoclavado por duas horas a 121°C. Após a autoclavagem foram inoculados imediatamente.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes tiveram um período de incubação entre 30 à 35 dias, apresentando-se completamente colonizadas pelo micélio de *Lentinula edodes*. Algumas sementes foram comercializadas antes de estarem totalmente desenvolvidas, a pedido de alguns clientes.

Durante o período de incubação da matriz secundária a semente que apresentou sinais de fungos contaminantes ou bactérias foi eliminado, assim como os que apresentaram desenvolvimento miceliano anormal.

As linhagens, de maneira geral, se desenvolveram bem no substrato utilizado. A linhagem precoce apresentou maior procura por parte dos compradores, devido a sua característica de produzir em menor tempo de cultivo.

As sementes apresentaram alto índice de contaminação. Através do teste da água, utilizando 100 sacos de semente contaminados, 34 não apresentaram furos na embalagem, enquanto os outros 66 apresentaram furos, dos quais 52 eram furos na solda dos sacos e 14 em locais diferentes.

Pode-se sugerir que a má qualidade das embalagens causou um número significativo de contaminações, mas o índice de sementes contaminadas onde a embalagem estava boa pode significar que o manejo utilizado na produção está deficiente. Isto pode ser consequência da localização das instalações, onde a semente depois de ser autoclavada tem que ser levada para a sala estéril em outro módulo. Deve-se lembrar que a perda de materiais nesta etapa da produção significa um desperdício de tempo, materiais e mão de obra empregados em etapas anteriores.

O uso de embalagens de boa qualidade aliado a um manejo adequado da semente pode reduzir os índices de contaminação.

Talvez o uso de potes de vidro para produção de semente para produtores da região, onde o custo de transporte é baixo e pode-se retornar os recipientes vazios para o laboratório.

Com relação à embalagem de transporte, os sacos de algodão tem custo baixo, mas devem ser bem manejados pois ao embalar um saco fica sobre o outro, havendo risco de deslocamento do tampão de algodão.

Quanto as instalações, estão sendo melhoradas com a construção de outra sala de inoculação (com câmara de fluxo laminar) junto ao módulo de preparação do substrato (autoclave). A sala de inoculação atual é revestida com cerâmica apenas sobre a bancada não permitindo uma limpeza eficiente do ambiente. Além disto a distância do autoclave a esta sala pode estar prejudicando o desempenho da produção, aumentando o índice de contaminação.

A sala de incubação não apresenta problemas, apesar de ser construída sem maiores cuidados quanto ao acabamento, mas deveria ser limpa com mais frequência, evitando o acúmulo de poeira sobre as prateleiras e sementes.

De modo geral poderia-se utilizar o modelo de produção de semente ("spawn") do Módulo de Cogumelos Comestíveis - FCA/UNESP/Botucatu para produção de semente de *Lentinula edodes* em Santa Catarina, obtendo-se linhagens a partir de basidiocarpos (cogumelos) cultivados em regiões determinadas.

A semente de shiitake comercializada em São Paulo (no momento único estado produtor desta semente), embora tenha bons resultados com relação a produção em Santa Catarina, não é totalmente adaptada a nossas condições de clima, podendo causar redução da produção em épocas específicas do ano como verão (excesso de calor) e inverno (muito frio).

Além disto o estado tem regiões características quanto ao clima, necessitando-se de adaptações para o litoral, planalto serrano e oeste do estado.

Tendo em vista as observações feitas no Módulo podemos citar algumas necessidades básicas para a implantação de linhagens novas produzidas em laboratório, a qual seria a utilização de uma área para experimentação, testando-se desta forma a semente antes de comercializá-la. É uma etapa de grande importância para se manter a qualidade da semente e preservar a imagem do laboratório frente ao consumidor.

## 5. CONCLUSÃO

A produção de semente-inóculo de *Lentinula edodes* no estado de Santa Catarina pode ser de grande importância para o incremento do cultivo deste cogumelo no estado.

A semente utilizada atualmente por produtores de Santa Catarina é proveniente de São Paulo, apresentando normalmente boa qualidade e produtividade, havendo, porém, alguns problemas quando sobre condições rigorosas de frio (inverno) ou de calor (verão). Desta forma o desenvolvimento de linhagens adaptadas as condições climáticas do Estado torna-se necessário.

O mercado consumidor tem-se apresentado em pleno crescimento, tanto por produtores isolados como por Sindicatos de Produtores Rurais. Isto se dá principalmente devido a marcante característica de pequenas propriedades rurais existentes em quase todo estado, permitindo a implantação do cultivo do shiitake junto as atividades principais da propriedade.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEUX, M. R. *Biotransformação de resíduos agroindustriais do Estado do Paraná no cultivo do fungo saprófita comestível *Lentinula edodes* (Shiitake)*. Curitiba, 1995. 130 p.il. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química). Departamento de Tecnologia Química, Universidade Federal do Paraná, 1995.

BONONI, V. L. R. **et al.** *Cultivo de cogumelos comestíveis*. São Paulo: Icone, p. 206, 1995.

EIRA, A. F. **et al.** *Manual teórico prático do cultivo de cogumelos comestíveis*. Botucatu, FEPAF, p. 96, 1996.

HARRIS, B. *Growing shiitake commercially*. Second Foundation Publications, Tennessee, n. 2, p. 71, 1993.

PAIM, P. E. Cogumelos viram fonte de lucro para o Oeste *Diário Catarinense*, Florianópolis, v. 11, n. 3988, p. 4, 15 mar. 1997.

PRZYBYLOWICZ, P. & DONOGHUE, J. *Shiitake growers handbook: the art and science of mushroom cultivation*. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, p. 217, 1990.

QUIMIO, T. H., CHANG, S. T. & ROYSE, D. J. *Technical guidelines for mushroom growing in the tropics*. Rome, FAO., p. 155, 1990.

SAN ANTONIO, J. P. & HANNERS, P. K. Spawn disk inoculation of logs to produce mushrooms. *Hort. Science*. 18(5): 708 - 710, 1983.

SONG, C. H. & CHO, K. Y. *A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinula edodes**. by the York Botanical Garden, Bronx, N.Y. *Mycologia*, 79(6), p. 866 - 876, 1987.

TATEZAWA, N. *Cultivo de shiitake no Brasil*. APAN - MOA, p. 32, 1992.

UNGARETTI, G. Cogumelos: a arte de cultivar as variedades orientais. *Manchete Rural*, São Paulo, v. 8, n. 94, p. 4 - 8, abr. 1995.