



Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais

Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido – ATU



Cultivo micelial *in vitro* e elaboração de “semente-inóculo” de *Lentinus strigosus*, um cogumelo comestível isolado na Amazônia

RUBY VARGAS-ISLA

Manaus, Amazonas

Fevereiro, 2008

RUBY VARGAS-ISLA

Cultivo micelial *in vitro* e elaboração de “semente-inóculo” de *Lentinus strigosus*, um cogumelo comestível isolado na Amazônia

Orientadora: Noemia Kazue Ishikawa

Co-orientador: Rogério Eiji Hanada

Dissertação apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS AGRÁRIAS, área de concentração em AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO.

Manaus, Amazonas

Fevereiro, 2008

V297

Vargas-Isla, Ruby

Cultivo micelial *in vitro* e elaboração de "semente-inóculo" de *Lentinus strigosus*, um cogumelo comestível isolado na Amazônia / Ruby Vargas-Isla .--- Manaus : [s.n.], 2008.
x, 67f. : il.

Dissertação (mestrado) --- INPA/UFAM, Manaus, 2008

Orientador : Noemia Kazue Ishikawa

Co-Orientador : Rogerio Eiji Hanada

Área de concentração : Agricultura no Trópico Úmido

1. Cultivo de cogumelos. 2. Basidiomiceto. 3. Fungos termófilos.
4. Serragem. 5. *Panus rudis*. I. Título.

CDD 19. ed. 589.22

Sinopse:

Estudaram as condições de crescimento micelial *in vitro* de *Lentinus strigosus*, um cogumelo comestível termófilo isolado na Amazônia, para a elaboração de "semente-inóculo" utilizando substratos a base de serragens de espécies florestais disponíveis na Amazônia Central.

Palavras-chave:

Cultivo de cogumelos, Basidiomiceto, Fungos termófilos, Serragem, *Panus rudis*.



Con mucho cariño
a mis amados
padres Angela y
Manolo y mis
queridos hermanos
Angela Vanessa y
Marcos Alberto
Daniel



AGRADECIMENTOS

À Deus

À Natureza

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) por abrir suas portas e contribuir na minha formação profissional em Ciências Agrárias. À Coordenação de Pesquisas em Tecnologia de Alimentos (CPTA) e à Coordenação de Pesquisas de Produtos Florestais (CPPF) do INPA.

Ao curso de Agricultura no Trópico Úmido (ATU) pelo apoio efetivo na minha formação como Mestre.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Amazonas (FAPEAM) pela bolsa de estudos no mestrado.

À minha orientadora, Dra. Noemia Kazue Ishikawa, pela oportunidade, por acreditar, pela orientação, responsabilidade, paciência, apoio e ajuda nos ensinamentos e desenvolvimento de todas as fases deste trabalho, principalmente pela confiança depositada.

Ao meu co-orientador, Dr. Rogério Eiji Hanada por ter compartilhado conhecimentos importantes à minha formação.

Aos professores do curso do ATU pelos conselhos, oportunidades e inúmeros ensinamentos que contribuíram enormemente para minha formação profissional.

Ao Coordenador do Curso de Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido Dr. Rogério de Jesus pela convivência e incentivo em todos os momentos.

Agradeço aos Professores Doutores Luzia D. Paccola-Meirelles, Regina H. Hassegawa, Cristina S. Maki, Rosalee A. C. Netto, Luiz A. de Oliveira, José S. do Nascimento e Luiz A. Graciolli, por terem participado da avaliação do projeto de dissertação, aula de qualificação e/ou banca de dissertação.

Aos Professores da Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) por terem me proporcionado a formação acadêmica em Agronomia.

Aos meus primeiros orientadores e amigos Eng. Miguel Perez Marín, Professor principal da Faculdade de Agronomia-Universidad Nacional de la Amazonía Peruana e ao Eng. Agustín Gonzales Corral, pesquisador do Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana, por suas valiosas orientações e por terem contribuído significativamente para minha formação como agrônoma.

Ao Dr. Jomber Chota Inuma, pela confiança, pela ajuda na concretização dos nossos sonhos e pelo abrigo oferecido desinteressadamente.

Aos meus amigos de turma de mestrado do ATU-2006, cujos momentos compartilhados têm sido muito especiais.

Minha profunda gratidão aos familiares, amigos, colegas e pessoas que de uma forma ou outra contribuíram na execução deste trabalho.

Às Famílias Ishikawa e Komagome pelo carinho e ajuda na obtenção de material para a elaboração de substratos.

Ao meu amigo e companheiro João Bosco André Gordiano, pelo carinho, amor, amizade, apoio, compreensão e muita paciência que teve comigo durante o período deste Mestrado.

À meus irmãos Vanessa e Marcos por estarem sempre acompanhando meus avanços e compartilhado minhas alegrias.

Aos meus pais Angela e Manolo pelo amor e apoio constante e desmedido, pelos conselhos, incentivo que me deram para continuar os estudos, por terem acreditado em meus sonhos.

PREFÁCIO

Neste manuscrito são apresentados os resultados obtidos durante o curso de mestrado em Agricultura no Trópico Úmido, realizado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, no período de março de 2006 a fevereiro de 2008.

O texto está dividido em três capítulos: Capítulo 1 - Introdução, abordando características gerais do fungo *Lentinus strigosus*, comestibilidade da espécie, fungicultura, importância da “semente-inóculo”, substratos disponíveis na região de Manaus e vantagens do fungo termófilo para a fungicultura no Trópico Úmido; Capítulo 2 - Resultados sobre a avaliação das condições ótimas de crescimento micelial *in vitro* de *L. strigosus*; e Capítulo 3 - Resultados sobre a elaboração de “semente-inóculo” de *L. strigosus* com base em serragens de espécies florestais da Amazônia Central.

O capítulo 1 está redigido na forma de texto, sob as normas da Revista Acta Amazônica. Os capítulos 2 e 3 estão redigidos na forma de artigo científico, de acordo com as normas das revistas a serem publicados.

RESUMO

O Estado do Amazonas apresenta um cenário favorável para o desenvolvimento da fungicultura, pois reúne a diversidade nativa de espécies de cogumelos comestíveis e substratos lignocelulósicos em abundância. Entretanto, os protocolos de cultivo geralmente são descritos para espécies de clima temperado, sendo necessário o desenvolvimento de protocolos para as espécies de clima tropical. A espécie *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr. (= *Panus rudis* Fr.) tem uma ampla distribuição mundial apresentando vários ecotipos. A comestibilidade desta espécie tem sido reportada em estudos etnomicológicos de povos indígenas da Amazônia. No entanto, o seu potencial para a produção em escala comercial ainda tem sido pouco explorada. Neste trabalho, reportam-se as condições ótimas de crescimento micelial, *in vitro*, de *L. strigosus*. O isolado apresentou características de fungo filamentosso termófilo, com crescimento em temperaturas de 25 a 45°C, sendo a temperatura de crescimento ótimo, 35°C. Esta temperatura é uma importante vantagem para o desenvolvimento da fungicultura nos trópicos, uma vez que é uma temperatura comum na região. Quanto aos substratos para elaboração de “semente-inóculo”, em uma primeira etapa, avaliou-se o crescimento micelial de *L. strigosus* em formulações a base de serragens de 11 espécies florestais regionais: *Hymenolobium petraeum* Ducke (Angelim pedra), *Hura crepitans* L. (Assacu), *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Castanheira), *Cedrela odorata* L. (Cedro), *Bombacopsis quinata* (Jacq.) Dugand. (Cedro doce), *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá), *Ocotea cymbarum* Kunth (Louro canela), *Simarouba amara* Aubl. (Marupá), *Astronium lecointei* Ducke (Muiracatiara), *Aniba rosaeodora* Ducke (Pau rosa) e *Caryocar* sp. (Piquiarana) em comparação com *Eucalyptus* sp., principal substrato utilizado na fungicultura do Sul e Sudeste do Brasil e *Quercus acutissima* Carr., muito utilizado na Ásia. As serragens foram suplementadas com 20% (w/w) de farelo de arroz. Os substratos a base de serragem de *B. quinata* e *S. amara* promoveram maiores crescimentos miceliais ($p < 0,05$). Em uma segunda etapa, avaliou-se o crescimento micelial em serragem de *S. amara* suplementada com sete diferentes fontes de nitrogênio (20% w/w): farelo de arroz, extrato de soja, levedura de cerveja, farinha da casca de maracujá, fibra de soja, fibra de trigo e gérmen de trigo. Como controle utilizou-se, serragem pura. Todas as suplementações favoreceram em diferentes níveis o crescimento micelial de *L. strigosus*. Para a produção de “semente-inóculo” foram testados sacos e frascos de polipropileno utilizando serragens de *S. amara*, *H. petraeum* e *A. lecointei* suplementadas com farelo de arroz, após 25 dias de inoculação os substratos estavam totalmente colonizados por *L. strigosus* em todas as embalagens testadas, para a escolha da embalagem foram considerados aspectos como custos das embalagens; tempo de colonização; viabilidade de transporte e praticidade de inoculação do micélio no substrato. Mediante estes resultados, a “semente-inóculo” de *L. strigosus* foi elaborada com sucesso, utilizando-se serragem de *S. amara* suplementado com 20% (w/w) de farelo de arroz, a 35°C por 25 dias, no escuro, em três embalagens com características diferentes.

Palavras-chave: Cultivo de cogumelos, Basidiomiceto, Fungos termófilos, Serragem, *Panus rudis*

ABSTRACT

The Amazonas State presents favorable scenery for the development of the fungiculture, because gathers the native diversity of species of edible mushrooms and abundantly substrates lignocellulosics. However, the protocols of cultivation are usually described for species of temperate climate habitat, being necessary the development of protocols for species of tropical climate. The specie *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr. (= *Panus rudis* Fr.) has a wide world distribution presenting several ecotypes. The edibility of this specie has been reported in ethnomycology studies of indigenous groups in the Amazon. However, your potential production in commercial scale has still been a little explored. In this study, reported the optimum conditions *in vitro* of mycelial growth of *L. strigosus*. The isolated presented characteristics of thermophile filamentous mushroom, with growth in temperatures from 25 to 45°C, being the optimum growth temperature, 35°C. This temperature is an important advantage for the development of the fungiculture in the tropics, since it is a common temperature for the region. In relation to the substrates for spawn preparation, in a first phase, the mycelial growth of *L. strigosus* was evaluated in based on sawdust formulations of 11 forestry regional species: *Hymenolobium petraeum* Ducke (Angeim pedra), *Hura crepitans* L. (Assacu), *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Castanheira), *Cedrela odorata* L. (Cedro), *Bombacopsis quinata* (Jacq.) Dugand. (Cedro doce), *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá), *Ocotea cymbarum* Kunth (Louro canela), *Simarouba amara* Aubl. (Marupá), *Astronium lecointei* Ducke (Muiracatiara), *Aniba rosaeodora* Ducke (Pau rosa) and *Caryocar* sp. (Piquiarana) and *Eucalyptus* sp. in comparison, main substratum used in the fungiculture of the South and Southeast of Brazil and *Quercus acutissima* Carr., very used in Asia. The sawdusts were supplemented with 20% (w/w) of rice bran. The substrates formulated with sawdust of *B. quinata* and *S. amara* they promoted higher mycelial growth ($p < 0.05$). In the second phase, was evaluated the mycelial growth in sawdust of *S. amara* supplemented with seven different nitrogen sources (20% w/w): rice bran, soy extract, beer yeast, passion fruit shell flour, soy fiber, wheat fiber and wheat germ. As control was utilized pure sawdust. All the supplements favored in different levels the mycelial growth of *L. strigosus*. Bags and flasks of polypropylene were tested for spawn production and utilizing sawdust of *S. amara*, *H. petraeum* and *A. lecointei* supplemented with rice bran, after 25 days of inoculation the substrates were totally colonized by *L. strigosus* in all the packings tested. For choice of the packing other criteria should be considered aspects as costs of the packings; time of colonization; transport viability and feasibility of mycelial inoculation on the substratum. By these results, the spawn of *L. strigosus* was elaborated with success, being used sawdust of *S. amara* supplemented with 20% (w/w) of rice bran, at 35°C during 25 days, in the dark, in three packings with different characteristics.

Key words: Mushroom culture, Basidiomycete, Thermophiles fungi, Sawdust, *Panus rudis*

SUMÁRIO

	Página
Prefácio	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
1. Introdução	1
O cogumelo: <i>Lentinus strigosus</i>	4
Comestibilidade da espécie	5
Fungicultura	7
Importância da “semente-inóculo”	8
Substratos: disponibilidades regionais	9
Fungo termófilo: vantagens para a fungicultura no Trópico Úmido	11
Objetivos	13
2. Avaliação das condições ambientais e nutricionais para o crescimento e manutenção da cultura micelial <i>in vitro</i>	18
Artigo 1: Optimum conditions of <i>in vitro</i> mycelial growth of <i>Lentinus strigosus</i>, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon	19
Resumo	21
Abstract	22
Introdução	23
Material e métodos	25
Resultados e Discussão	28
Referências	31
3. Elaboração de “semente-inóculo” do fungo <i>Lentinus strigosus</i> com base em serragens de espécies florestais da Amazônia	43
Artigo 2: Elaboração de “semente-inóculo” de <i>Lentinus strigosus</i>, um cogumelo comestível termófilo isolado na Amazônia Brasileira	44
Resumo	46
Abstract	47
Introdução	48
Material e métodos	50
Resultados e Discussão	52
Referências	55

1. Introdução

INTRODUÇÃO

A diversidade de fungos tem sido estimada por diversos autores variando de 500 mil a 2,7 milhões de espécies, sendo que a estimativa mais aceita é de 1,5 milhão de espécies (Hawksworth, 2001). Entretanto, apenas cerca de 80 a 120 mil espécies estão descritas atualmente (Webster e Weber, 2007). Deste modo, existe uma grande especulação em relação aos locais onde poderiam ocorrer inúmeros fungos ainda desconhecidos (Hyde, 2001). Entre as diversas localidades possíveis estão os países com conhecimento escasso de sua diversidade fúngica, hospedeiros, habitats ou nichos ainda poucos estudados (Hawksworth, 2001; Hyde, 2001). De acordo com a opinião de diversos autores, florestas tropicais abrigam grande número de espécies de fungos (Mueller *et al.*, 2007). O que é facilmente verificado ao caminhar na floresta Amazônica, onde é comum observar uma grande diversidade de fungos, principalmente, em época chuvosa. Esse pouco conhecimento sobre a biodiversidade de fungos em ecossistemas tropicais está em descompasso com o enorme potencial biotecnológico dessas espécies (Hawksworth, 2001; Schmit e Mueller, 2007; Mueller *et al.*, 2007).

Dos fungos já descritos, cerca de 15 mil espécies formam cogumelos (Hawksworth, 2001) e pelo menos 2 mil apresentam vários graus de comestibilidade. Comercialmente, são cultivadas cerca de 35 espécies de cogumelo, sendo, aproximadamente, 20 espécies cultivadas em escala industrial. Dentre estas, as mais cultivadas no mundo são predominantemente de ocorrência natural da Europa e Ásia: *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Pilát, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Pleurotus* spp. (Fr.) P. Kumm., *Auricularia* sp. Lloyd, *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Singer e *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer (Sánchez, 2004).

Além de gerar produtos com excelentes características gastronômicas, nutritivas e medicinais, a produção de cogumelos (fungicultura) favorece o aproveitamento dos resíduos gerados pelas agroindústrias como: serragens (Hanada, 2003; Philippoussis *et al.*, 2007); bagaço de cana-de-açúcar (Rossi *et al.*, 2003; Soccol e Vandenberghe, 2003; Silva *et al.*, 2007); sabugo de milho (Salmones *et al.*, 1999; Philippoussis *et al.*, 2007); bainha de palmito (Tonini *et al.*, 2007); e gramíneas (Chaiyama *et al.*, 2007). O processo de bioconversão ajuda a prevenir a contaminação ambiental causada pela acumulação de resíduos agroindustriais, sendo uma das melhores alternativas na conversão, por exemplo, de resíduos madeireiros em alimentos (Mandeeel *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005). Os substratos utilizados na fungicultura variam de acordo com as espécies de cogumelos e disponibilidade nos locais onde são cultivados (Albertó e Gasoni, 2003).

O estado do Amazonas apresenta características favoráveis para o desenvolvimento da fungicultura, pois reúne a diversidade nativa de espécies de cogumelos comestíveis e substratos lignocelulósicos em abundância. No entanto, as condições climáticas no trópico úmido são distintas dos locais onde a fungicultura é mais desenvolvida, ou seja, países de climas temperados e subtropicais da Europa e Ásia, assim como no Sul e Sudeste do Brasil, o que demanda grandes esforços e custos para adequação de metodologias para cultivar as espécies tradicionalmente conhecidas, ou a domesticação de espécies regionais.

Mediante ao exposto, este trabalho aborda as primeiras etapas de estudo para avaliar o potencial de uso de uma espécie de cogumelo comestível isolada na Amazônia, *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr., para a fungicultura. Relata-se neste manuscrito as condições ótimas de crescimento micelial *in vitro*, assim como a elaboração de “semente-inóculo” utilizando substratos preparados, tendo como base serragens de espécies florestais disponíveis na Amazônia Central.

O cogumelo: *Lentinus strigosus*

A espécie *L. strigosus* pertence ao gênero *Lentinus* Fr. (Polyporaceae tribo Lentineae Fayod), tem ampla distribuição mundial, e espécies de ocorrência abundante nas regiões tropicais. Os basidiocarpos, ou corpos de frutificação, do gênero *Lentinus* são de consistência dura à coriácea e mais persistentes do que outros gêneros da ordem Agaricales. Devido à natureza resistente a períodos adversos de seca destas espécies, freqüentemente representam, o grupo dominante de fungos Agaricales em florestas tropicais (Pegler, 1975). A morfologia geral de *Lentinus* sp. pode ser extremamente variável, com basidiocarpos de crescimento lento, duradouro ou ambos e sujeitos à influência externa. Na maioria dos casos, o basidiocarpo apresenta estipe central e desenvolvido continuamente com o píleo. O basidiocarpo pode ser conspícuo, grande e robusto e o comprimento do estipe é aproximadamente igual ao diâmetro do píleo. A superfície do píleo é formada essencialmente por uma epiderme de hifa rastejante que se estende à margem e, conseqüentemente, em muitos casos, o píleo aparece viloso a hispido-estrigoso. Os pêlos da margem do píleo são característicos de muitas espécies deste gênero. O himênio lamelado é apresso ao píleo e decorrente para o estipe (Pegler, 1983).

Os basidiocarpos de *L. strigosus* coletados neste trabalho (Fig. 1 A-C) apresentaram píleo com 4-7 cm de diâmetro, convexo, subinfundibuliforme a infundibuliforme, circular a flabeliforme; superfície clara a ocrácea pálida, marrom em direção ao centro, violáceo no princípio, mudando de coloração depois para vermelho-violáceo e na maturidade para bege ou marrom claro, densamente viloso a hispido-estrigoso; margem encurvada, fina, ondulada a reta; coriácea, duro e seco com a maturidade; contexto branco, carnoso. Himênio ou lamelas decorrentes, branco, creme a ocrácea com a maturidade, com margens levemente discolores em tom mais escuro, apressas, com duas a três séries de lamélulas, esporada de coloração creme. Estipe central a subexcêntrica, cilíndrica ou ligeiramente mais espessa no ápice; levemente arroxeadada quando jovem escurecendo para bege ou marrom claro com a

maturidade, tomentoso, com tomento basal quando jovem. Os basidiocarpos coletados encontravam-se em ambiente aberto em substrato lignícola. *L. strigosus* ocorre embaixo de vegetação densa, assim como em habitats abertos (Castillo *et al.*, 2004). Nas Figuras 1D e 1E, hifas com grampos de conexão e esporos, respectivamente.

Comestibilidade da espécie

Os fungos silvestres têm grande importância etnomicológica por ser um alimento muito apreciado pelos indígenas de diversos grupos étnicos na América Central e, em geral, pelos camponeses de regiões onde se desenvolvem os fungos em grandes quantidades, principalmente, nos bosques úmidos (Herrera e Ulloa, 1990; Boa, 2004).

Fidalgo e Prance (1976), Fidalgo e Hirata, (1979) e Prance (1984) identificaram diferentes espécies de fungos comestíveis do gênero *Lentinus*, consumidos por indígenas Yanomami da Amazônia brasileira, entre os quais mencionam: *L. crinitus* (L.) Fr., *L. velutinus* Fr., *L. glabratus* Mont., *L. cubensis* (Berk. & M.A.) Curtis, *L. strigosus*. Assim como os indígenas Uitoto da região de Araracuara, Amazônia colombiana, consomem: *L. strigosus*, *L. concavus* (Berk.) Corner, *L. crinitus*, *L. scleropus* (Pers.) Fr. (Vasco, 2002).

Os fungos silvestres têm grande importância etnomicológica por ser um alimento muito apreciado pelos indígenas de diversos grupos étnicos na América Central e, em geral, pelos camponeses de regiões onde se desenvolvem os fungos em grandes quantidades, principalmente, nos bosques úmidos (Herrera e Ulloa, 1990; Boa, 2004).

Parte da coleta de basidiocarpos de *L. strigosus* realizada em março de 2007 foi degustada por Vargas-Isla R. e Ishikawa N. K., após preparada ao *sautéed* com margarina e um pouco de sal. As autoras relataram que o cogumelo apresenta sabor agradável, com elevado *umami** e textura ligeiramente fibrosa (Vargas-Isla e Ishikawa, *in press*).

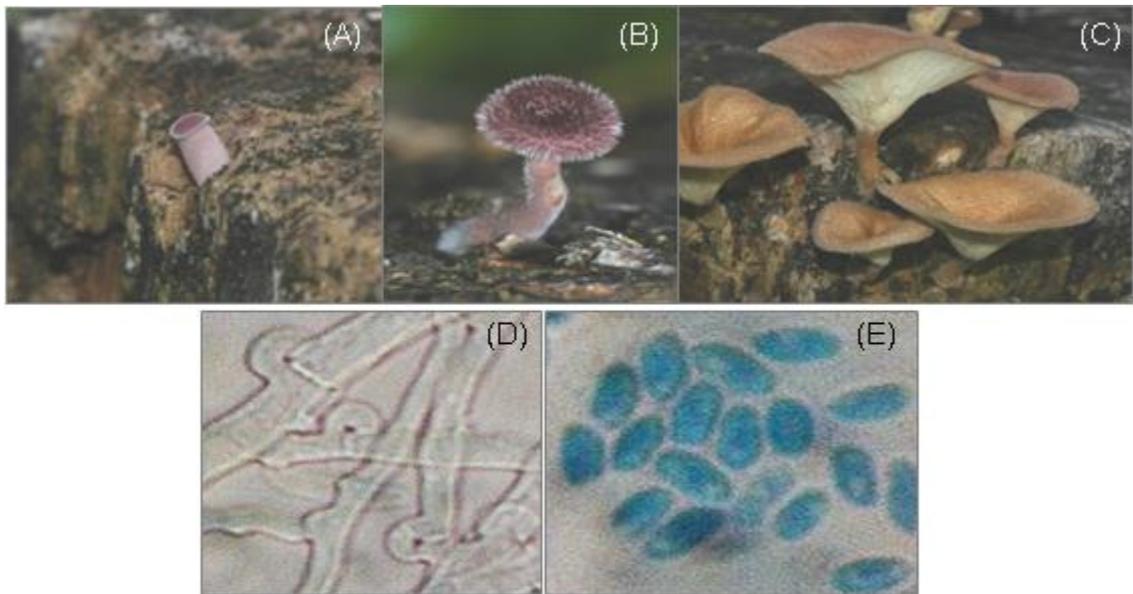


Fig. 1. *Lentinus strigosus* coletados na Amazônia Central. (A) e (B) Estágio jovem do basidiocarpo, (C) estágio maduro dos basidiocarpos, (D) hifas e grampos de conexão, (E) basidiósporos (400x).

Fungicultura

No comércio internacional, a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) estimou, em 1999, um volume de 272 mil toneladas de fungos comercializados, correspondendo a US\$ 775 milhões. O maior exportador mundial de cogumelos naquele ano foi a Holanda, com 63,7 mil toneladas seguida da China, com 50,1 mil toneladas, e os maiores importadores foram Inglaterra, Alemanha e Japão, que importaram 59,4 mil, 43,5 mil e 35,2 mil toneladas, respectivamente (Boa, 2004).

O mercado dos fungos silvestres como *L. strigosus* é difícil de ser caracterizado devido aos dados sobre o comércio agruparem espécies silvestres e cultivadas. Entretanto, uma estimativa da quantidade de fungos silvestres comercializados no mundo pode ser feita com os valores do mercado dos fungos desidratados que são registrados para exportação, podendo chegar até 74.000 dólares/tonelada/ano (Methodus Consultora SC., 2003).

A fungicultura, além de contribuir para a manutenção do equilíbrio ecológico e diminuição dos impactos sobre o meio ambiente, é uma das melhores formas de eliminar os resíduos e convertê-los em produtos orgânicos de alto valor gastronômico e nutricional (López, 1995; Regés, 1999).

De acordo com Dias *et al.* (2003), o consumo de cogumelos no Brasil é muito baixo. A falta de tradição e o preço relativamente elevado dos cogumelos no mercado são fatores determinantes dessa realidade. Entretanto, houve um aumento na produção de cogumelos nas últimas décadas, mantendo como ponto estratégico para seu consumo a redução dos custos de produção e baixos preços para o consumidor.

Os relatos dos primeiros povos a consumir cogumelos foram dos egípcios, romanos e gregos, na antiguidade. Já, o cultivo de cogumelos como o shiitake teve seu início há 1500

anos a.C. na China (Chang e Miles, 1987). Assim como o cultivo de *champignon* iniciou-se no século XVI na França, e em períodos mais recentes o cultivo de fungos difundiu-se pelos Estados Unidos, Canadá, México, Argentina, Colômbia, Brasil e Chile; e na década de 50 o cultivo de cogumelos foi introduzido no Brasil pelos asiáticos na região Mogi das Cruzes (Abe, 2006), mas ainda não constitui *commodity* importante no país.

Importância da “semente-inóculo”

“Semente-inóculo”, *spawn* (em inglês), é o termo comumente utilizado pelos produtores de cogumelos no Brasil para se referir ao micélio do fungo desenvolvido em substratos como grãos e/ou serragens que são utilizados para iniciar o cultivo de cogumelos.

Na fungicultura, a elaboração da “semente-inóculo” é o primeiro passo para se iniciar o cultivo de uma espécie de cogumelo, assim como a produção e a qualidade das mudas são importantes para o processo de reflorestamento.

A “semente-inóculo” constitui a base para o cultivo comercial dos fungos comestíveis e sua elaboração e/ou obtenção é um dos principais problemas dos produtores comerciais de fungos (Guzmán *et al.*, 1993). Para garantir a alta qualidade da “semente-inóculo” são necessárias condições estéreis e alto conhecimento do processo (Przybyłowicz e Donoghue, 1990). Segundo Chang e Hayes (1978) a manutenção e produção de “semente-inóculo” de alta qualidade é o primeiro ponto crítico para o sucesso do cultivo de fungos comestíveis.

Para o preparo da “semente-inóculo” de diferentes espécies de cogumelos, pode-se utilizar uma grande variedade de substratos. Segundo Salmones *et al.* (1999), pode-se utilizar material lignocelulósico como palha de arroz, palha de trigo, resíduos de algodão,

serragem de diversas madeiras, polpa de café, etc. Outros materiais utilizados são sementes (grãos) e farelos de diversas gramíneas como trigo, sorgo, milho e arroz (Rafique, 1998; Chaiyama *et al.*, 2007; Royse e Sanchez, 2007).

Philippoussis *et al.* (2001) e Silva *et al.* (2007) testaram substratos de sabugo de milho, palha de milho e casca de cevada, e obtiveram uma rápida colonização de micélios consistentes de *Pleurotus eryngii* e *P. sajor-caju*. Já Pedra e Marino (2006), utilizaram serragem de casca de coco verde para o preparo de inóculo de *P. ostreatus*, obtendo melhor crescimento micelial quando a serragem foi suplementada com farelo de trigo e/ou de arroz.

Substratos: disponibilidades regionais

A fungicultura é desenvolvida em diferentes países utilizando substratos de origem florestal e resíduos agroindustriais disponíveis localmente, considerando-se a espécie de cogumelo.

Na Amazônia Central existe uma grande diversidade de espécies florestais Vianez e Barbosa (2002) realizaram um estudo de alternativas de uso de resíduos gerados pela indústria madeireira e uma dessas alternativas foi o uso de resíduos para o cultivo de cogumelos. *Pleurotus ostreatus* e *L. edodes* foram cultivados em serragens de *Maquira coriacea* (Karsten) C.C. Berg (muiratinga), *Simarouba amara* Aubl. (marupá), *Brosimum parinarioides* Ducke (amapá), *Anacardium* sp. L. (cajuí) e *Protium* sp. Burm. (breu) e os melhores resultados foram obtidos com serragem de *S. amara* (Hanada, 2003).

Existe uma flexibilidade de uso de materiais na formulação de substratos para a produção de fungos comestíveis, sem que estes materiais alterem as características e qualidade das espécies (Royse e Sanchez, 2007). Assim, para a seleção do substrato, é

necessário conhecer os requerimentos para o melhor desenvolvimento do fungo e a disponibilidade do substrato.

Nas últimas décadas, foram realizados muitos estudos sobre o potencial de materiais diversos na formulação de substratos para o cultivo de fungos comestíveis, dos quais podem-se mencionar: espécies madeireiras como *Quercus serrata* Murray., *Q. glauca* Thunb., *Acer palmatum* Thunb., *Cryptomeria japonica* (L.f.) D. Don. e *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. (Tokimoto *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2004), palha de trigo ou sabugo de milho misturado com serragem de *Q. rubra* L. e *Q. alba* L. (Philippoussis *et al.*, 2003; 2007; Royse e Sanchez, 2007), resíduos de *Eucalyptus* sp. suplementados com farelo de trigo, arroz ou soja, para produção de *L. edodes* e *Pleurotus* spp. (Silva *et al.*, 2005).

Além das serragens de madeira foi testada a utilização de casca, polpa de café e grãos de sorgo para a elaboração do inóculo secundário de *L. edodes*, que foi inoculado em substratos de palha de cevada, sabugo de milho, farelo de arroz, brácteas da coroa de abacaxi, casca de café, bagaço e folhas de cana-de-açúcar avaliando a melhor eficiência biológica (Salmones *et al.*, 1999; Morais *et al.*, 2000; Eira *et al.*, 2005).

Investigações sobre o uso de misturas de substratos vegetais, com leguminosas como: *Guadua angustifolia* Kunth, *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit. e casca de arroz, no cultivo de *L. edodes*, forneceram indícios da melhor eficiência biológica (Sharma e Madan, 1993); também foi testado o uso de gramíneas como *Pennisetum purpureum* Schum. e *Brachiaria* sp. como substrato de *P. ostreatus* (Philippoussis *et al.*, 2001; Donini *et al.*, 2006; Bernardi *et al.*, 2007). Na região Sul de Minas Gerais foram avaliados diferentes resíduos agrícolas disponíveis para o cultivo de *P. sajor-caju* e a palha de feijão foi considerado o melhor resíduo para a produção deste cogumelo (Dias *et al.*, 2003). O uso da

serragem da casca de coco verde com suplementação de farelo de arroz e/ou trigo no cultivo de isolados de *P. ostreatus* foi favorável para a sua produção (Pedra e Marino, 2006).

Na Índia, Mandeel *et al.* (2005) testaram três espécies de *Pleurotus* spp. em resíduos lignocelulósicos incluindo papel, papel carbono, serragem e fibras vegetais que possibilitavam o cultivo comercial de *Pleurotus* sp., especialmente, *P. columbinus*, utilizando diferentes resíduos recicláveis, fáceis de serem obtidos e baratos. Também, foram realizados estudos sobre a possibilidade de uso de ervas daninhas como substrato para o cultivo de *P. ostreatus* (Das e Mukherjee, 2007).

Com relação aos substratos oriundos de madeiras amazônicas há grande carência de informações sobre os que melhor se adaptam ao processo de formação de “semente-inóculo” do cogumelo *L. strigosus*, de ocorrência natural na Amazônia. Esta pesquisa estabeleceu como prioridade identificar quais espécies madeireiras disponíveis na região possibilitam a formulação de substrato para a elaboração de “semente-inóculo” com potencial e uso para a produção deste cogumelo.

Fungo termófilo: vantagens para a fungicultura no Trópico Úmido

Kendrick (2000) define como fungos filamentosos termófilos, as espécies que apresentam temperatura mínima de crescimento acima de 20°C, máxima acima de 50°C, e temperatura ótima entre 35-50°C. Mswaka e Magan (1999), em estudos com basidiomicetos, determinaram três grupos baseados nas temperaturas ótima e máxima para o crescimento: (1) grupo de temperatura baixa com crescimento entre 25-30°C e sem crescimento acima de 37°C; (2) grupo intermediário com temperatura ótima entre 30-37°C sem crescimento a 45°C; e (3) grupo de temperatura alta com crescimento entre 37-40°C e sem crescimento a 55°C.

Lentinus strigosus é uma espécie exposta a grandes variações de temperatura (Castillo *et al.*, 2004). Estudos de Vargas-Isla e Ishikawa (*in press*) indicam *L. strigosus* como uma espécie termófila com crescimento micelial ótimo na temperatura a 35°C.

A busca pela domesticação de cogumelos comestíveis no Brasil tem grande potencial, sendo que a domesticação destas espécies permitirá sua produção e exploração comercial, levando o país a ter um produto nacional adaptado ao nosso clima e ambiente, competindo no mercado externo (Maki e Paccola-Meirelles, 2002).

A domesticação de uma espécie inicia-se com o isolamento e manutenção do inóculo *in vitro*. Entretanto, os protocolos de cultivo *in vitro* descritos na literatura são elaborados para espécies de clima temperado, sendo necessário a determinação de protocolos para as espécies de clima tropical.

No Brasil, a fungicultura é desenvolvida principalmente na região Sul e Sudeste, utilizando espécies de clima temperado e subtropical originárias da Europa e Ásia, como *A. bisporus*, *L. edodes* e *Pleurotus* spp. Já na região Norte, tropical, os custos para produção destas espécies seriam muito elevados.

Deste modo, a domesticação de uma espécie com características termófilas vem a ser uma grande vantagem para o desenvolvimento da fungicultura na Amazônia, uma vez que temperaturas acima de 30°C são comuns nos trópicos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar as condições de crescimento micelial em laboratório de *Lentinus strigosus* e elaborar formulações de substratos, utilizando como base serragens de espécies florestais da Amazônia.

Objetivos específicos

- Avaliação das condições ambientais e nutricionais para o crescimento e manutenção da cultura micelial *in vitro*.
- Elaboração de “semente-inóculo” do fungo *L. strigosus* utilizando como substrato serragens de espécies florestais da Amazônia.

REFERÊNCIAS*

- Abe, C. Revista da terra. Disponível em: <<http://www.revistadaterra.com.br/cogumelodosol.asp>>. Acesso em: 16/06/06.
- Albertó, E.; Gasoni, L. 2003. Producción de Hongos comestibles en la Argentina. IDIA XXI. Instituto Nacionai de Tecnología Agropecuaria-INTA, 5:70-76.
- Bernardi, E.; Donini, L.P.; Minotto, E.; Do Nascimento, J.S. 2007. Cultivation of three *Pleurotus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm. species on pasteurized elephant grass (*Pennisetum purpureum*) substrate. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 9(3-4): 373-378.
- Boa, E. 2004. Wild edible fungi. A global overview of their use and importance to people. FAO. Rome. 148pp.
- Castillo, G.; Nihoul, A.; Demoulin, V. 2004. Correlation between the *in vitro* growth response to temperature and the habitat of some lignicolous fungi from Papua New Guinea coastal forests. *Cryptogamie, Mycologie*, 25: 57-81.
- Chaiyama, V.; Petcharat, V.; Kritsaneepaiboon, P. 2007. Some morphological and physiological aspects and cultivation of *Continus comatus* (O. F. Müll.) Gray. *Songklanakarín Journal of Science and Technology*, 29(2): 261-274.
- Chang, S.T.; Hayes, W.A. 1978. The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press Inc. London, UK. 819pp.
- Chang, S.T.; Miles, P.G. 1987. Historical record of the early cultivation of *Lentinus* in China. *Mushroom Journal for the Tropics*, 7: 31-37.
- Das, N.; Mukherjee, M. 2007. Cultivation os *Pleurotus ostreatus* on weed plants. *Bioresource Technology*, 98: 2723-2726.
- Dias, E.S.; Koshikumo, E.M.S.; Schwan, R.F.; Silva, R. 2003. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 27(6): 1363-1369.
- Donini, L.P.; Bernardi, E.; Minotto, E.; Do Nascimento, J.S. 2006. Efeito da suplementação com farelos no crescimento *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* em meios à base de capim-elefante (*Pennisetum* spp.). *Arquivos do Instituto Biológico*, 73(3): 303-309.
- Eira, F.C.; Meirelles, W.F.; Paccola-Meirelles, L.D. 2005. Shiitake production in corn COB substrates. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 4(2): 1-15.
- Fidalgo, O.; Prance, G.T. 1976. The ethnomycology of the Sanama Indians. *Mycology*, 68: 201-210.
- Fidalgo, O.; Hirata, J.M. 1979. Etnomicologia Caiabi, Txicão e Txucarramãe. *Rickia*, 8: 1-5.
- Guzmán, G.; Mata, G.; Salmones, D.; Soto-Velazco, C.; Guzmán-Dávalos, L. 1993. El cultivo de los hongos comestibles. 1ª edição. México D. F. 245pp.
- Hanada, R.E. 2003. Seleção de resíduos de madeira da Amazônia como substrato para cultivo de fungos comestíveis. SBPC. Recife/PE. Impresso-CD.

* Referências de acordo com as normas da Revista Acta Amazônica.

- Hawksworth, D.L. 2001. Mushrooms: the extent of the unexplored potencial. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3: 82.
- Herrera, T.; Ulloa, M. 1990. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. 1ª edición. México D.F. 551pp.
- Hu, C.; Meguro, S.; Kawachi, S. 2004. Effects of physical properties of wood on the water activity of wood meal media for the cultivation of edible mushrooms. *The Japan Wood Research Society*, 50: 365-370.
- Hyde, K.D. 2001. Where are the missing fungi? Does Hong Kong have any answers? *Mycological Research*, 105(12): 1514-1518.
- Kendrick, B. 2000. The fifth kingdom. 3rd edn. Focus Publishing. Newburyport, USA. 373pp.
- López, A.R. 1995. Programa nacional de promoción de cultivo de los hongos comestibles. Centro de Genética Forestal. Univ. Ver. Xalapa, Veracruz, México. Disponible em: <<http://www.uv.mx/institutos/forest/hongos/setas.html>> Acceso em: 29/09/06.
- Maki, C.S.; Paccola-Meirelles, L.D. 2002. Characterization and cultivation of a wild mushroom species isolated in Brazil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 23: 77-82.
- Mandeel, Q.A., Al-Laith, A.A.; Mohamed, S.A. 2005. Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 601-607.
- Methodus Consultora SC. 2003. Proyecto de comercialización de productos forestales no maderables. Factores de éxito y fracaso. El mercado de los Hongos Silvestres. UNEP, WCMC. Mexico. 45pp.
- Morais, M.H.; Ramos, A.C.; Matos, N.; Santos Oliveira, E.J. 2000. Production of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) on lignocellulosic residues. *Food Science and Technology International*, 6(2): 123-128.
- Mswaka, A.Y.; Magan, N. 1999. Temperature and water potential relations of tropical *Trametes* and other wood-decay fungi from the indigenous forests of Zimbabwe. *Mycology Research*, 103: 1309-1317.
- Mueller, G.M.; Schmit, J.P.; Leacock, P.R.; Buyck, B.; Cifuentes, J.; Desjardin, D.E.; Halling, R.E.; Hjortstman, K.; Iturriaga, T.; Larsson, K.; Lodge, D.J.; May, T.W.; Minter, D.; Rajchenberg, M.; Redhead, S.A.; Ryvarden, L.; Trappe, J.M.; Watling, R.; Wu, Q. 2007. Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodiversity Conservation*, 16: 37-48.
- Pedra, W.N.; Marino, R.H. 2006. Cultivo axênico de *Pleurotus* spp. em serragem da casca de coco (*Cocos nucifera* Linn.) suplementada com farelo de arroz e/ou de trigo. *Arquivos do Instituto Biológico*, 73(2): 219-225.
- Pegler, D.N. 1975. The classification of the genus *Lentinus* Fr. (Basidiomycota). *Kavaka*, 3: 11-20.
- Pegler, D.N. 1983. The Genus *Lentinus*: A World Monograph. *Kew Bulletin Additional Series*, 10: 1-273.

- Philippoussis, A.N.; Zervakis, G.I.; Diamantopoulou, P.A. 2001. Bioconversion of agricultural wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17: 191-200.
- Philippoussis, A.N.; Diamantopoulou, P.A.; Zervakis, G.I. 2003. Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19: 551-557.
- Philippoussis, A.N.; Diamantopoulou, P.A.; Israilides, C. 2007. Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59(3 spec. iss.): 216-219.
- Prance, G.T. 1984. The use of edible fungi by Amazonian Indians. In: Prance, G.T.; Kallunki, J.A. (eds.) *Ethnobotany in the Neotropics. Advances in Economic Botany*, 1: 127-139.
- Przybylowicz, P.; Donoghue, J. 1990. *Shiitake growers handbook. The art and science of Mushroom cultivation*. Kendall/Hunt Pub. Co. USA. 217pp.
- Rafique, A. 1998. Preparation and evaluation of spawn for the cultivation of *Pleurotus* in Gujarat. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 57(3): 143-147.
- Regés, R. 1999. El cultivo de hongos la ecología y la situación actual. Centro de Estudios Ecológicos Argentino (CDEEA). Actualização 04/02/04. Disponível em: <<http://www.cdeea.com/loshongosylaecologia.htm>> Acesso em: 29/09/06.
- Rossi, I.H.; Monteiro, A.C.; Machado, J.O.; Barbosa, J.C. 2003. Supplementation of sugarcane bagasse with rice bran and sugarcane molasses for shiitake (*Lentinula edodes*) spawn production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34: 61-65.
- Royse, D.J.; Sanchez, J.E. 2007. Ground wheat straw as a substitute for portions of oak wood chips used in shiitake (*Lentinula edodes*) substrate formulae. *Bioresource Technology*, 98: 2137-2141.
- Salmones, D.; Mata, G.; Ramos, L.M.; Waliszewski, K.N. 1999. Cultivation of shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in several lignocellulosic materials originating from the subtropics. *Agronomie*, 19(1): 13-19.
- Sánchez, C. 2004. Modern aspects of mushroom culture technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6): 756-762.
- Schmit, J.P.; Mueller, G.M. 2007. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity Conservation*, 16: 99-111.
- Sharma, S.; Madan, M. 1993. Microbial protein from leguminous and non-leguminous substrates. *Acta Biotechnologica, Akademie Verlag GMBH*, 13 (2): 131-139.
- Silva, E.G.; Dias, E.S.; Siqueira, F.G.; Schwan, R.F. 2007. Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(1): 72-75.
- Silva, E.M.; Machuca, A.; Milagres, A.M.F. 2005. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. *Letters in Applied Microbiology*, 40: 283-288.

Soccol, C.R.; Vanderberghe, L.P.S. 2003. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, 13 (2-3): 205-218.

Tokimoto, K.; Fukuda, M.; Tsuboi, M. 1998. Effect of the physical properties of *Lentinula edodes* bedlogs on fruiting body production. *Mycoscience*, 39: 217-219.

Tonini, R.C.G.; Santos, F.; Ishikawa, N.K.; Tavares, L.B.B. 2007. Utilização de bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis*) Mart. Arecaceae como substrato de frutificação para o cultivo axênico de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler. *Revista Brasileira de Biociências*, 5 (2): 204-206.

Vargas-Isla, R.; Ishikawa, N.K. Optimum conditions of *in vitro* mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon. *Mycoscience*, *in press*.

Vasco, A.M.P. 2002. Estudio etnobiológico de los hongos macromicetes entre los Uitoto de la región de Araracuara (Amazonia Colombiana). Trabalho de dissertação para a obtenção do Título de Biólogo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá, Colombia. 248pp.

Vianez, B.F.; Barbosa, A.P. 2002. Projeto de Pesquisa: Estudo de alternativas de uso dos resíduos gerados pela indústria madeireira em Manaus e Itacoatiara, Estado do Amazonas. Relatório final. CPPF-INPA. Manaus/AM. 49pp.

Webster, J.; Weber, R.W.S. 2007. Introduction to Fungi. 3rd ed. Cambridge. UK. 841pp.

**2. Avaliação das condições ambientais e nutricionais para o
crescimento e manutenção da cultura micelial *in vitro***

ARTIGO 1

Vargas-Isla, R & Ishikawa, N K. Optimum conditions of *in vitro* mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon Mycoscience, (*in press*).

Manuscrito aceito em 27 de novembro de 2007.

Optimum conditions of *in vitro* mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon

Condições ótimas de crescimento micelial *in vitro* de *Lentinus strigosus*, um cogumelo comestível isolado na Amazônia Brasileira

Ruby Vargas-Isla, Noemia Kazue Ishikawa

Coordenação de Pesquisas em Tecnologia de Alimentos, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, 2936, Manaus, Amazonas – CEP: 69060-020, Brasil.

Autor para correspondência: Ishikawa N. K. - Tel: +55-92-36431890 Fax: +55-92-36431846

E-mail: noemia@inpa.gov.br

Resumo

Os protocolos de cultivo *in vitro*, descritos em literatura para cogumelos estão geralmente correlacionados com habitat de espécies de clima temperado, sendo necessário o estudo de protocolos para as espécies de clima tropical. Neste trabalho foram coletadas, isoladas e avaliadas as condições de crescimento micelial *in vitro* de *Lentinus strigosus* e correlacionando com as características do seu habitat. Estes resultados indicaram o uso de 35°C para incubação, pH inicial entre 5 a 7, sem iluminação, meio Sabouraud dextrose ágar e agitação para meio de cultura líquido como condições ótimas de crescimento micelial *in vitro* de *L. strigosus*.

Palavras-chave Basidiomiceto. Alta temperatura. *Lentinus strigosus*. Fungo termófilo

Abstract

The protocols of *in vitro* cultivation, described in the literature for mushrooms are usually correlated with temperate climate habitat, but it is necessary to study protocols for the species of tropical climate. In this article, we collected, isolated and evaluated the conditions of *in vitro* mycelial growth of *Lentinus strigosus* and correlated with the characteristics of its habitat. These results indicate as optimum conditions of *in vitro* mycelial growth for *L. strigosus* the use of 35°C for incubation, initial pH from 5 to 7, without illumination, Sabouraud Dextrose Agar medium and agitation for culture in liquid medium.

Key words Basidiomycete. High temperature. *Lentinus strigosus*. Thermophiles fungi

Introdução

Existem mais de 200 gêneros de macrofungos que contêm espécies de uso popular, devido a suas propriedades comestíveis. Estes são diferenciados entre os registros de cogumelos considerados simplesmente “comestíveis” e os que são considerados alimentos. Incluir todas as espécies comestíveis como alimento aumentaria o número de espécies consumidas pelas populações de todo o mundo (Boa 2004). Existem, aproximadamente, 100 espécies de fungo que podem ser cultivados (Boa 2004). O mercado comercial está dominado por *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Pilát, *Pleurotus* spp. (Fr.) P. Kumm., *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer, *Flammulina velutipes* (Curt.:Fr.) Singer e *Pholiota nameko* (T. Itô) S. Ito e S. Imai (Kendrick 2000; Sánchez 2004). Por outro lado, os fungos silvestres ainda não cultivados comercialmente têm grande importância etnomicológica porque constitui um alimento muito apreciado (Herrera e Ulloa 1990; Boa 2004). O potencial da diversidade de fungos nos ecossistemas tropicais vem sendo muito discutido, mas pouco explorado cientificamente (Hawksworth 2001; Mueller e Schmit 2007; Mueller *et al.*, 2007).

O gênero *Lentinus* Fr. (Polyporaceae tribo Lentineae Fayod) tem ampla distribuição mundial com espécies de ocorrência abundante nas regiões tropicais. Os basidiocarpos, ou corpos de frutificação, do gênero *Lentinus* são de consistência dura à coriácea e mais persistentes do que outros gêneros da ordem Agaricales. Devido à natureza resistente a períodos adversos de seca destas espécies, freqüentemente, representam o grupo dominante de fungos Agaricales em florestas tropicais (Pegler 1975). Estudos etnomicológicos têm identificado diferentes espécies de fungos comestíveis do gênero *Lentinus*, consumidos por grupos indígenas como os Yanomami na Amazônia brasileira: *Lentinus crinitus* (L.) Fr., *L. velutinus* Fr., *L. glabratus* Mont., *L. cubensis* Berk. e M.A. Curtis, *L. strigosus* (Schwein.) Fr. (Fidalgo e Prance 1976; Fidalgo e Hirata 1979; Prance 1984). Assim como os indígenas Uitoto da região de Aracuara na Amazônia colombiana, consomem: *L. strigosus*, *L. concavus* (Berk.) Corner, *L. crinitus*, *L. scleropus* (Pers.) Fr.

(Vasco 2002). Chang e Mao (1995) relatam que esta espécie pode ser cultivada. Nós degustamos este fungo ao *sautéed* com margarina e um pouco de sal, e consideramos o sabor agradável com elevado *umami* e ligeiramente fibroso.

A maioria dos cogumelos cultivados é originária de países de clima temperado, e os protocolos *in vitro* descritos em literatura estão correlacionados com o habitat destas espécies, entretanto, como as condições ambientais nos trópicos são diferentes, é necessário o estudo de protocolos para as espécies de clima tropical. Como comentado por Mswaka e Magan (1999), a temperatura ótima para o crescimento da maioria de fungos de madeira em decomposição de regiões temperadas estão entre 25 e 30°C. Estudos detalhados sobre a temperatura ótima de crescimento de espécies tropicais de fungos de madeira em decomposição são escassos. No Brasil, as espécies de cogumelos comestíveis cultivadas são originárias principalmente, da Europa e Ásia, como *A. bisporus*, *L. edodes* e *Pleurotus* spp. A fungicultura é mais desenvolvida na Região Sul e Sudeste do Brasil, onde o clima subtropical é mais adequado para a produção destas espécies. Na Região Norte de clima Tropical, os custos de produção para estas espécies são muito elevados, inviabilizando o seu cultivo em grande escala. Portanto, iniciamos pesquisas para domesticar e cultivar espécies adaptadas ao clima tropical utilizando como base resíduos agroflorestais da Amazônia, objetivando diminuir os custos de produção.

A domesticação de cogumelos comestíveis de ocorrência natural no Brasil permitirá sua produção e exploração comercial levando o país a ter um produto nacional adaptado ao nosso clima e ambiente competindo no mercado externo (Maki e Paccola-Meirelles 2002).

No presente trabalho, nós coletamos, isolamos e avaliamos as condições de crescimento micelial *in vitro* da espécie *L. strigosus* e correlacionando os resultados com as características do habitat deste cogumelo.

Material e métodos

Coleta, isolamento e identificação

Foram coletados basidiocarpos de *L. strigosus* em substrato lignícola no Campus III do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (3°5'31.6"S, 59°59'36.4"W), Manaus – AM – Brasil. O isolamento do micélio foi realizado com a inoculação de fragmentos do contexto do basidiocarpo em meio de cultura de batata dextrose ágar (BDA-Acumedica Manufacturers, USA), incubados a 25°C, na ausência de luz. Com parte da coleta foi confeccionada a exsicata para ser depositada na Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA. A espécie foi identificada com ajuda de literatura disponível (Stankovicová 1973; Pegler 1975; Pegler 1983).

Efeito da temperatura

Foi avaliado o crescimento micelial do isolado de *L. strigosus* nas temperaturas de 25, 30, 35, 40 e 45°C, em meio de cultura BDA. Em placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meio de cultura BDA foi inoculado com um disco de ágar com micélio (10 mm de diâmetro) e incubados durante cinco dias a 25°C.

Avaliação do peso da massa seca micelial em meio de cultura sólido

Foi avaliado o crescimento micelial pela medida do diâmetro da colônia e o peso da massa seca micelial no 5º e no 6º dia, respectivamente. As duas formas comuns de avaliar a taxa de crescimento micelial são: (1) aumento radial da colônia em meio sólido; e (2) aumento da massa seca de colônia cultivado em meio líquido. O primeiro tem a vantagem de obter registros seqüenciais do crescimento de cada colônia. O segundo é uma medida mais absoluta, mas só pode ser executado uma vez para cada colônia (Kendrick 2000). Neste trabalho adotamos uma metodologia que permitiu a avaliação do diâmetro da colônia e peso seco da mesma, cultivado em meio sólido. Para avaliação do peso da massa micelial seca, após o crescimento da colônia nos respectivos meios de cultura, a placa de Petri foi

colocada em forno microondas por 20 segundos para derretimento do meio. Em seguida, o micélio foi separado do meio por filtração e lavado com água destilada a uma temperatura aproximada de 60 °C. O micélio foi colocado em estufa a 105 °C até manter peso constante.

Efeito da agitação

Foi avaliado o efeito da agitação em meio de cultura líquido sobre o crescimento micelial de *L. strigosus*, utilizando batata dextrose (BD): infusão de 200 g de batata, 20 g de glicose e água destilada até completar o volume de 1000 ml (pH=6,0), esterilizada a 121 °C durante 15 minutos. Foram inoculados cinco discos de micélio em frascos de Erlenmeyer (250 ml) contendo 100 ml de BD. Para o tratamento de agitação, os frascos foram colocados em mesa agitadora TECNAL TE-140 (SP, Brasil) a 75 rpm. Como controle, outros frascos foram mantidos em condições estáticas. Ambos tratamentos foram incubados em condições ambientais a 25 ± 2 °C e iluminação natural. Depois de 15 dias de crescimento micelial, o micélio foi separado por filtração. A massa obtida foi colocada em estufa a 105 °C até peso constante.

Efeito do pH inicial do meio de cultura

Para avaliação do efeito do pH inicial do meio de cultura, foram inoculados cinco discos de micélio em frascos de Erlenmeyer (250 ml) contendo 100 ml de BD com os respectivos pH (4, 5, 6 e 7). O pH foi ajustado antes da esterilização com soluções de HCl e NaOH. Os frascos foram incubados a 35 °C, com agitação, condições ótimas observadas em experimentos prévios. Neste experimento o peso da massa seca foi obtido depois de dez dias de crescimento micelial.

Efeito da composição do meio de cultura

Foi avaliado o crescimento micelial de *L. strigosus* em meios de cultura sólidos: BDA (Acumedia Manufacturers), extrato de malte peptona ágar (EMPA) (3% extrato de malte

[Becton, Dickinson and Company, USA]; 0,3% peptona de soja [BIOBRÁS S.A., Brasil]; 1,5% ágar [Becton, Dickinson and Company]), Sabouraud dextrose ágar (SDA) (Becton, Dickinson and Company-BD), meio V8 (V8) (200 ml suco V8 [Campbell's, USA]; 1,5% ágar, 800 ml H₂O), e meio de cultura mínimo (MM) (Pontecorvo *et al.*, 1953). Foram esterilizados os frascos com o respectivo meio de cultura a 121 °C durante 15 minutos e o meio foi vertido em placas de Petri (90 mm de diâmetro), e inoculados com um disco de micélio. Este experimento também foi incubado a 35 °C. O crescimento micelial foi avaliado pela medida do diâmetro da colônia no 5^o dia. Foi avaliado o peso da massa micelial seca de acordo com a metodologia descrita na avaliação do peso seco em meio de cultura sólido.

Efeito da influência da luz

Para avaliação do efeito da influência da luz, meio BDA contido em placas de Petri foi inoculado com um disco de micélio e incubadas a 35 °C, o tratamento com luz foi de 24 horas de luz (1250 lux). A emissão de luz foi medida através de Illuminance meter IM-5 (Topcon, Japão). O tratamento sem luz foi realizado em uma caixa coberta. O crescimento de culturas no escuro foi avaliado apenas no término do experimento. Foi avaliado o crescimento micelial pela medida do diâmetro da colônia no 5^o dia, e o peso da massa seca micelial foi medido usando o procedimento de avaliação da temperatura. Para avaliação do crescimento micelial em meio líquido, cinco discos de micélio foram colocados em frascos de Erlenmeyer (250 ml) contendo 100 ml de meio BD, incubados a 35 °C e 75 rpm, durante dez dias. Tratamento com luz foi de 24 horas de luz e tratamento sem luz foi desenvolvido em frascos cobertos com folhas de papel alumínio. Após deste período, o micélio foi separado por filtração, obtendo o peso seco.

Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em cinco replicatas e duas repetições. Para análise estatística, os valores de peso e diâmetro de micélio foram submetidos a ANOVA e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Resultados e discussão

Microrganismo

Os basidiocarpos (Fig. 1) apresentaram píleo 4-7 cm de diâmetro, convexo, subinfundibuliforme a infundibuliforme, ou lateralmente espatulado; superfície clara a ocráceo pálido, marrom em direção ao centro, violáceo ou matizes purpúreos no princípio especialmente em direção das margens, densamente viloso a hispido-estrigoso; margem encurvada, fina, ondulada; contexto carnoso, branco. Lamelas decorrentes, branca a ocráceo com a maturidade, ou com matizes violáceos especialmente na borda, 1-2 mm largo, apressas, com 2 a 4 séries de lamélulas. Estipe excêntrico a lateral, raramente central, curto, cilíndrico ou ligeiramente mais espesso no ápice; levemente arroxeadado quando jovem escurecendo para bege ou marrom claro com a maturidade, tomentoso, com tomento basal quando jovem, estas características nos levaram a identificar este fungo como *L. strigosus*, considerando as descrições de Pegler (1983). *L. strigosus* é encontrado embaixo de vegetação densa, assim como em habitat semi-abertos, e exposto a grandes variações de temperatura (Castillo *et al.*, 2004). O isolado utilizado neste trabalho foi coletado no mês de novembro 2006 em habitat aberto sobre substrato lignícola.

Efeito da temperatura no crescimento

O efeito da temperatura no crescimento de *L. strigosus* em meio BDA nas temperaturas entre 25 a 45°C são mostradas na Fig. 2 e 3. Com base nos resultados da análise estatística

do diâmetro das colônias verificou-se que 35 e 40 °C foram as melhores temperaturas para o crescimento micelial, não diferindo a 5% de significância (Fig. 2A). No entanto, os resultados do peso seco da massa micelial mostraram diferença significativa entre 35 e 40 °C (Fig. 2B), esta medida de crescimento micelial indicou que a temperatura de 35°C proporcionou uma colônia com maior massa. Este experimento demonstra a vantagem da avaliação da massa seca da colônia em meio sólido por determinar o tamanho e a densidade da colônia sem a necessidade do cultivo em meio líquido. Mswaka e Magan (1999) em estudos com basidiomicetos determinaram três grupos, baseados na ótima e máxima temperatura para o crescimento: (1) *grupo de temperatura baixa* com temperaturas ótimas entre 25-30 °C e sem crescimento acima de 37 °C; (2) *grupo intermediário* com temperatura ótima entre 30-37 °C sem crescimento a 45 °C e (3) *grupo de temperatura alta* com crescimento entre 37-40 °C e o crescimento cessa a 55 °C. Kendrick (2000) define fungos termófilos as espécies com temperatura de crescimento mínima acima de 20 °C, máxima acima de 50 °C, e temperatura ótima entre 35-50 °C. Uma vez que houve crescimento a 45 °C, embora seja menor, a colônia alcançou 2,5 cm de diâmetro em cinco dias a 45 °C, deste modo consideramos este fungo no grupo de temperatura alta ou fungo termófilo. O que é bastante compreensível, uma vez que foi registrada a temperatura interna da tora onde o cogumelo foi coletado de 35 ± 3 °C ao meio dia. Este fato explica a correlação com a temperatura ótima obtida no laboratório. Castillo *et al.* (2004), estudou a correlação entre o crescimento *in vitro* em resposta à temperatura e o habitat de alguns fungos lignícolas da costa florestal de Papua Nova Guiné e obtiveram resultados similares para *L. strigosus*.

Efeito da agitação, pH inicial e luz no crescimento micelial

Para espécies aeróbicas, a aeração é uma das condições de cultivo mais importantes. Normalmente, basidiomicetos degradadores de madeira só crescem em madeiras onde o conteúdo de umidade não é maior de 60% (w/v). Portanto, eles são mais sensíveis à deficiência de oxigênio do que os fungos imperfeitos (Emelyanova 2005). Além disso, a

produção de biomassa, a intensidade da aeração e condições de agitação também influenciaram a forma do crescimento micelial (filamentos miceliais difusos ou micélios aglomerados: pelets) (Emelyanova 2005). Estes aspectos foram observados neste experimento (Tabela 1), o tratamento com agitação apresentou maior crescimento micelial comparado com a condição estacionária. Micélios aglomerados foram observados no tratamento com agitação.

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre pH 5, 6 e 7; no entanto, o pH 4 apresentou menor crescimento micelial (Tabela 2).

Existem muitos estudos sobre o efeito da luz no desenvolvimento de basidiomicetos, sendo este um fator essencial para a formação de corpo de frutificação (Chang e Hayes 1978; Leatham e Stahmann 1987; Matsumoto e Kitamoto 1987; Kitamoto *et al.*, 1999; Sakamoto *et al.*, 2004). Considerando que o lugar da coleta deste fungo foi totalmente iluminado (média de 61120 lx ao meio dia), sugere-se que a luz tenha forte influência na frutificação do mesmo. Porém, na avaliação da influência da luz no crescimento micelial em meio sólido não apresentou diferença significativa e no meio líquido a produção de biomassa foi maior na ausência de luz (Tabela 3).

Efeito do meio de cultura

O efeito do meio de cultura, o meio BDA mostrou maior diâmetro, considerando a medida do diâmetro da colônia no 5º dia de incubação. No entanto, na avaliação do peso seco da colônia, a maior produção de biomassa foi obtida no meio SDA (Fig. 4).

Assim, nós sugerimos como condições ótimas de crescimento micelial *in vitro* de *L. strigosus*, o uso de meio SDA com pH inicial entre 5 a 7, temperatura de incubação de 35°C, sem iluminação e com agitação para cultivo em meio líquido.

Agradecimentos Os autores agradecem ao MSc Ricardo Braga-Neto na descrição, como também ao Dr Armando López Ramírez e Dr Eiji Nagasawa pelas discussões úteis na identificação do cogumelo. Ao Dr José Antonio Alves Gomes e Dra Gislene Almeida Carvalho-Zilse pelo suporte administrativo na aquisição de equipamentos utilizados neste estudo. Vargas-Isla, R agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa de estudo.

Referências*

- Boa E (2004) Wild edible fungi. A global overview of their use and importance to people. FAO. Rome
- Castillo G, Nihoul A, Demoulin V (2004) Correlation between the *in vitro* growth response to temperature and the habitat of some lignicolous fungi from Papua New Guinea coastal forests. *Cryptogamie, Mycologie* 25:57-81
- Chang ST, Mao X (1995) Hong Kong mushrooms. Chinese University of Hong Kong, Hong Kong
- Chang ST, Hayes WA (1978) The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press Inc, London
- Emelyanova EV (2005) Effects of cultivation conditions on the growth of the basidiomycete *Coriolus hirsitus* in a medium with pentose wood hydrolyzate. *Process Biochem* 40:1119-1124
- Fidalgo O, Prance GT (1976) The ethnomycology of the Sanama Indians. *Mycology* 68:201-210
- Fidalgo O, Hirata JM (1979) Etnomicologia Caiabi, Txicão e Txucarramãe. *Rickia* 8:1-5
- Hawksworth DL (2001) Mushrooms: the extent of the unexplored potencial. *Intern J Med Mushrooms* 3:82

* Referências de acordo com as normas da Revista Mycoscience.

- Herrera T, Ulloa M (1990) El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. 1st edn. México
- Kendrick B (2000) The fifth kingdom. 3rd edn. Focus Publishing. Newburyport, USA
- Kitamoto Y, Akita K, Horikoshi T (1999) Effects of high-temperature treatment on two essential Light processes and a intervening dark process in photoinduced pileus primordium formation of a basidiomycete, *Favolus arcularius*. *Mycoscience* 40:103-108
- Leatham GF, Stahmann MA (1987) Effect of light and aeration on fruiting of *Lentinula edodes*. *Trans Br Mycol Soc* 88:9-20
- Maki CS, Paccola-Meirelles LD (2002) Characterization and cultivation of a wild mushroom species isolated in Brazil. *Semina: Ciênc Biol Saúde* 23:77-82
- Matsumoto T, Kitamoto Y (1987) Induction of fruit-body formation by water-flooding treatment in sawdust cultures of *Lentinus edodes*. *Trans Mycol Soc Japan* 28:437-443
- Mswaka AY, Magan N (1999) Temperature and water potential relations of tropical *Trametes* and other wood-decay fungi from the indigenous forests of Zimbabwe. *Mycol Res* 103:1309-1317
- Mueller GM, Schmit JP (2007) Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodivers Conserv* 16:1-5
- Mueller GM, Schmit JP, Leacock PR, Buyck B, Cifuentes J, Desjardin DE, Halling RE, Hjortstman K, Iturriaga T, Larsson K, Lodge DJ, May T W, Minter D, Rajchenberg M, Redhead S A, Ryvarde L, Trappe JM, Watling R, Wu Q (2007) Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodivers Conserv* 16:37-48
- Pegler DN (1975) The classification of the genus *Lentinus* Fr. (Basidiomycota). *Kavaka* 3:11-20
- Pegler DN (1983) The genus *Lentinus*: A world monograph. *Kew Bull Add Ser* 10:1-273
- Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, McDonald KD, Bufton AWJ (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* 5:141-238

- Prance GT (1984) The use of edible fungi by Amazonian Indians. In: Prance GT, Kallunki JA (eds) Ethnobotany in the Neotropics. *Adv Econ Bot* 1:127-139
- Sakamoto Y, Tamai Y, Yajima T (2004) Influence of light on the morphological changes that take place during the development of the *Flammulina velutipes* fruit body. *Mycoscience* 45:333-339
- Sánchez C (2004) Modern aspects of mushroom culture technology. *Appl Microbiol Biot* 64:756-762
- Stankovicová L (1973) Hyphal structure in some pleurotoid species of Agaricales. *Nova Hedwigia* 24:61-120
- Vasco AMP (2002) Estudio etnobiológico de los hongos macromicetes entre los Uitoto de la región de Araracuara (Amazonía Colombiana). MSc thesis, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Bogotá

Legendas das tabelas

Tabela 1. Efeito da agitação no crescimento micelial de *Lentinus strigosus* em meio líquido de batata dextrose

*Peso seco da colônia no 15^o dia de incubação a 25±2°C e 75 rpm de agitação. ^(a)Médias com a mesma letra(s) sobrescrita não diferem significativamente ($p<0,05$) pelo teste de Tukey. Média de cinco replicatas.

Tabela 2. Efeito do pH inicial do meio de cultura no crescimento micelial de *Lentinus strigosus*

*Peso seco da colônia no 10^o dia em meio batata dextrose incubado a 35°C e 75 rpm de agitação. ^(a)Médias com a mesma letra(s) sobrescrita não diferem significativamente ($p<0,05$) pelo teste de Tukey. Média de cinco replicatas.

Tabela 3. Efeito da luz no crescimento micelial de *Lentinus strigosus* em meio sólido e meio líquido de batata dextrose

*Diâmetro da colônia em meio sólido no 5^o dia de incubação. **Peso seco da colônia no 6^o dia de incubação. ***Peso seco da colônia no 10^o dia de incubação com 75 rpm de agitação. A temperatura de incubação foi 35°C. ^(a)Médias com a mesma letra(s) sobrescrita não diferem significativamente ($p<0,05$) pelo teste de Tukey. Média de cinco replicatas.

Legendas de figuras

Fig. 1. Basidiocarpos de *Lentinus strigosus* coletados em substrato lignícola. (A) estágio jovem, (B) estágio maturo de basidiocarpos.

Fig. 2. Crescimento micelial de *Lentinus strigosus* em batata dextrose ágar incubado em diferentes temperaturas. ^(a)Médias com a mesma letra(s) sobrescrita não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Média de cinco replicatas. (A) Diâmetro da colônia (cm) no 5^o dia, (B) Peso seco da colônia (mg/placa) no 6^o dia.

Fig. 3. Colônia micelial de *Lentinus strigosus* no 5^o dia de incubação nas temperaturas: (da esquerda para a direita) 25, 30, 35, 40 e 45°C, em meio de cultura batata dextrose ágar.

Fig. 4. Crescimento micelial de *Lentinus strigosus* em diferentes meios de cultura incubados a 35°C. BDA=batata dextrose ágar, EMPA=extrato de malte peptona ágar, SDA=Sabouraud dextrose ágar, V8=meio suco V8, MM=meio mínimo. ^(a)Médias com a mesma letra(s) sobrescrita não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Média de cinco replicatas. (A) Diâmetro da colônia (cm) no 5^o dia, (B) Peso seco da colônia (mg/placa) no 6^o dia.

Tabela 1. Efeito da agitação no crescimento micelial de *Lentinus strigosus* em meio líquido de batata dextrose

Tratamento	Peso seco da colônia* (mg/frasco)
Com agitação	413,4 ± 22,9 a
Sem agitação	286,9 ± 54,7 b

*Peso seco da colônia no 15^o dia de incubação a 25±2°C e 75 rpm de agitação. (a) Médias com a mesma letra(s) sobrescrita não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Média de cinco replicatas.

Tabela 2. Efeito do pH inicial do meio de cultura no crescimento micelial de *Lentinus strigosus*

pH	Peso seco da colônia* (mg/frasco)
4	246,5 ± 21,2 ^b
5	324,6 ± 25,9 ^a
6	283,9 ± 31,3 ^{ab}
7	332,8 ± 39,1 ^a

*Peso seco da colônia no 10^o dia em meio batata dextrose incubado a 35°C e 75 rpm de agitação. (a) Médias com a mesma letra(s) sobrescrita não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Média de cinco replicatas.

Tabela 3. Efeito da luz no crescimento micelial de *Lentinus strigosus* em meio sólido e meio líquido de batata dextrose

Tratamento	Diâmetro da colônia* (cm)	Peso seco da colônia (mg/placa ou frasco)	
		meio sólido**	meio líquido***
Com luz	7,49 ± 0,749 ^a	228,9 ± 13,9 ^a	369,44 ± 1,8 ^b
Sem luz	7,91 ± 0,252 ^a	203,5 ± 7,2 ^a	397,04 ± 1,1 ^a

*Diâmetro da colônia em meio sólido no 5^o dia de incubação. **Peso seco da colônia no 6^o dia de incubação. ***Peso seco da colônia no 10^o dia de incubação com 75 rpm de agitação. A temperatura de incubação foi 35°C. (a) Médias com a mesma letra(s) sobrescrita não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Média de cinco replicatas.



Fig.1

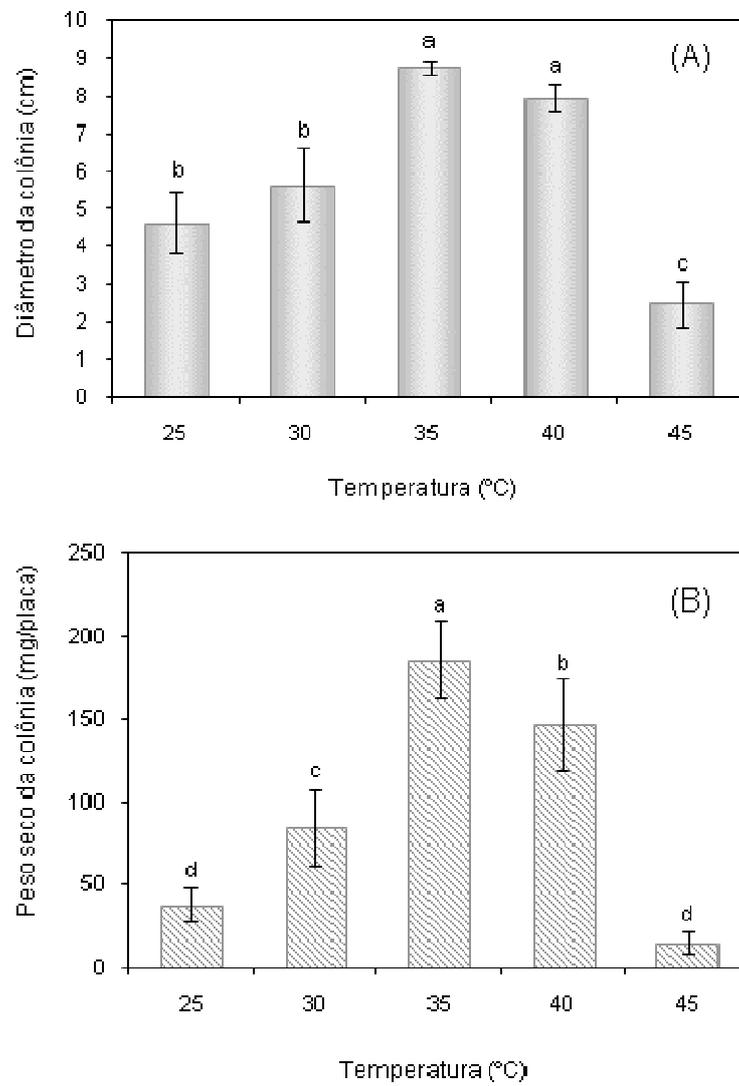


Fig. 2

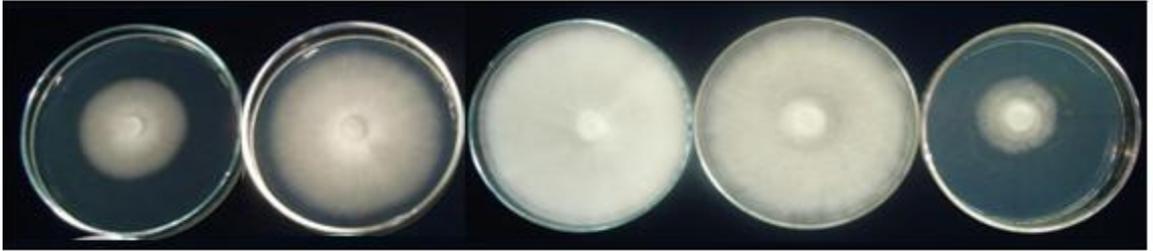


Fig. 3

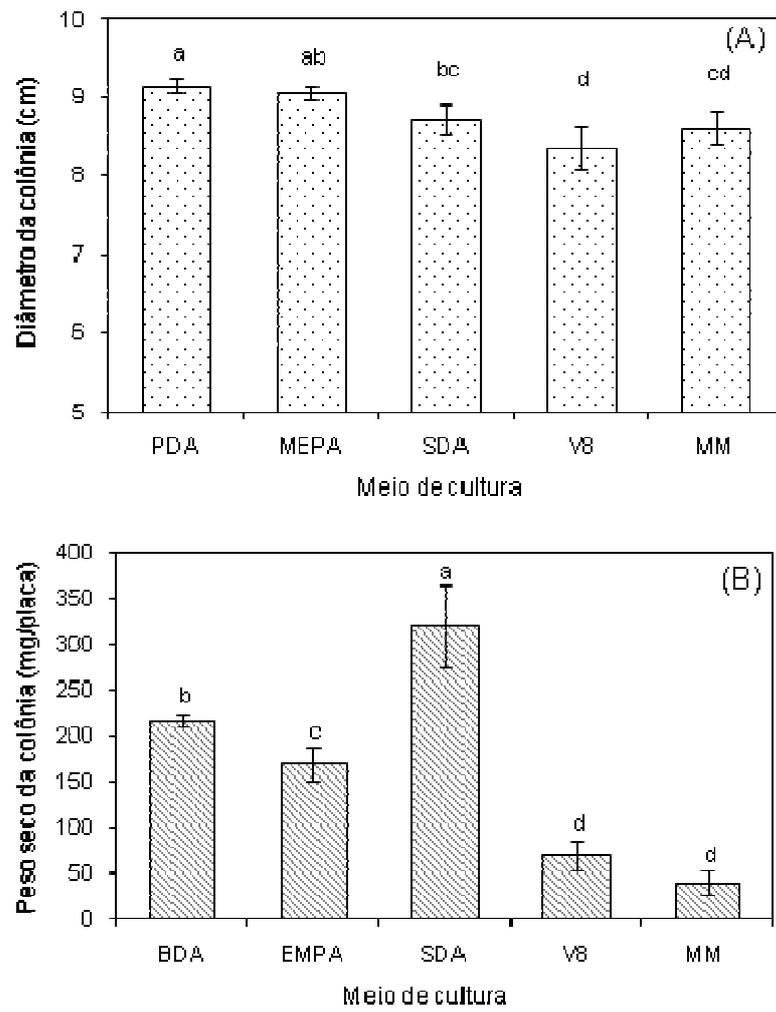


Fig. 4

**3. Elaboração de “semente-inóculo” do fungo *Lentinus strigosus*
com base em serragens de espécies florestais da Amazônia**

ARTIGO 2

Vargas-Isla, R; Hanada, R E & Ishikawa, N K. Elaboração de “semente-inóculo” de *Lentinus strigosus*, um cogumelo comestível termófilo isolado na Amazônia Brasileira.

Manuscrito não publicado.

Elaboração de “semente-inóculo” de *Lentinus strigosus*, um cogumelo comestível termófilo isolado na Amazônia Brasileira.

Ruby Vargas-Isla¹, Rogério Eiji Hanada², Noemia Kazue Ishikawa¹

¹Coordenação de Pesquisas em Tecnologia de Alimentos, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, 2936, Manaus, Amazonas – CEP: 69060-020, Brasil.

²Coordenação de Pesquisas de Produtos Florestais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, 2936, Manaus, Amazonas – CEP: 69060-020, Brasil.

Autor para correspondência: Ishikawa N. K. - Tel: +55-92-36431890 Fax: +55-92-36431846

E-mail: noemia@inpa.gov.br

Resumo

A espécie de cogumelo comestível *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr. de ocorrência natural na Amazônia apresenta características de fungo filamentosso termófilo, ou seja, temperatura ótima de crescimento micelial a 35°C. Este aspecto faz desta espécie uma alternativa vantajosa para o cultivo em climas tropicais. Por outro lado, questões relativas ao aproveitamento dos resíduos gerados pelas indústrias madeireiras na região Amazônica têm sido abordadas, principalmente, com relação à poluição do meio ambiente. Uma das possibilidades de obter produtos de qualidade a partir do aproveitamento de resíduos madeireiros, como a serragem, é a fungicultura, considerada uma ótima alternativa de bioconversão de resíduos lignocelulósicos em alimento de alto valor nutricional e gastronômico. Neste estudo foi avaliado o potencial de uso de serragens de onze espécies florestais da Amazônia para a elaboração de “semente-inóculo” *L. strigosus*. Para tanto, avaliou-se o crescimento micelial de *L. strigosus* em formulações com as serragens de: *Hymenolobium petraeum* Ducke (Angelim pedra), *Hura crepitans* L. (Assacu), *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Castanheira), *Cedrela odorata* L. (Cedro), *Bombacopsis quinata* (Jacq.) Dugand. (Cedro doce), *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá), *Ocotea cymbarum* Kunth (Louro canela), *Simarouba amara* Aubl. (Marupá), *Astronium lecointei* Ducke (Muiracatiara), *Aniba rosaeodora* Ducke (Pau rosa) e *Caryocar* sp. (Piquiarana) e duas espécies comumente utilizadas na fungicultura (*Eucalyptus* sp. e *Quercus acutissima* Carr.) suplementadas com 20% (w/w) de farelo de arroz. Os substratos à base de serragem de *B. quinata* e *S. amara* promoveram maiores crescimentos miceliais ($p < 0,05$). Em uma segunda etapa, avaliou-se o crescimento micelial em *S. amara* suplementado com sete diferentes fontes de nitrogênio (20% w/w): farelo de arroz, extrato de soja, levedura de cerveja, farinha de casca de maracujá, fibra de soja, fibra de trigo e gérmen de trigo. Como controle, serragem pura. Todas as suplementações favoreceram o crescimento micelial de *L. strigosus*. Para a produção de “semente-inóculo” foram testados sacos e frascos de polipropileno utilizando serragens de *S. amara*, *H. petraeum* e *A. lecointei* suplementados com farelo de arroz, após 25 dias de inoculação os substratos estavam totalmente colonizados em todas as embalagens testadas, para a escolha da embalagem foram considerados custos das embalagens; tempo de colonização; viabilidade de transporte e praticidade de inoculação do micélio no substrato. Mediante estes resultados, a “semente-inóculo” de *L. strigosus* foi elaborada com sucesso, utilizando-se serragem de *S. amara* suplementado com 20% (w/w) de farelo de arroz, incubados a 35°C por 25 dias, no escuro, nas três embalagens testadas.

Palavras chave: Serragem. Basidiomiceto. Espécies florestais. “Semente-inóculo”. *Panus rudis*.

Abstract

The edible mushroom *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr. presents characteristics of thermophile filamentous fungus, in the other words, optimum temperature of micelial growth at 35°C. This aspect makes of this specie an advantageous alternative for the cultivation in the tropical climate. On the other hands, questions relatives to the use of the wastes generated by the woody industries in the Amazon have been approached, mainly, with relationship to the pollution of the environment. A possibility to obtaining high quality products starting from the use of forestry residues, as sawdust, the fungiculture considered a great alternative of bioconversion of residues lignocelulolitics in food of high nutritional and gastronomic value. In this study, the potential of use of sawdust of eleven forestry species of the Amazon was evaluated for the elaboration of spawn of *L. strigosus*. Therefore, the micelial growth of *L. strigosus* was evaluated in sawdust with bran rice formulations of: *Hymenolobium petraeum* Ducke (Angelim pedra), *Hura crepitans* L. (Assacu), *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Castanheira), *Cedrela odorata* L. (Cedro), *Bombacopsis quinata* (Jacq.) Dugand. (Cedro doce), *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá), *Ocotea cymbarum* Kunth (Louro canela), *Simarouba amara* Aubl. (Marupá), *Astronium lecointei* Ducke (Muiracatiara), *Aniba rosaeodora* Ducke (Pau rosa) and *Caryocar* sp. (Piquiarana) and two species commonly used in fungiculture (*Eucalyptus* sp. and *Quercus acutissima* Carr.), they were supplemented with 20% (w/w) of rice bran. The substrates formulated with sawdust of *B. quinata* and *S. amara* promoted higher mycelial growth ($p < 0.05$). In the second phase, the mycelial growth in *S. amara* supplemented with seven different sources of nitrogen (20% w/w) was evaluated: rice bran, soy extract, beer yeast, passion fruit shell flour, soy fiber, wheat fiber and wheat germ. As control was utilized pure sawdust. All the supplements favored the mycelial growth of *L. strigosus*. Bags and flasks of polypropylene were tested for spawn production and utilizing sawdust of *S. amara*, *H. petraeum* and *A. lecointei* supplemented with rice bran, after 25 days of inoculation the substrates were totally colonized in all the packings tested. For choice of the packing should be considered costs of the packings; time of colonization; transport viability and feasibility of mycelial inoculation on the substratum. By these results, the "spawn" of *L. strigosus* was elaborated with success, being used sawdust of *S. amara* supplemented with 20% (w/w) of rice bran, incubated at 35°C during 25 days, in the dark, , in three tested packings.

Key words Sawdust. Basidiomycete. Forestry species. Spawn. *Panus rudis*

Introdução

A Amazônia apresenta um cenário favorável para o desenvolvimento da fungicultura, pois reúne a diversidade nativa de espécies de cogumelos comestíveis e substratos lignocelulósicos em abundância. No entanto, as poucas tentativas de desenvolver esta atividade na região foram realizadas com espécies tradicionalmente cultivadas em climas temperados e subtropicais, o que demanda altos custos com a climatização e inviabilizando a atividade. Sendo assim, a domesticação de espécies regionais vem a ser uma alternativa para viabilizar a produção de cogumelos na Amazônia.

Em novembro de 2006, foi coletado basidiocarpo e isolado micélio da espécie *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr. (= *Panus rudis* Fr.) no Campus III do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus - AM – Brasil, o qual apresentou características de fungo filamentoso termófilo, com crescimento em temperaturas de 25 a 45°C, sendo a temperatura de crescimento ótima, 35°C (Vargas-Isla e Ishikawa, *in press*). A domesticação de uma espécie com características termófilas vem a ser uma grande vantagem para o desenvolvimento da fungicultura na Amazônia, uma vez que temperaturas acima de 30°C são comuns nos trópicos. Além disso, o fato de ser uma temperatura atípica para fungos conhecidamente prejudiciais na fungicultura, como algumas espécies de *Trichoderma* spp. que têm crescimento ideal a 20-25°C e cessa o crescimento a 35°C, esta condição poderá ser uma vantagem do *L. strigosus* em relação aos fungos competidores.

A espécie *L. strigosus* tem uma ampla distribuição mundial apresentando vários ecotipos. A comestibilidade desta espécie tem sido reportada em estudos etnomicológicos de povos indígenas da Amazônia (Fidalgo e Prance 1976; Fidalgo e Hirata 1979; Prance 1984; Vasco 2002). Parte da coleta de basidiocarpos de *L. strigosus* realizada em março de 2007 foi degustada por Vargas-Isla R e Ishikawa NK, após preparada ao *sautéed* com

margarina e um pouco de sal. As autoras relataram que o cogumelo apresenta sabor agradável com elevado *umami* e consistência ligeiramente fibrosa.

Além dos aspectos gastronômicos, nutritivos e medicinais de algumas espécies de fungos macroscópicos, o cultivo de cogumelos (fungicultura) favorece o aproveitamento dos resíduos gerados pelas indústrias agroflorestais como: serragens (Hanada 2003; Silva *et al.*, 2005; Philippoussis *et al.*, 2007); bagaço de cana (Soccol e Vandenberghe 2003; Rossi *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2007); sabugo de milho (Salmones *et al.*, 1999; Philippoussis *et al.*, 2003, 2007); bainha de palmito (Tonini *et al.*, 2007) e gramíneas (Philippoussis *et al.*, 2001). O processo de bioconversão ajuda a prevenir a contaminação ambiental causada pelo acúmulo de resíduos agroflorestais, sendo umas das melhores alternativas de conversão de resíduos madeireiros em alimentos (Silva *et al.*, 2005; Mandeel *et al.*, 2005). Os substratos utilizados na fungicultura variam de acordo com as espécies de cogumelos e a disponibilidade nos locais onde são cultivados (Albertó e Gasoni 2003).

“Semente-inóculo”, *spawn* (em inglês), é o termo comumente utilizado pelos produtores de cogumelos no Brasil para se referir ao micélio do fungo desenvolvido em substratos como grãos e/ou serragem, que é utilizado como inóculo inicial do cultivo de cogumelo.

A produção e manutenção de “semente-inóculo” de alta qualidade é o primeiro ponto crítico para o sucesso do cultivo de fungos comestíveis (Chang e Hayes, 1978; Guzmán *et al.*, 1993; Przybylowicz e Donoghue, 1990). No Brasil, o limitado número de consumidores de cogumelos, a reduzida e descontínua produção de cogumelos e a carência de mão de obra especializada, são aspectos que agravam os problemas de elaboração de “semente-inóculo”.

O presente trabalho objetivou avaliar o crescimento micelial em serragens de onze espécies florestais regionais e a influência de sete diferentes suplementações como fonte de nitrogênio para a elaboração de “semente-inóculo” utilizando três tipos de embalagens.

Material e métodos

Microorganismo

O isolado de *L. strigosus* (CCA-01) utilizado neste estudo foi coletado em substrato lignícola no Campus III do INPA, Manaus-AM. A cultura estoque foi mantida em meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SDA- Becton, Dickinson and Company-BD, USA) em tubos de ensaio, a 25°C e na ausência de luz. O micélio da cultura estoque foi cultivado a 35°C em placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meio SDA. Após cinco dias de crescimento, discos miceliais de 10 mm de diâmetro foram retirados e utilizados como inóculo dos experimentos (Vargas-Isla e Ishikawa, *in press*).

Crescimento micelial em serragens

As serragens de espécies florestais da Amazônia utilizadas neste trabalho foram selecionadas entre as espécies apontadas como as principais geradoras de resíduos madeireiros da Amazônia Central (Vianez e Barbosa, 2002). Serragem de *Eucalyptus* sp. foi incluída por se tratar da espécie florestal comumente utilizada para o cultivo do cogumelo comestível *L. edodes* no Sul e Sudeste do Brasil (Paula *et al.*, 2001; Queiroz *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005; Shiomi *et al.*, 2007), assim como *Quercus acutissima*, que é utilizada na Ásia (Quimio *et al.*, 1990; Przybylowicz e Donoghue 1990) (Tabela 1). A formulação do substrato foi composta por 100 g de serragem, acrescida de 20% (w/w) de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) e água destilada para umidecer até aproximadamente 60% (w/v). Em placas de Petri (90 mm de diâmetro), 15 g do substrato foram esterilizados duas vezes por 1 hora a 121°C, com intervalo de 24 horas. O substrato foi inoculado com um disco de ágar

com micélio (10 mm de diâmetro), depositado no centro da placa, e incubado a 35°C na ausência de luz. O crescimento micelial foi avaliado pelo cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) = $\sum (D-D_a)/N$ (onde D = diâmetro atual da colônia; D_a = diâmetro da colônia no dia anterior; N = número de dias após a inoculação) (Oliveira apud Dias *et al.*, 2005).

Suplementações

Utilizando-se a metodologia descrita acima para estimar o crescimento micelial em diferentes serragens, avaliou-se o desenvolvimento micelial de *L. strigosus* em serragem de *S. amara* suplementada com 20% (w/w) de: farelo de arroz, farelo de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), extrato de soja, fibra de trigo (*Triticum aestivum* (L.) Thell.), gérmen de trigo, levedo de cerveja e farinha de casca de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) e como controle, serragem pura.

Elaboração de “semente-inóculo”

Em uma primeira etapa, o micélio foi multiplicado em grãos de trigo. Para tanto, 250 g de grãos de trigo lavadas e imersos em água durante 24 horas foram colocados em frascos de vidro de 500 ml e esterilizados em autoclave a 121°C por 1 hora, conforme metodologia descrita por Stamets (1993). Dez discos miceliais (10 mm de diâmetro) de *L. strigosus* foram transferidos para cada frasco contendo os grãos de trigo que foram incubados a 35°C por 15 dias.

Em uma segunda etapa, as serragens das espécies florestais *Simarouba amara*, *Hymenolobium petraeum* e *Astronium lecointei* onde se obtiveram os melhores resultados de crescimento micelial foram utilizadas para elaboração de “semente-inóculo”. As serragens suplementadas com 20% (w/w) de farelo de arroz foram colocadas em três tipos de embalagens descritas na Tabela 2. Os substratos foram esterilizados duas vezes por 1

hora a 121 °C, com intervalo de 24 horas. Para cada 100 g de substrato foram colocados 3,5 g de grãos de trigo colonizados. Estes foram incubados a 35 °C durante 25 dias, na ausência de luz. Após este período, os substratos colonizados foram retirados das embalagens e os blocos foram cortados para observação da colonização do substrato.

Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos com cinco replicatas por tratamento. Os dados foram submetidos a ANOVA e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Resultados e discussão

Crescimento micelial em serragens

Os substratos formulados com *S. amara* e *B. quinata* proporcionaram os melhores IVCM ($p < 0,05$) e a colônia atingiu a borda da placa de Petri em apenas cinco dias (Fig. 1 e 2), após a inoculação. Entretanto, pode-se considerar que todas as espécies de madeira avaliadas permitiram o crescimento micelial apresentando potencial de uso para a formulação da “semente-inóculo” de *L. strigosus*, uma vez que mesmo nas serragens de *O. cymbarum* e *H. crepitans* com IVCM menores ($p < 0,05$), a colônia atingiu a borda da placa de Petri (90 mm de diâmetro) em dez dias, apresentando ótimo vigor. Ishikawa e Paccolla-Meirelles (1995) relatam o diâmetro da colônia de *Lentinula edodes* de 7 ± 1 cm em nove dias de incubação utilizando serragem de *Eucalyptus* sp., suplementada com 10% (w/w) de farelo de arroz.

Este resultado indica que a amplitude de espécies florestais da Amazônia possíveis de serem utilizados como substratos lignocelulósicos para o cultivo de *L. strigosus* é grande,

sendo mais um fator favorável ao estudo desta espécie para a fungicultura no Trópico Úmido.

Diferentes suplementações no substrato à base de serragem de S. amara

Uma vez que serragem de *S. amara* foi uma das espécies que se destacou no crescimento e também por ser encontrada com maior frequência nas serrarias, esta foi utilizada para a avaliação da influência da suplementação. A serragem desta espécie suplementada com 20% (w/w) de farelo de arroz foi a melhor formulação de substrato para a elaboração de “semente-inóculo” de *L. strigosus*. Entretanto, todas as espécies florestais analisadas demonstraram potencial de uso para a fungicultura, assim como todas as suplementações utilizadas podem ser consideradas para melhorar o vigor micelial e/ou IVCM (Fig. 3 e 4) para a elaboração de “semente-inóculo”.

Na Fig. 3 é apresentada a diferença no aspecto de *L. strigosus* cultivado em serragem pura de *S. amara* (Fig. 3A) em relação aos demais tratamentos suplementados com diferentes fontes de nitrogênio. Indicando que, embora o IVCM não tenha apresentado diferença significativa ($p < 0,05$) (Fig. 4), as suplementações dos substratos melhoraram consideravelmente o vigor da colônia.

Por outro lado, a suplementação com farinha de casca de maracujá apresentou IVCM significativamente menor em relação aos demais tratamentos (Fig. 4). Entretanto, o melhor vigor da colônia, em relação ao controle, indica que essa suplementação também foi positiva.

Elaboração de “semente-inóculo”

No mercado existem diferentes embalagens que podem ser adaptadas para produção de inóculos de cogumelos. Sacos de polipropileno e frascos autoclaváveis foram

testados para a produção de inóculo de *L. strigosus* utilizando serragens de *S. amara*, *H. petraeum* e *A. lecointei* que apresentaram maiores IVCM e alta disponibilidade nas serrarias.

Aos 25 dias da inoculação constatou-se que os substratos estavam totalmente colonizados por *L. strigosus* em todas as embalagens testadas (Fig. 5).

Deste modo devem ser considerados para a elaboração de “semente-inóculo” aspectos como: custo das embalagens; tempo de colonização; viabilidade de transporte e praticidade de inoculação do micélio no substrato.

A embalagem E1 proporcionou maior praticidade para inoculação e é de fácil transporte, entretanto, apresentou maior custo (Tabela 2) e a opacidade da embalagem, dificultou a visualização da colonização e a observação de contaminantes durante a incubação. A embalagem E2 apresentou custo intermediário e boa visibilidade da colonização, entretanto, a embalagem é frágil, necessitando a utilização de dois sacos, assim como foi necessário a confecção de respirador com um anel de tubo de PVC e algodão hidrofóbico. A embalagem E3 comportou maior quantidade de substrato, o que resultou em menor custo. Por ser uma embalagem específica para a produção de “semente-inóculo” de shiitake, contém filtro para troca gasosa, é resistente ao transporte e possibilita a visualização da colonização. Por outro lado, a venda deste material é restrita.

Vale ressaltar que devido à rápida colonização de *L. strigosus* no substrato, na temperatura ótima de 35°C, não foram observados problemas de contaminação.

Os resultados obtidos para elaboração de “semente-inóculo” serão utilizados como base para futuros estudos de produção deste cogumelo.

Em experimento preliminar, obteve-se a formação do basidiocarpo de *L. strigosus* em formulação de serragem de *H. petraeum* suplementado com 20% (w/w) de farelo de arroz, após 150 dias incubados em condições naturais. Completando o ciclo de vida deste fungo. No entanto mais estudos sobre as estratégias de indução da frutificação são necessárias.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa de estudo concedida a Ruby Vargas-Isla.

Referências*

- Albertó E, Gasoni L (2003) Producción de Hongos Comestibles en la Argentina. IDIA XXI Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-INTA 5:70-76
- Chang ST, Hayes WA (1978) The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press Inc, London
- Dias MD, Pozza EA, Abreu MS, Miranda EO (2005) Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. Isolados de *Coffea arabica* L. Ciênc agrotec 29(3):545-552
- Fidalgo O, Prance GT (1976) The ethnomycology of the Sanama Indians. Mycology 68:201-210
- Fidalgo O, Hirata JM (1979) Etnomicologia Caiabi, Txicão e Txucarramãe. Rickia 8:1-5
- Guzmán G, Mata G, Salmones D, Soto-Velazco C, Guzmán-Dávalos L (1993) El cultivo de los hongos comestibles. 1ª edição. México DF
- Hanada RE (2003) Seleção de resíduos de madeira da Amazônia como substrato para cultivo de fungos comestíveis. SBPC. Recife/PE. Impresso-CD
- Ishikawa NK, Paccola-Meirelles LD (1995) Assessment of mycelia growth in the edible mushroom shiitake (*Lentinus edodes*) in substrates used in inoculant production and formulation. In: Simpósio Nipo Brasileiro de Ciência e Tecnologia. São Paulo. 1:186-188

* Referências de acordo com as normas da Revista Mycoscience.

- Mandeel QA, Al-Laith A A, Mohamed SA (2005) Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes. *World J Microb & Biotech* 21:601-607
- Paula DP, Tarsinato MAA, Gracioli LA (2001) Viabilidade econômica do cultivo de shiitake em diferentes escalas de produção. *Sci agric* 58(2):431-436
- Philippoussis AN, Zervakis GI, Diamantopoulou PA (2001) Bioconversion of agricultural wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World J Microb & Biotech*, 17:191-200
- Philippoussis AN, Diamantopoulou PA, Zervakis GI (2003) Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. *World J Microb & Biotech* 19: 551-557
- Philippoussis AN, Diamantopoulou PA, Israilides C (2007) Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. *Int Biodeter & Biodeg* 59(3 spec iss): 216-219
- Prance GT (1984) The use of edible fungi by Amazonian Indians. In: Prance GT, Kallunki JA (eds) *Ethnobotany in the Neotropics*. *Adv Econ Bot* 1:127-139
- Przybylowicz P, Donoghue J (1990) *Shiitake growers handbook. The art and science of mushroom cultivation*. Kendall/Hunt Pub. Co. USA.
- Queiroz EC, Marino RH, Eira AF (2004) Mineral supplementation and productivity of the shiitake mushroom on eucalyptus logs. *Sci agric* 61(3):260-265
- Quimio TH, Chang ST, Royse DJ (1990) *Technical guidelines for mushroom growing in the tropics*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO. Rome
- Rossi IH, Monteiro AC, Machado JO, Barbosa JC (2003) Supplementation of sugarcane bagasse with rice bran and sugarcane molasses for shiitake (*Lentinula edodes*) spawn production. *Braz J Microb* 34: 61-65
- Salmones D, Mata G, Ramos LM, Waliszewski KN (1999) Cultivation of shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in several lignocellulosic materials originating from the subtropics. *Agronomie* 19(1):13-19

- Shiomi HF, Minhoni MTA, Machado JO (2007) Thermal and mechanical shocks affecting the first flush of production of *Lentinula edodes* on *Eucalyptus saligna* logs. *Braz J Microb* 38:200-203
- Silva EG, Dias ES, Siqueira FG, Schwan RF (2007) Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. *Ciênc Tec Alimen* 27(1):72-75
- Silva EM, Machuca A, Milagres AMF (2005) Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. *Letters in Appl Microb* 40:283-288
- Soccol CR, Vanderberghe LPS (2003) Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Bioch Eng J* 13 (2-3):205-218
- Stamets P (1993) Growing gourmet and medicinal mushrooms. Hong Kong
- Tonini RCG, Santos F, Ishikawa NK, Tavares LBB (2007) Utilização de balsa mediana de palmito (*Euterpe edulis*) Mart. Arecaceae como substrato de frutificação para o cultivo axênico de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler. *Rev Bras Biociênc* 5 (2):204-206
- Vargas-Isla R, Ishikawa NK. Optimum conditions of *in vitro* mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon. *Mycoscience in press*
- Vasco AMP (2002) Estudio etnobiológico de los hongos macromicetes entre los Uitoto de la región de Araracuara (Amazonía Colombiana). MSc thesis, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Bogota
- Vianez BF, Barbosa AP (2002) Projeto de Pesquisa: Estudo de alternativas de uso dos resíduos gerados pela indústria madeireira em Manaus e Itacoatiara, Estado do Amazonas. Relatório final. CPPF-INPA. Manaus/AM

Legendas das tabelas

Tabela 1. Espécies florestais das serragens testadas para formulações de substratos de "semente-inóculo" de *Lentinus strigosus*

Tabela 2. Características das embalagens utilizadas para a produção de "semente-inóculo" de *Lentinus strigosus*

Legendas das figuras

Fig. 1. Colônia micelial de *Lentinus strigosus* no quinto dia de incubação em serragens de espécies florestais: (A) *Hymenolobium petraeum* Ducke (angelim pedra), (B) *Hura crepitans* L. (assacu), (C) *Bertholletia excelsa* H.B.K. (castanheira), (D) *Cedrela odorata* L. (cedro), (E) *Bombacopsis quinata* (Jacq.) Dugand. (cedro doce), (F) *Eucalyptus* sp. (eucalipto), (G) *Hymenaea courbaril* L. (jatobá), (H) *Ocotea cymbarum* Kunth (louro canela), (I) *Simarouba amara* Aubl. (marupá), (J) *Astronium lecointei* Ducke (muiracatiara), (K) *Aniba rosaeodora* Ducke (pau rosa), (L) *Caryocar* sp. (piquiarana), (M) *Quercus acutissima* Carr. (carvalho), suplementadas com 20% (w/w) de farelo de arroz e $\pm 60\%$ de umidade, incubadas a 35 °C.

Fig. 2. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de *Lentinus strigosus* em serragens de 13 espécies florestais, suplementadas com 20% (w/w) de farelo de arroz (*Oryza sativa*) e $\pm 60\%$ de umidade, incubadas a 35 °C. Cálculo do IVCM = $\sum (D - D_a) / N$ (onde D = diâmetro atual da colônia; D_a = diâmetro da colônia no dia anterior; N = número de dias após a inoculação). ^(a)Colunas com letra(s) iguais não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Média de cinco replicatas.

Fig. 3. Colônia micelial de *Lentinus strigosus* em substrato de (A) serragem de *Simarouba amara* (marupá) pura (controle), e suplementação de 20% (w/w) de: (B) farelo de arroz, (C) extrato de soja, (D) levedo de cerveja, (E) farinha de casca de maracujá, (F) fibra de soja, (G) fibra de trigo, (H) gérmen de trigo. Colônia micelial no sexto dia de incubação a 35 °C. A umidade de todos os tratamentos foi de 60% (w/v).

Fig. 4. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de *Lentinus strigosus* em substrato de serragem de *Simarouba amara* (marupá), suplementada com 20% (w/w) de diferentes sublementações e serragem pura (controle), incubadas a 35°C. Cálculo do $IVCM = \sum (D - D_a) / N$ (onde D = diâmetro atual da colônia; D_a = diâmetro da colônia no dia anterior; N = número de dias após a inoculação). ^(a)Colunas com letra(s) iguais não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Média de cinco replicatas.

Fig. 5. “Semente-inóculo” de *Lentinus strigosus* elaborado em serragem de *Simarouba amara* (marupá) suplementada com 20% (w/w) farelo de arroz em diferentes embalagens. E1=frasco plástico, E2=sacos de polipropileno, E3=sacos de polipropileno com filtro. Abaixo, corte transversal dos blocos colonizados no 25^o dia de incubação a 35°C. Barras 2 cm.

Tabela 1. Espécies florestais das serragens testadas para formulações de substratos de "semente-inóculo" de *Lentinus strigosus*

Nome científico	Nome comum
<i>Hymenolobium petraeum</i> Ducke	Angelim pedra
<i>Hura crepitans</i> L.	Assacu
<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.	Castanheira
<i>Cedrela odorata</i> L.	Cedro
<i>Bombacopsis quinata</i> (Jacq.) Dugand.	Cedro doce
<i>Eucalyptus</i> sp.	Eucalipto
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Jatobá
<i>Ocotea cymbarum</i> Kunth	Louro canela
<i>Simarouba amara</i> Aubl.	Marupá
<i>Astronium lecointei</i> Ducke	Muiracatiara
<i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	Pau rosa
<i>Caryocar</i> sp.	Piquiarana
<i>Quercus acutissima</i> Carr.	Carvalho

Tabela 2. Características das embalagens utilizadas para a produção de "semente-inóculo" de *Lentinus strigosus*

Tratamento	Forma/material	Tamanho/ volume	Quantidade de substrato	Custo da embalagem/1 kg de "semente-inóculo "
E1	Frascos polipropileno + esparadrapo	15x9 cm	600 g	R\$ 1,60
E2	Sacos polipropileno + PVC + algodão	23x36 cm	800 g	R\$ 1,12
E3	Sacos polipropileno + clips	32x45 cm	1200 g	R\$ 0,62

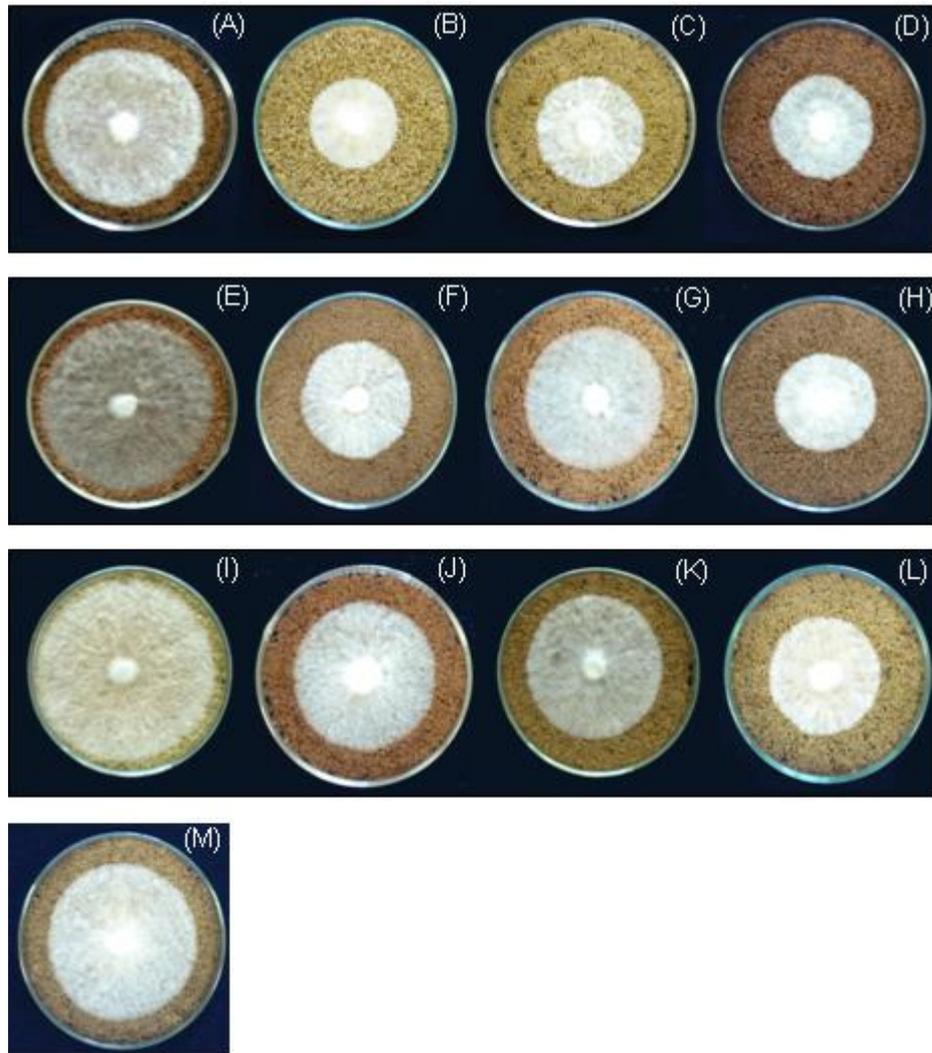


Fig. 1

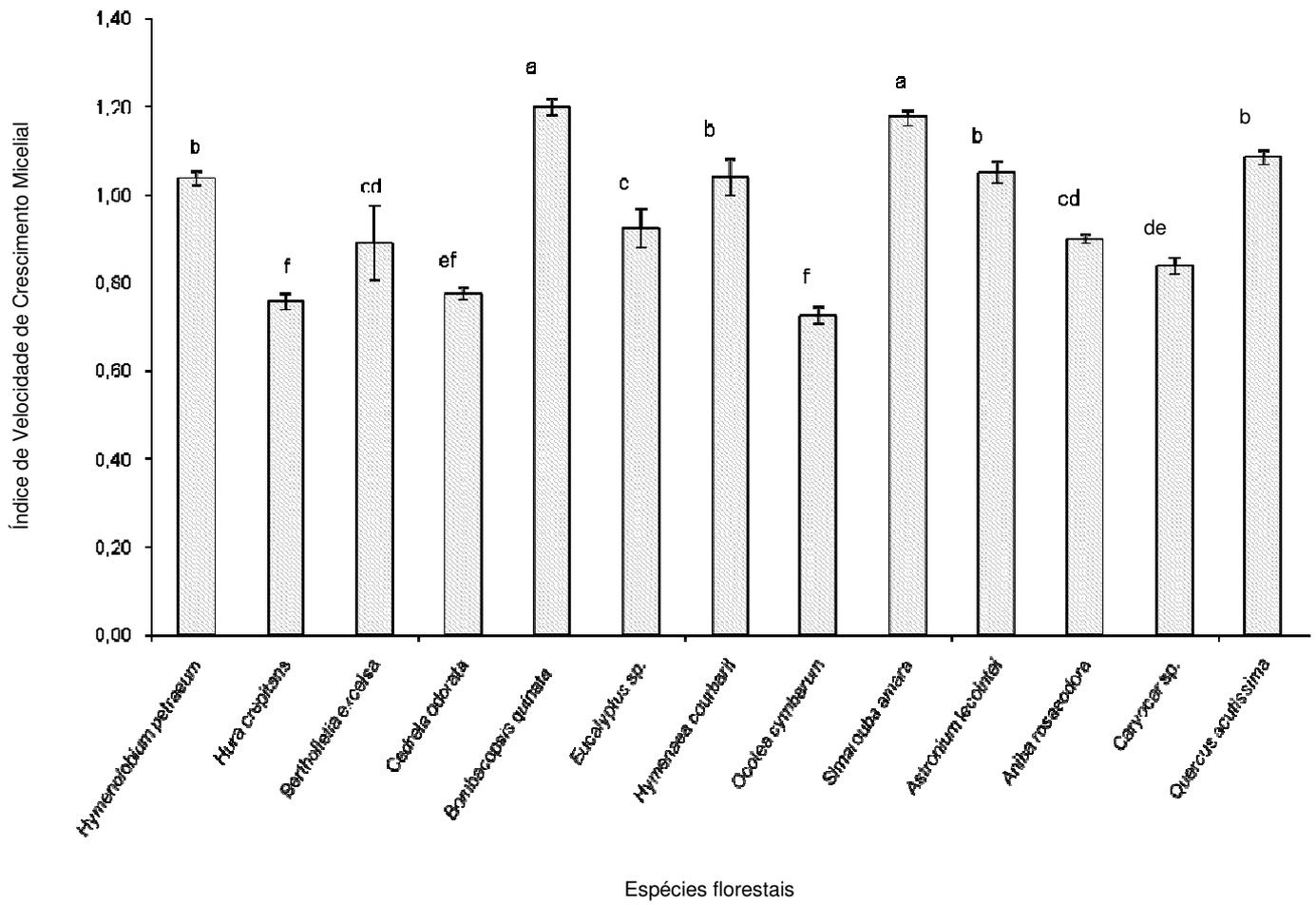


Fig. 2

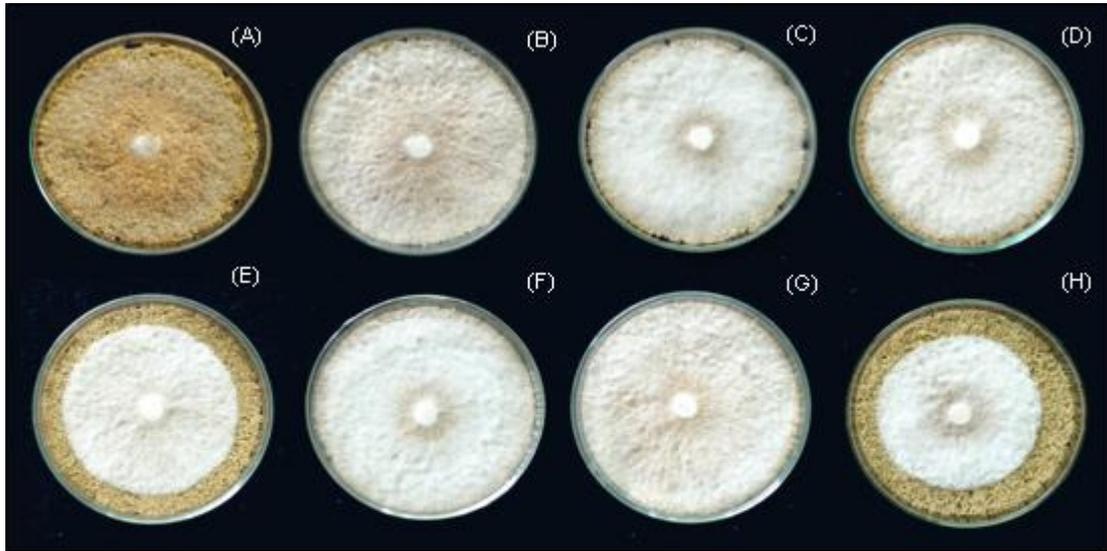


Fig. 3

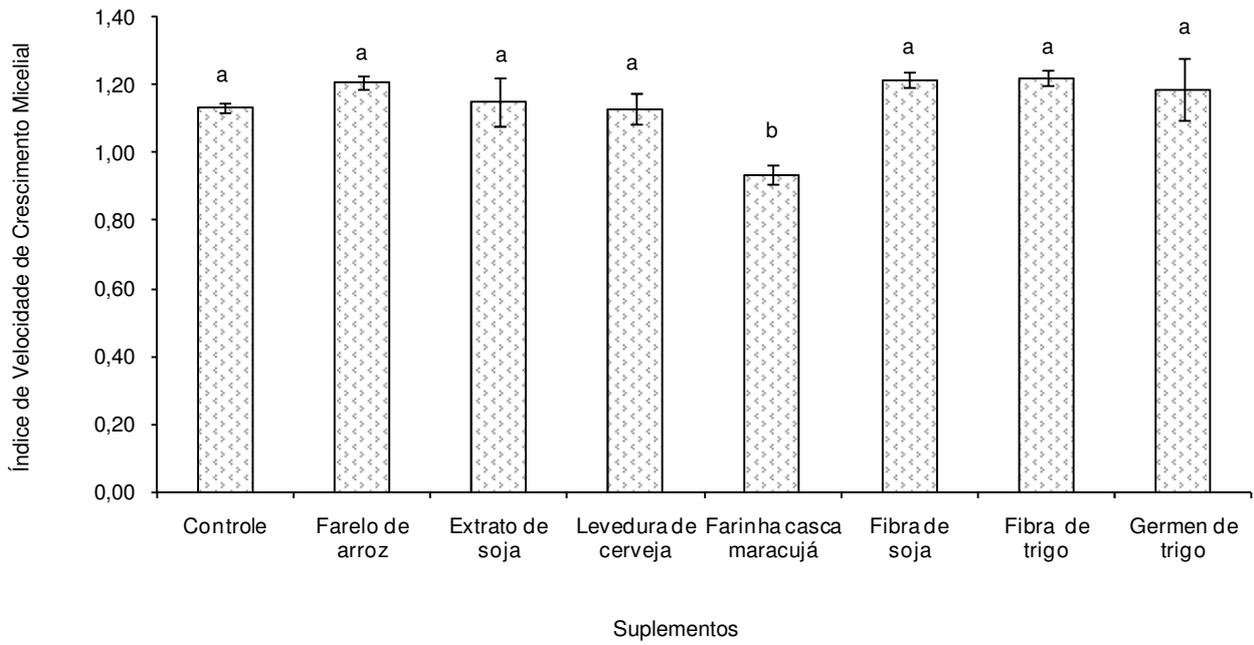
**Fig. 4**



Fig. 5