

Influência da temperatura no crescimento micelial de linhagens de *Lentinula edodes*

Temperature influence on the mycelial growth of *Lentinula edodes* strains

Marina Bortoleto Athayde^{1*}

Diego Cunha Zied²

Marli Teixeira de Almeida Minihoni³

Meire Cristina Nogueira de Andrade⁴

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar o crescimento micelial *in vitro* de dez linhagens de *L. edodes* (LED 12, LED 20, LED 25, LED 27, LED 33, LED 35, LED 51, LED 55, LED 58, e LED 75), quando submetidas às temperaturas de 15, 20 e 25 °C. Utilizou-se um meio agarizado preparado com extrato de madeira de eucalipto e farelo de soja, no qual fez-se a medição radial do crescimento micelial das linhagens de *L. edodes*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 10 x 3, cada tratamento constando de 5 repetições, correspondente a uma placa de Petri. Verificou-se que o crescimento de *L. edodes* é influenciado pela temperatura de incubação, sendo que a temperatura de 25 °C foi mais favorável para o crescimento micelial de todas as linhagens de *L. edodes*. Destaque foi dado às linhagens LE 75, LE 55, LE 33 e LE 12 que obtiveram as maiores médias de crescimento micelial a 25 °C ao final do ciclo de cultivo.

Palavras-chave: fungos; micélio; cogumelo.

Abstract

The objective of the present work was to evaluate the *in vitro* mycelial growth of ten *L. edodes* strains (LED 12, LED 20, LED 25, LED 27, LED 33, LED 35, LED 51, LED 55, LED 58 and LED 75) submitted to the temperatures of 15, 20 and 25 °C. An agar medium prepared with eucalyptus wood extract and

1 Graduada em Agronomia pela Faculdade de Ciências Agrônomicas-UNESP/Botucatu; Endereço: Fazenda Experimental Lagegado, Caixa Postal: 237, CEP: 18.610-307, Botucatu, São Paulo, Brasil, E-mail: marina_athayde@yahoo.com.br (*) Autora para correspondência.

2 MSc.; Engenheiro Agrônomo; Doutorando em Energia na Agricultura pela Faculdade de Ciências Agrônomicas, FCA/UNESP, Botucatu, São Paulo; E-mail: dczied@fca.unesp.br

3 Livre-docência; Professora da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP; E-mail: marliminhoni@fca.unesp.br

4 Pós-Doutora; Professora do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas, FCA – Universidade Estadual Paulista, UNESP; Botucatu, São Paulo, Brasil; E-mail: mc Andrade@hotmail.com

soy bran was used and radial measurement of the mycelial growth of *L. edodes* strains was performed. The experimental design was totally randomized, in a 10 x 3 factorial scheme. Each treatment corresponded to a Petri plate and consisted of 5 repetitions. It was verified that *L. edodes* growth is influenced by the incubation temperature, that is the temperature of 25 °C was the most favorable for the mycelial growth of all *L. edodes* strains, especially for LE 75, LE 55, LE 33 and LE 12 strains, which obtained the highest mycelial growth averages at 25 °C at the end of the cultivation cycle.

Key words: fungi; mycelium; mushroom.

A escolha das linhagens é um fator de fundamental importância para se obter sucesso no cultivo de shiitake [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler], pois elas podem diferir, dentre outros fatores, quanto à velocidade de crescimento micelial, à temperatura e a umidades ótimas de incubação e de frutificação, à resistência a fungos contaminantes, ao tamanho e forma dos basidiomas e à produtividade (LECHNER; ALBERTÓ, 2007; GBOLAGADE et al., 2006, ANDRADE; GRACIOLLI, 2005).

O cultivo *in vitro* visa avaliar as condições ótimas de crescimento do fungo, em relação aos meios de cultura, temperaturas e tempos de incubação (HATVANI, 2001), sendo que a medida do crescimento micelial pode ser feita de diferentes formas, tais como crescimento radial, vigor, velocidade de crescimento e massa do micélio.

O uso de meio de cultura sólido para avaliação do crescimento de fungos é considerado adequado, pois, na natureza, os fungos comumente desenvolvem-se em substratos sólidos, tais como resíduos vegetais e animais ou no solo (BONONI et al., 1999).

Em relação aos fatores ambientais, Vargas-Isla e Ishikawa (2008) relatam que os protocolos de cultivo *in vitro* disponíveis na literatura para cogumelos são comumente correlacionados com habitats de clima temperado, havendo uma carência de estudos das condições de cultivo para climas tropicais.

Devido à diversidade de linhagens de *L. edodes*, é fundamental conhecer as condições mais adequadas de temperatura para estas, uma vez que, conforme Akinyele e Adetuyi (2005), a temperatura é um dos principais fatores ambientais que influenciam o crescimento de muitos microrganismos. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da temperatura no crescimento micelial de dez linhagens de *L. edodes*.

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, Botucatu, SP.

Foram utilizadas dez linhagens de *L. edodes*: LED 12, LED 20, LED 25, LED 27, LED 33, LED 35, LED 51, LED 55, LED 58, e LED 75, armazenadas na Micoteca do Módulo de Cogumelos (FCA/ UNESP). Todas as linhagens foram obtidas do INRA-MYCSA (*National Institute for Agronomic Research - Mycologie et Sécurité des Aliments*), as quais estavam conservadas em banco de germoplasma.

O substrato utilizado no preparo do meio de cultura foi constituído de 88% de serragem de *Eucalyptus* spp. suplementado com 12% de farelo de soja (com base na matéria seca). Também foi utilizado cerca de 1% de calcário calcítico para correção do pH para 6,0. A mistura de todos os ingredientes foi

feita manualmente, adicionando-se em um recipiente previamente limpo, a serragem, o farelo e o calcário. Após, fez-se a umidificação do substrato com água de abastecimento público até a obtenção de 60% de umidade. Em seguida, o substrato foi submetido à autoclavagem a 121 °C durante 3 horas.

No preparo do meio de cultura, inicialmente pesou-se 80g de substrato recém preparado e submeteu este à fervura em um litro de água durante 15 minutos, sendo em seguida filtrado em peneira de plástico do tipo comum (uso doméstico) de malha fina e algodão. Posteriormente, o filtrado foi disposto em frascos Duran (capacidade de 1L), completando-se o volume para 1L e submetendo-o ao processo de esterilização, ou seja, autoclavou-se a 121 °C por 30 minutos e, após 24 horas, adicionou-se 15g de agar, autoclavou-se novamente a 121 °C por mais 30 minutos, seguido de resfriamento do meio de cultura até aproximadamente 45-50 °C. Assim preparado, o meio foi vertido em placas de Petri previamente esterilizadas em câmara de fluxo laminar.

Discos de 4mm de diâmetro de matriz secundária das linhagens de *L. edodes* (cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura à base de extrato de substrato), foram depositados sobre os meios previamente preparados, compondo os tratamentos do presente experimento. As placas foram distribuídas inteiramente ao acaso e mantidas em estufa incubadora a 15, 20 e 25 °C. Neste período, a cada 24 horas, foram realizadas medições do crescimento radial do *L. edodes* na superfície do meio de cultura através de quatro medições equidistantes entre si, até o momento em que em um dos tratamentos, a colônia fúngica atingisse a proximidade das bordas da placa de Petri, o que ocorreu após nove dias de incubação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 10 x 3, cujos tratamentos corresponderam às combinações das dez linhagens de *L. edodes* com as três condições de temperatura, tendo no total 30 tratamentos. Cada tratamento foi composto por 5 repetições, sendo cada repetição correspondente a uma placa de Petri, totalizando 150 placas.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%) (SNEDECOR; COCHRAN, 1972).

Houve interação positiva entre as linhagens de *L. edodes* e as temperaturas de incubação (Tabela 1). As maiores médias de crescimento micelial ocorreram quando submetidas à temperatura de 25 °C, sendo que nesta temperatura, as linhagens LED 12, LED 33, LED 55 e LED 75 foram as que obtiveram as maiores médias de crescimento micelial.

Dentre os fatores que influenciam o crescimento micelial de basidiomicetos produtores de cogumelos, a temperatura é um dos mais importantes. No cultivo de uma linhagem de ocorrência na Amazônia de *Pleurotus ostreatus* em meio à base de serragem da espécie madeireira *Simarouba amara*, Sales-Campos et al. (2008) testaram três temperaturas de incubação (22, 25, 27, 30 e 35 °C) e verificou que a 25 °C foi a mais promissora para o crescimento micelial. Lechner e Albertó (2007) avaliando a temperatura ótima para o crescimento micelial de linhagens de ocorrência natural de *Lentinus tigrinus*, observaram que a temperatura de 30 °C foi a mais favorável. GBOLAGADE et al. (2006) testando o crescimento micelial de um cogumelo da Nigéria, *Lentinus subnudus*, em meios

semi-sintéticos, verificaram que o melhor crescimento foi obtido a 30 °C. Akinyele e Adetuyi (2005) avaliando o efeito de diferentes resíduos, pH e temperaturas no crescimento micelial de *Volvariella volvacea* verificaram que a temperatura de 30 °C também foi a mais favorável.

As diferenças de crescimento micelial entre linhagens fúngicas já foram relatadas por vários pesquisadores (SILVA et al., 2005; ANDRADE; GRACIOLLI, 2005; MAKI et al., 2001; BOYLE, 1998). Lechner e Albertó (2007) observaram que em três condições de temperatura testadas (25, 30 e 35 °C) a linhagem BAFC 197 de *L. tigrinus* obteve o maior índice de crescimento. Andrade et al. (2008), avaliando o crescimento micelial de duas linhagens de *L. edodes* submetidas a dez tipos de meio de cultura, verificou que a linhagem LE-96/18 obteve médias de crescimento micelial

superiores às da linhagem LE-95/01 em todos os meios de cultura testados.

De acordo com Nyochembeng et al. (2008), a biodegradação de resíduos pode ser otimizada pela seleção de linhagens eficientes, uma vez que, como já relatado por SILVA et al. (2005) o crescimento do micélio influencia a produção de cogumelos. De acordo com estes mesmos autores, a taxa de formação de primórdios está diretamente relacionada com a biomassa micelial que é formada durante o crescimento fúngico. ANDRADE et al. (2007) avaliando o crescimento micelial de oito linhagens de *L. edodes* em meios de cultura à base de extrato de serragem de *Eucalyptus* spp., verificaram que a linhagem LE-98/55 obteve crescimento micelial mais rápido, enquanto que a linhagem LE-96/06 foi mais lenta.

Os dados referentes ao crescimento micelial das linhagens de *L. edodes* foram ajustados a um modelo linear (Figura

Tabela I. Crescimento micelial (mm) *in vitro* de dez linhagens de *Lentinula edodes* em meio de cultura substrato-agar (SA), após nove dias de desenvolvimento a 15, 20 e 25 °C

Linhagens	Temperatura de incubação								
	15°			20°			25°		
LED 12	32,8	A	c	52,0	AB	b	67,0	ABC	a
LED 20	29,6	BC	c	45,4	D	b	52,6	E	a
LED 25	26,4	C	c	38,2	E	b	50,8	E	a
LED 27	35,0	A	c	52,2	AB	b	60,8	D	a
LED 33	35,4	A	c	54,6	A	b	65,2	ABC	a
LED 35	33,0	A	c	49,6	BC	b	63,0	CD	a
LED 51	31,4	AB	c	46,2	BC	b	60,2	D	a
LED 55	32,2	AB	c	53,8	A	b	67,8	AB	a
LED 68	34,4	A	c	50,8	AB	b	64,0	BCD	a
LED 75	34,2	A	c	51,6	AB	b	69,0	A	a

Nota: Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = 4,21%.

1). Verifica-se que a temperatura de 25 °C foi a que proporcionou o mais rápido crescimento micelial para todas as linhagens de *L. edodes* ao longo de todo o período de incubação. Estes resultados estão de acordo com MOTATO et al. (2006) que avaliando o desenvolvimento de *Pleurotus djamor* em resíduos agroindustriais verificaram uma clara influência da temperatura sobre o crescimento micelial, onde os diferentes substratos de *Musa paradisiaca* e *Cariniana pyriformis* mostram uma menor velocidade de crescimento quando submetida a uma temperatura de 15 °C. Já as temperaturas de 20 e 26 °C favorecem o crescimento do fungo, e acima de 26 °C se observou os melhores resultados.

Um rápido crescimento micelial é importante, uma vez que reduz os índices de contaminações. Jonathan et al. (2008) verificaram que uma rápida colonização

micelial do *P. tuber-regium*, nos seletivos substratos, tais como resíduos de madeira de *Holoptelia grandis* e *Milicia excelsa*, reduz consideravelmente o crescimento de outros organismos competidores.

O crescimento de *L. edodes* é influenciado pela temperatura de incubação, sendo que a temperatura de 25 °C foi mais favorável para o crescimento micelial de todas as linhagens de *L. edodes*, com destaque para as linhagens LE 75, LE 55, LE 33 e LE 12 que obtiveram as maiores médias de crescimento micelial nesta condição de temperatura ao final do ciclo de cultivo.

Agradecimento

Ao Dr. Philippe Callac - INRA-MYCSA (*National Institute for Agronomic Research - Mycologie et Sécurité des Aliments*) - pelo fornecimento das linhagens de *L. edodes* avaliadas no presente trabalho.

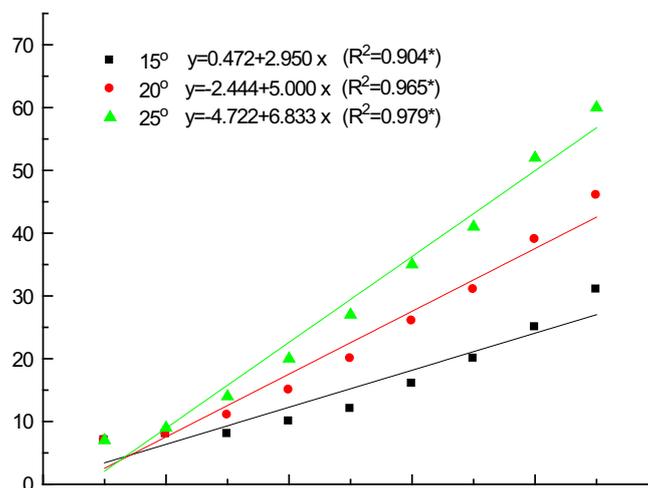


Figura I. Crescimento micelial (mm) de dez linhagens de *L. edodes*, em meio de cultura SA (Substrato - Agar), em três temperaturas (15, 20 e 25 °C). * Significativo a 5%.

Referências

AKINYELE, B. J.; ADETUYI, F. C. Effect of agrowastes, pH and temperature variation on the growth of *Volvariella volvacea*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 4, n. 12, p. 1390-1395, 2005.

ANDRADE, M. C. N.; SILVA, J. H.; MINHONI, M. T. A.; ZIED, D. C. Mycelial growth of two *Lentinula edodes* strains in culture media prepared with sawdust extracts from seven *eucalyptus* species and three *eucalyptus* clones. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 333-337, 2008.

ANDRADE, M. C. N. CALONEGO, F. W.; MINHONI, M. T. A.; SEVERO, E. T. D.; KOPYTOWSKI FILHO, J. Avaliação do crescimento micelial de linhagens de *shiitake*, da produção em toras de eucalipto e de alterações físicas da madeira. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 29, n. 1, p. 23-27, 2007.

ANDRADE, M. C. N.; GRACIOLLI, L. A. Controle de fungos contaminantes no cultivo do cogumelo comestível shiitake em toros de eucalipto. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 293-299, 2005.

BONONI, V. L. CAPELARI, M.; MAZIEIRO, R.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Ícone, 1999. 206p.

BOYLE, C. D. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 30, n. 6, p. 817-823, 1998.

GBOLAGADE, J. S.; FASID, I. O.; AJAYI, E. J.; SOBOWALE, A. A. Effect of physico-chemical factors and semi-synthetic media on vegetative of *Lentinus subnudus* (Berk.), and edible mushroom from Nigeria. **Food Chemistry**, v. 99, p. 742-747, 2006.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 71-74, 2001.

JONATHAN, S.G.; FASIDI, I.O.; AJAYI, A.O.; ADEGEYE, O. Biodegradation of Nigerian wood wastes by *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer. **Bioresource Technology**, v.99, p.807-811, 2008.

LECHNER, B. E.; ALBERTÓ, E. Optimal conditions for the fruit body production of natural occurring strains of *Lentins tigrinus*. **Bioresource Technology**, v.98, p.1866-1869, 2007.

MAKI, C. S.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA, E.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Analyses of genetic variability in *Lentinula edodes* through mycelia responses to different abiotic conditions and RAPD molecular markers. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 3 p. 170-175, 2001.

MOTATO, K. E.; MEJÍA, A.; LEÓN, A. Evaluación de los residuos agroindustriales de plátano (*Musa paradisiaca*) y aserrín de abarco (*Cariniana piriformes*) como sustratos para el cultivo del hongo *Pleurotus djamor*. *Vitae*, Medellín, v. 13, n. 1, p. 24-29, 2006.

NYOCHEMBENG, L. M.; BEYL, C. A.; PACUMBABA, R. P. Optimizing edible fungal growth and biodegradation of inedible crop residues using various cropping methods. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5645-5649, 2008.

SALES-CAMPOS, C.; EIRA, A. F.; JESUS, M. A.; CAMPAGNOLLI, F.; ANDRADE, M. C. N. Crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* em resíduo de *Simarouba amara*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 43, n. 11, p. 1633-1635, 2008.

SILVA, E. M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A. M. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. *Letter in Applied Microbiology*, v. 40, n. 4, p. 283-288, 2005.

SNEDECOR, G. W. E.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 6th ed. Ames: Iowa State University Press, 1972.

VARGAS-ISLA, R.; ISHIKAWA, N. K. Optimal conditions of in vitro mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon. *Mycoscience*, Tokyo, v. 49, p. 215-219, 2008.