

Avaliação *in vitro* do crescimento micelial de cinco linhagens de *Agaricus blazei* em duas temperaturas

In vitro evaluation of the mycelial growth of five *Agaricus blazei* strains in two temperatures

Diego Cunha Zied^{1(*)}

Marli Teixeira de Almeida Minihoni²

Ceci Sales-Campos³

Meire Cristina Nogueira de Andrade⁴

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar o crescimento micelial *in vitro* de cinco linhagens de *Agaricus blazei* (ABL-05/53, ABL-04/49, ABL-03/44, ABL-99/30 e ABL-02/51), quando submetidas às temperaturas de 20 e 25°C. Em câmara de fluxo laminar, discos das linhagens foram inoculadas no centro de placas de Petri contendo o meio CA (composto-ágar) e incubadas em estufa BOD. Após 48 horas, iniciaram-se as medidas do crescimento micelial, com auxílio de uma régua graduada em milímetros, 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 delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 2. Cada tratamento constou de sete repetições, correspondente a uma placa de Petri, totalizando setenta unidades experimentais. Verificou-se que o crescimento de *A. blazei* 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 *A. blazei* avaliadas, com destaque para as linhagens ABL-04/49 e ABL-03/44 que obtiveram as maiores médias de crescimento micelial nesta condição de temperatura ao final do ciclo de cultivo.

Palavras-chave: fungos; micélio; cogumelo.

1 MSc.; Engenheiro Agrônomo; Doutorando em Energia na Agricultura pela Faculdade de Ciências Agronômicas, FCA/UNESP, Botucatu, São Paulo; Endereço: Rua José Barbosa de Barros, no 1780, Caixa Postal: 237, CEP: 18610-307, Botucatu, São Paulo, Brasil. E-mail: dczied@fca.unesp.br (*) Autor para correspondência.

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

3 Dra.; Pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Centro de Pesquisas de Produtos Florestais, Preservação da Natureza; E-mail: ceci@inpa.gov.br

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

Recebido para publicação em 26/10/2010 e aceito em 16/03/2011

Ambiência Guarapuava (PR) v.7 n.1 p. 113 - 119 Jan./Abr. 2011 ISSN 1808 - 0251

DOI:10.5777/ambiencia.2011.01.01nt

Abstract

The objective of the work was to evaluate the *in vitro* mycelial growth of five *A. blazei* strains (ABL-05/53, ABL-04/49, ABL-03/44, ABL-99/30 and ABL-02/51) when submitted to the temperatures of 20 and 25 °C. In a laminar flow chamber, discs of the strains were inoculated in the middle of Petri's plates containing CA (compost-agar) medium and incubated in BOD. After 48 hours, measurements of the mycelial growth began, with the help of a ruler with scale in millimeters, by means of four equidistant measurements, until the moment when the fungal colony reached near the edges of the Petri's plate in one of the treatments. The experimental design was totally randomized, in 5 x 2 factorial design. Each treatment consisted of seven repetitions, corresponding to one Petri's plate, totalizing seventy experimental units. We verified that *A. blazei* growth is influenced by incubation temperature, being that the temperature of 25 °C was more favorable for the mycelial growth of all *A. blazei* strains tested, with attention for ABL-04/49 and ABL-03/44 strains, which obtained the highest averages for mycelial growth under this temperature condition at the end of the cultivation cycle.

Key words: fungi; mycelium; mushroom.

Para implantação de um cultivo comercial de cogumelos, é fundamental o conhecimento das características genéticas de linhagens selecionadas e suas respectivas condições de desenvolvimento, tais como as de temperatura de colonização e de "frutificação" (KERRIGAN, 2005). Alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de aprimorar a tecnologia de cultivo de cogumelos comestíveis, visando à otimização de fatores que podem influenciar a produtividade (ZIED et al., 2010; CAVALCANTE et al., 2008).

Em condições experimentais, 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 (GRIFFIN, 1994). Savoie, Cesbron e Delpech (1995) recomendam o uso de um meio de cultura de composição

semelhante à do substrato de cultivo. No caso do *A. blazei* este meio de cultura tem sido o de extrato de composto (composto-água), obtido a partir da infusão de uma amostra mista de composto ao final da fase II da compostagem (KOPYTOWSKI FILHO, 2006).

Em fruição de o cultivo de *Agaricus blazei* ser uma prática relativamente recente no Brasil, muitos produtores não obtêm sucesso no cultivo e acabam desistindo da produção. No entanto, devido à ampla diversidade de linhagens de *A. blazei*, conhecer as condições mais adequadas de temperatura para o cultivo é fundamental. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento micelial *in vitro* de cinco linhagens de *A. blazei* (ABL-99/30, ABL-03/44, ABL-04/49, ABL-02/51 e ABL-05/53), quando submetidas às temperaturas de 20 e de 25 °C.

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia, do

Departamento de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu, SP. Foram utilizadas cinco linhagens de *A. blazei* (ABL-99/30, ABL-03/44, ABL-04/49, ABL-02/51 e ABL-05/53), as quais se encontram armazenadas na Micoteca do Módulo de Cogumelos – FCA/ UNESP.

Para o preparo do meio de cultura à base de extrato de composto, inicialmente, coletou-se uma amostra mista de composto do final da Fase II da compostagem e com relação C/N em torno de 37/1. Esta amostra foi desidratada em estufa a 65 °C e triturada em moinho de facas com peneira trinta mesh. Posteriormente, misturou-se 60g deste composto em 900 mL de água destilada e ferveu-se durante quinze minutos, sendo sequencialmente filtrado em peneira comum de malha fina. Completou-se o volume do filtrado para 1000 mL e adicionou-se 15 g de ágar. Colocou-se o meio de cultura em frascos Duran e autoclavou-se a 121 °C por trinta minutos e, após 24 horas, autoclavou-se novamente por mais trinta minutos (Tindalização). Após resfriamento à aproximadamente 45-50 °C, o meio foi vertido em placas de Petri (20 mL/ placa).

Discos de quatro milímetros de diâmetro de matriz secundária das linhagens de *A. blazei*, ABL-99/30, ABL-03/44, ABL-04/49, ABL-02/51 e ABL-05/53, foram depositados sobre os meios previamente preparados. As placas foram distribuídas ao acaso e mantidas em estufa incubadora a 20 e 25°C, compondo os tratamentos do presente experimento. Neste período, a cada 48 horas, foram realizadas medições do crescimento radial do *A. blazei* 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 delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 2, cujos tratamentos corresponderam às combinações das cinco linhagens de *A. blazei* (ABL-99/30, ABL-03/44, ABL-04/49, ABL-02/51 e ABL-05/53) com as duas condições de temperatura (20 e 25°C), tendo no total dez tratamentos. Cada tratamento foi composto por 7 repetições, sendo cada repetição correspondente a uma placa de Petri, totalizando setenta placas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%).

Os resultados do crescimento micelial das linhagens de *A. blazei*, após quatorze dias de incubação, em função de diferentes condições de temperatura, estão demonstrados na tabela 1.

Houve interação positiva entre as linhagens de *A. blazei* e as temperaturas de incubação (Tabela 1). As maiores médias de crescimento micelial ocorreram quando submetidas à temperatura de 25 °C. Na condição de temperatura de 20 °C, a linhagem ABL-03/44 foi a que obteve a maior média de crescimento micelial, após 14 dias de incubação. Já na condição de temperatura de 25 °C, as linhagens ABL-04/49 e ABL-03/44 obtiveram as maiores médias de crescimento micelial entre todas as avaliadas. A temperatura é um dos mais importantes fatores que influenciam o crescimento micelial dos fungos. No cultivo de diferentes linhagens de *Lyophyllum decastes* em meio à base de batata-dextrose-ágar, Kinuta (1991) utilizou seis linhagens que foram incubadas a 24 °C e outras cinco linhagens que foram incubadas a 27 °C; após seis dias de cultivo avaliou o diâmetro da colônia formada e observou que o crescimento miceliano da

Tabela 1. Crescimento micelial (mm) *in vitro* de cinco linhagens de *Agaricus blazei* em meios de cultura à base de extrato de composto, após 14 dias de desenvolvimento a 20 e 25 °C

Linhagens	Temperatura de incubação					
	20 °C		25 °C			
ABL-03/44	58,29	A	b	65,29	AB	a
ABL-04/49	54,29	B	b	70,86	A	a
ABL-05/53	45,29	C	b	58,29	BC	a
ABL-99/30	40,86	D	b	52,29	CD	a
ABL-02/51	37,29	D	b	47,14	D	a
DMS	3,85			9,95		
CV (%)	5,26			10,91		

Nota: Médias seguidas de letra distintas, minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

linhagem NLD0003 foi o maior de todas as linhagens estudadas, obtendo diâmetro de colônia de 34 mm a 24 °C e 41 mm a 27 °C.

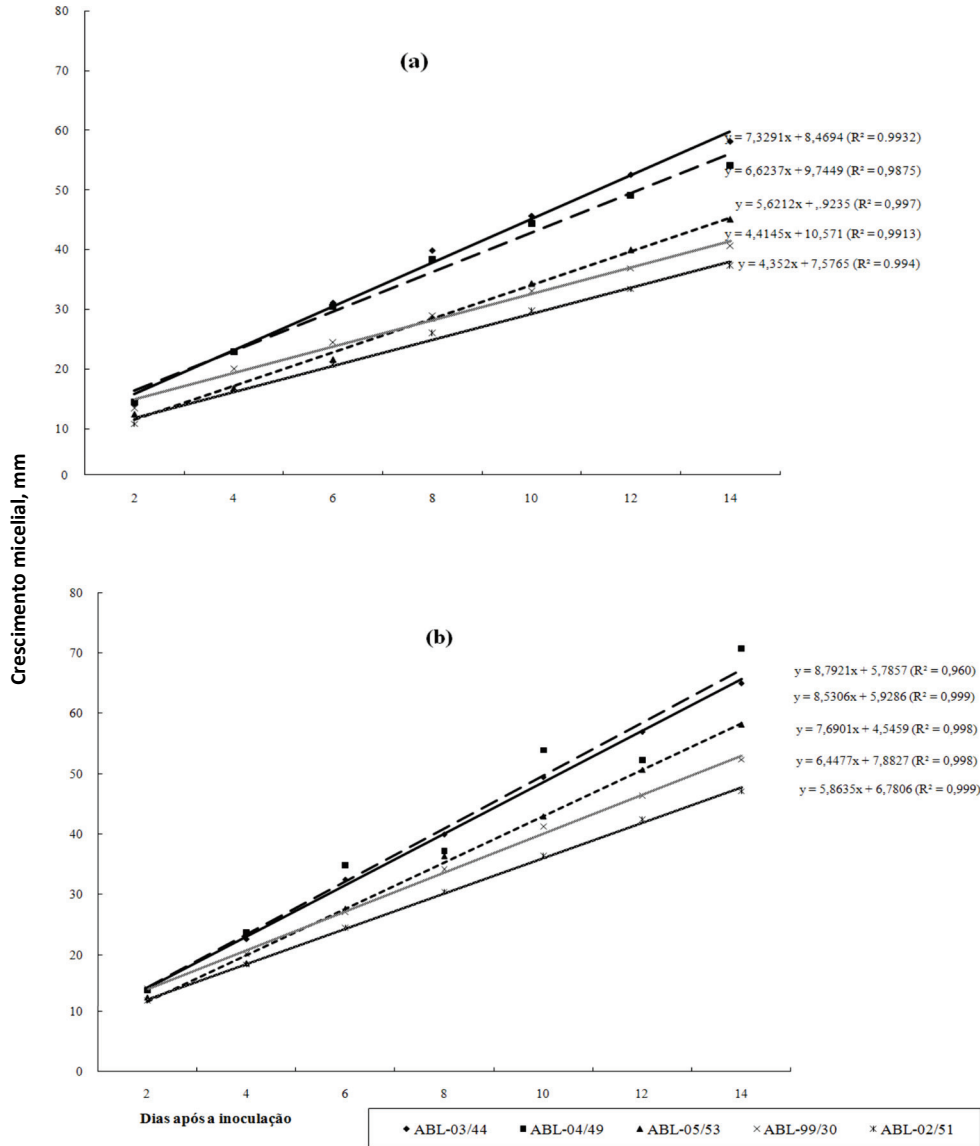
As diferenças de crescimento micelial entre linhagens fúngicas já foram relatadas por muitos pesquisadores (ANDRADE et al., 2007a; ANDRADE et al., 2007b; SILVA et al., 2005). Andrade et al. (2008a), avaliando a produção de quatro linhagens de *Agaricus bisporus* em três formulações de compostos, observaram diferenças significativas na interação entre linhagens e compostos. Andrade et al. (2008b) avaliando o crescimento micelial de duas linhagens de *L. edodes*, submetidas a dez tipos de meio de cultura, verificaram 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.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com Bilay et al., (2000) que, ao avaliarem o crescimento de trinta espécies de cogumelos comestíveis em diferentes meios de cultura, concluíram que o crescimento micelial destas espécies estudadas é diferente e depende do tipo de meio utilizado. Teixeira (2000), comparando

o crescimento micelial entre linhagens de *L. edodes*, relata a existência de diferenças significativas entre elas quando cultivadas em serragem de *E. saligna*, ou seja, as linhagens BMA LE-96/22, JAB M e BMA LE-96/14 foram as de crescimento mais rápido, não diferindo entre si, mas diferindo das demais estudadas. Ainda neste trabalho, a linhagem JAB P foi a de colonização mais lenta, e as demais, intermediárias. Andrade et al. (2008b) e Gomes-da-Costa et al. (2008) também concluíram, em seus trabalhos, que a cinética de crescimento micelial é influenciada pelas linhagens, bem como pelos substratos de cultivo.

Um crescimento progressivo das linhagens de *A. blazei* analisadas foi evidenciado no presente trabalho, durante os quatorze dias de avaliação, resultando em um aumento linear (Figura 1). Para as duas condições de incubação, 20 e 25°C, as linhagens ABL-03/44 e ABL-04/49 mantiveram-se com crescimento micelial superior ao das demais linhagens durante todo o período de avaliação (Figura 1). A eficiência da biodegradação por fungos varia em função da linhagem (AGUIAR et al.,

Figura 1. Crescimento micelial (mm) de cinco linhagens de *Agaricus blazei* durante 14 dias de avaliação, em meios de cultura à base de extrato de composto, a 20 °C (a) e a 25 °C (b).



Nota: * significativo a 5%.

2011; ANDRADE et al., 2007b). Andrade et al. (2010), avaliando o crescimento micelial de cinco linhagens de *Agaricus bisporus* submetidas a diferentes condições de temperatura, verificaram que a 25°C, a linhagem ABI-01/01 apresentou crescimento significativamente maior que as linhagens

ABI-05/03, ABI-06/04, ABI-04/02 e ABI-06/05.

Devido às diferenças existentes entre linhagens de *A. blazei*, conhecer os genótipos fúngicos mais adaptados a determinados substratos lignocelulósicos é um modo para aumentar a produtividade, 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.

Com base nos resultados obtidos e de acordo com a condução do experimento

proposto, verificou-se que o crescimento de *A. blazei* 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 *A. blazei* avaliadas, com destaque para as linhagens ABL-04/49 e ABL-03/44 que obtiveram as maiores médias de crescimento micelial nesta condição de temperatura ao final do ciclo de cultivo.

Referências

AGUIAR, L. V. B.; SALES-CAMPOS, C.; CARVALHO, C. S. M.; MINHONI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. N. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* em meios de cultivo à base de diferentes substratos orgânicos. **Interciência**, Caracas, v. 36, n. 3, p. 205-210, 2011.

ANDRADE, M. C. N.; CHAVARI, J. L.; MINHONI, M. T. A.; ZIED, D. C. Crescimento micelial *in vitro* de cinco linhagens de *Agaricus bisporus* submetidas a diferentes condições de temperatura. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá-PR, v.32, n.1, p.69-72, 2010.

ANDRADE, M. C. N.; ZIED, D. C.; MINHONI, M. T. A.; KOPYTOWSKI FILHO J. Yield of four *Agaricus bisporus* strains in three compost formulations and chemical composition analyses of the mushrooms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo-SP, v.39, n. 3, p. 593-598, 2008a.

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-PR, v.30, n.3, p.333-337, 2008b.

ANDRADE, M. C. N.; KOPYTOWSKI FILHO J.; MINHONI M. T. A.; COUTINHO L. N.; FIGUEIREDO M. B. Productivity, biological efficiency, and number of *Agaricus blazei* mushroom grown in compost in the presence of *Trichoderma* sp. and *Chaetomium olivacearum* contaminants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo-SP, v. 38, n. 2, p. 243-247, 2007a.

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-PR, v.29, n.1, p.23-27, 2007b.

BILAY, V. T.; SOLOMKO, E. F.; BUCHALO, A. S. Growth of edible and medicinal mushrooms on commercial agar media. In: VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. (Ed.). **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkema, 2000. v.2, p.779-782.

CAVALCANTE, J. L. R.; GOMES, V. F. F.; KOPYTOWSKI FILHO, J.; MINHONI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. N. Cultivation of *Agaricus blazei* in the environmental protection area of the Baturité region under three types of casing soils. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá-PR, v. 30, n. 4, p. 513-517, 2008.

GOMES-DA-COSTA, S.M.; COIMBRA, L. B.; SILVA, E. S.; Crescimento micelial de dois isolados de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, em resíduos ligninocelulósicos. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá-PR, v.30, n.2, p. 192-196, 2008.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2. ed. New York: Wiley-Liss, 1994, 458p.

KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**, Philadelphia, v. 97, n. 1, p. 12-24, 2005.

KINUTA, M. Cultivation of *Lyphylum decastes* (Fr.: Fr) Sing. In: VAN GRIENSVEN, L.J.L.D. (Ed.). **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkema, 1991. v.2, p.611-613.

KOPYTOWSKI FILHO, J. **Produtividade e eficiência biológica de *Agaricus blazei* (Murrill) Heinemann, em diferentes condições de cultivo**. 2006. 134f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

SAVOIE, J. M.; CESBRON, V.; DELPECH, P. Induction of polyphenol-oxidases in the mycelium of *Lentinula edodes*. **Science and Cultivation of Edible Fungi**. Elliot (ed.). p.787-793, 1995.

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

TEIXEIRA, E. M. **Caracterização isoenzimática e molecular de *Lentinula edodes* e avaliação da produção em função da espécie de eucalipto e clima**. 2000. 123f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

ZIED, D. C.; MINHONI, M. T. A.; KOPYTOWSKI FILHO, J.; ANDRADE, M. C. N. Production of *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) on different casing layers and environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Holanda, v.26, n. 10, p. 1857-1863, 2010.