

Crescimento micelial *in vitro* de cinco linhagens de *Agaricus bisporus* submetidas a diferentes condições de temperatura

Meire Cristina Nogueira de Andrade^{1*}, João Lucas Chavari², Marli Teixeira de Almeida Minhoni² e Diego Cunha Zied²

¹Coordenação de Pesquisas em Produtos Florestais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, 2936, Cx. Postal 478, 69060-001, Manaus, Amazonas, Brasil. ²Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. *Autora para correspondência. E-mail: mcnandrade@hotmail.com

RESUMO. Avaliou-se o crescimento micelial *in vitro* das linhagens ABI-05/03, ABI-06/04, ABI-04/02, ABI-06/05 e ABI-01/01 de *Agaricus bisporus* em meios de cultura sólidos à base de composto. As avaliações foram realizadas por meio de medições de quatro diâmetros das colônias, a cada 48h, durante 12 dias de incubação, no escuro, a 20 e 25°C. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com uso do teste de Tukey para a comparação das médias. Com base nos resultados obtidos, verificou-se que: o crescimento micelial de *A. bisporus* é influenciado pela temperatura de incubação; a temperatura de 25°C foi mais favorável para o crescimento micelial de todas as linhagens de *A. bisporus*; na temperatura de 20°C, o melhor crescimento foi obtido com as linhagens ABI-06/05 e ABI-01/01; na temperatura de 25°C, a linhagem ABI-01/01 apresentou crescimento significativamente maior que todas as demais.

Palavras-chave: champignon, micélio, cogumelo, crescimento micelial, linhagens.

ABSTRACT. *In vitro* mycelium growth of five *Agaricus bisporus* strains submitted to different temperature conditions. The *in vitro* mycelium growth of *Agaricus bisporus* strains ABI-05/03, ABI-06/04, ABI-04/02, ABI-06/05 and ABI-01/01 was evaluated in solid culture media made up of compost. Evaluations were performed by means of measurements of four diameters of the colonies, every 48 hours, during 12 days of incubation in darkness under 20 and 25°C. The experimental design consisted of randomized blocks, using the Tukey test to compare averages. Based on the obtained results, it was verified that: mycelium growth of *A. bisporus* is influenced by the temperature of incubation; the temperature of 25°C was more favorable to the mycelium growth of all *A. bisporus* strains; under the temperature of 20°C, the best growth was obtained with strains ABI-06/05 and ABI-01/01 and, under the temperature of 25°C, strain ABI-01/01 showed significantly higher growth than all other strains.

Key words: champignon, mycelium, mushroom, mycelium growth, strains.

Introdução

O *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach é um basidiomiceto, lignolítico e saprófita, comumente cultivado em compostos formulados pasteurizados (BONONI et al., 1999).

O fungo, em seu metabolismo, secreta exoenzimas que degradam compostos para obtenção de carbono, nitrogênio, enxofre e outros nutrientes (DONINI et al., 2005). A capacidade do fungo crescer e produzir cogumelos em substratos lignocelulósicos está relacionada com o vigor do micélio e com a capacidade de ativar mecanismos fisiológicos (MATA et al., 2001).

O cultivo *in vitro* busca elucidar as condições ótimas de crescimento do fungo, em relação a meios de cultura, temperatura e tempo de incubação

(HATVANI, 2001), e este conhecimento é um pré-requisito para o seu cultivo comercial, em substrato formulado.

O crescimento micelial do fungo, durante um período de tempo, pode ser traduzido por uma curva sigmoideal típica, com várias fases com propriedades fisiológicas típicas (MONTINI et al., 2006). A medida deste crescimento pode ser feita de diferentes formas, tais como crescimento radial, vigor, velocidade de crescimento e massa do micélio. 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 (BONONI et al., 1999). Savoie et al. (1995)

recomendam o uso de um meio de cultura de composição semelhante a do substrato de cultivo. Este meio de cultura tem sido o de extrato de composto (MINHONI et al., 2005).

A influência das características físicas e químicas dos substratos, no crescimento micelial de linhagens fúngicas, tem sido enfatizada em estudos recentes (SALES-CAMPOS et al., 2008; DONINI et al., 2006; ÖZÇELİK; PEKSEN, 2007), assim como as diferenças de crescimento micelial entre linhagens fúngicas cultivadas em um mesmo tipo de substrato e nas mesmas condições de cultivo (ANDRADE et al., 2007; SILVA et al., 2005; MAKI et al., 2001; BOYLE, 1998). No entanto, pela ampla diversidade de linhagens de *A. bisporus*, conhecer as condições mais adequadas de temperatura para o cultivo é fundamental.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da temperatura no crescimento micelial de *A. bisporus* e comparar o desempenho de cinco linhagens submetidas a duas temperaturas de incubação.

Material e métodos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agronômicas, Unesp, Botucatu, Estado de São Paulo.

Linhagens de *Agaricus bisporus*

Foram utilizadas cinco linhagens de *A. bisporus*: ABI-05/03, ABI-06/04, ABI-04/02, ABI-06/05 e ABI-01/01, as quais se encontram armazenadas na Micoteca do Módulo de Cogumelos (FCA/UNESP). Todas as linhagens foram isoladas a partir de basidiomas coletados por fungicultores do interior do Estado de São Paulo: as linhagens ABI-01/01 e ABI-04/02 foram oriundas de Mogi das Cruzes; ABI-05/03 de Cabreúva; ABI-06/05 e ABI-06/04 de Itu.

Preparo dos meios de cultura

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 16/1. Esta amostra foi desidratada em estufa a 65°C e trituração em moinho de facas com peneira 30 mesh. Posteriormente, foram misturados 60 g deste composto em 900 mL de água destilada e fervidos durante 15 min., sendo sequencialmente filtrados em peneira comum de malha fina. Completou-se o volume do filtrado para 1.000 mL e foram adicionados 15 g de ágar. Colocou-se o meio de cultura em frascos Duran e autoclavou-se a 121°C,

por 30 min.; após 24h, autoclavou-se novamente por mais 30 min. (Tindalização). Após resfriamento a aproximadamente 45-50°C, o meio foi vertido em placas de Petri (20 mL placa⁻¹).

Inoculação, colonização e variável analisada

Discos de 4 mm de diâmetro de matriz secundária das linhagens ABI-05/03, ABI-06/04, ABI-04/02, ABI-06/05 e ABI-01/01 (cultivadas em placas de Petri, contendo meio de cultura à base de extrato de composto) foram depositados sobre os meios previamente preparados, compondo os tratamentos do presente experimento. As placas foram distribuídas em blocos casualizados e mantidas em estufa incubadora a 20 e 25°C. Neste período, a cada 48h, foram realizadas medições do crescimento radial do *A. bisporus* na superfície do meio de cultura, por meio 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.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados em esquema fatorial 5 x 2, cujos tratamentos corresponderam às combinações das cinco linhagens de *A. bisporus* e das duas condições de temperatura, com dez tratamentos no total. Cada tratamento foi composto por oito repetições, sendo cada repetição correspondente a uma placa de Petri, totalizando 80 placas.

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

Resultados e discussão

Os resultados do crescimento micelial das linhagens de *A. bisporus*, após 12 dias de incubação, em função de diferentes condições de temperatura, estão demonstrados na Tabela 1.

Houve interação positiva entre as linhagens de *A. bisporus* e as temperaturas de incubação (Tabela 1). As maiores médias de crescimento micelial ocorreram quando foram submetidas à temperatura de 25°C. Na condição de temperatura de 20°C, as linhagens ABI-06/05 e ABI-01/01 obtiveram as maiores médias de crescimento micelial, após 12 dias de incubação. Já na condição de temperatura de 25°C, a linhagem ABI-01/01 obteve a maior média 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 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.

Tabela 1. Crescimento micelial (mm) *in vitro* das linhagens de *Agaricus bisporus* em meios de cultura à base de extrato de composto, após 12 dias de desenvolvimento a 20 e 25°C.

| Linhagem | Temperatura de incubação | |
|-----------|--------------------------|------------|
| | 20°C | 25°C |
| ABI05/03 | 34,38 B b | 39,38 D a |
| ABI-06/04 | 36,25 B b | 44,00 C a |
| ABI-04/02 | 33,25 B b | 39,50 CD a |
| ABI-06/05 | 47,25 A b | 55,63 Ba |
| ABI-01/01 | 43,63 A b | 65,88 Aa |

Médias seguidas de letra distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

A eficiência da biodegradação por fungos varia em função da linhagem (ROYSE; SANCHEZ-VAZQUEZ, 2001). As diferenças de crescimento micelial entre linhagens fúngicas já foram relatadas por muitos pesquisadores (ANDRADE et al., 2008a; ANDRADE; GRACIOLLI, 2005; BOYLE, 1998; MAKI et al., 2001; SILVA et al., 2005). Donini et al. (2005), avaliando a velocidade de crescimento micelial de linhagens de *Pleurotus* spp. em diferentes substratos, observaram diferenças significativas na interação entre linhagens, substratos e dias de avaliação. Andrade et al. (2008a), ao avaliar 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.

As diferenças de crescimento micelial entre as linhagens de *A. bisporus* testadas no presente trabalho estão de acordo com Bilay et al. (2000) que, ao avaliarem o crescimento de 30 espécies de cogumelos comestíveis em diferentes meios de cultura, concluíram que o crescimento micelial das espécies estudadas é diferente e depende do tipo de meio utilizado e do pH. Dias et al. (2003) avaliando a produção do *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas (palha de feijão, palha de milho e casca de café), observaram que o crescimento micelial, a produção e a eficiência biológica dependem do composto utilizado. Andrade et al. (2008b) testando a produção de quatro linhagens de *A. bisporus* em três formulações de compostos também concluíram que o crescimento micelial é influenciado pelas linhagens, bem como pelos substratos de cultivo.

Pelas diferenças existentes entre linhagens de *A. bisporus*, conhecer os genótipos fúngicos mais adaptados a determinados substratos lignocelulósicos é um modo para aumentar a produção de *A. bisporus*, uma vez que, como já relatado por Silva et al. (2005), o crescimento do micélio influencia a produção de cogumelos. De acordo com estes autores, a taxa de formação de primórdios está diretamente relacionada com a biomassa micelial, que é formada durante o crescimento fúngico.

Os dados referentes ao crescimento micelial das linhagens de *A. bisporus* foram ajustados a um modelo linear (Figura 1). Para a condição de incubação de 20°C, a linhagem ABI-06/05 manteve-se com crescimento micelial superior ao das demais linhagens durante todo o período de avaliação (Figura 1a). Já a 25°C, esta linhagem obteve maior crescimento que a ABI-01/01 somente após dois dias de incubação (Figura 1b); após quatro dias de avaliação, ambas as linhagens obtiveram crescimentos semelhantes; já nas avaliações posteriores, a linhagem ABI-01/01 obteve médias de crescimento micelial superiores às das demais linhagens.

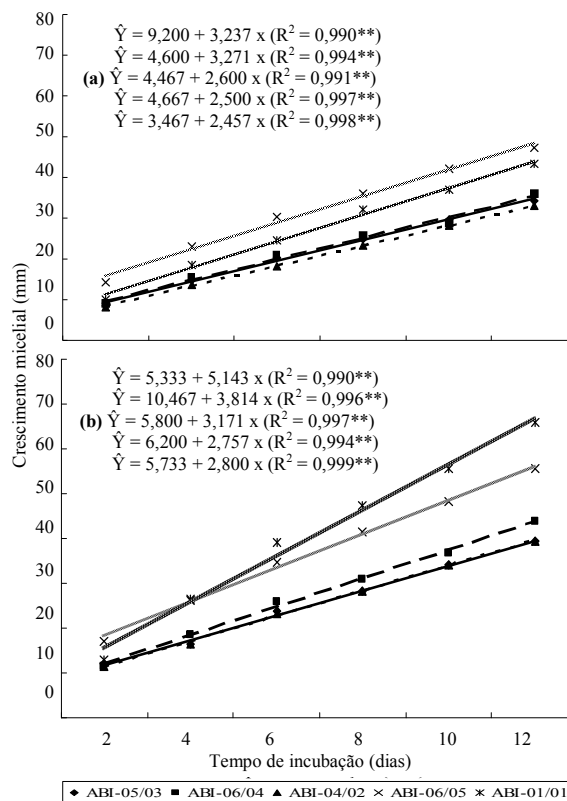


Figura 1. Crescimento micelial (mm) de cinco linhagens de *Agaricus bisporus*, durante 12 dias de avaliação, em meios de cultura à base de extrato de composto, a 20°C (a) e a 25°C (b). ** significativo a 1%.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos e de acordo com a condução do experimento proposto, verificou-se que: o crescimento de *A. bisporus* é influenciado pela temperatura de incubação; a temperatura de 25°C foi mais favorável para o crescimento micelial de todas as linhagens de *A. bisporus*; na temperatura de 20°C, o melhor crescimento foi obtido com as linhagens ABI-06/05 e ABI-01/01 e, na temperatura de 25°C, a linhagem ABI-01/01 apresentou crescimento significativamente maior que todas as demais.

Referências

- 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**, v. 30, n. 3, p. 333-337, 2008a.
- ANDRADE, M. C. N.; ZIED, D. C.; MINHONI, M. T. A.; KOPYTOSKI FILHO, J. Yield of four *Agaricus bisporus* strains in three compost formulations and chemical composition analyses of the mushrooms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 593-598, 2008b.
- ANDRADE, M. C. N.; CALONEGO, F. W.; MINHONI, M. T. A.; SEVERO, E. T. D.; KOPYTOSKI 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**, 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**, v. 27, n. 2, p. 293-299, 2005.
- 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. p. 779-782.
- BONONI, V. L. CAPELARI, M.; MAZIEIRO, R.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Ícone, 1999.
- BOYLE, C. D. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. **Soil Biology Biochemistry**, v. 30, n. 6, p. 817-823, 1998.
- DIAS, E. S.; KOSHIKIMO, E. M. S.; SCHWAN, R. F.; SILVA, R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.
- DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento *in vitro* de *Pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 331-338, 2005.
- DONINI, L. P. BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento *in vitro* de *Agaricus brasiliensis* em meios suplementados com diferentes farelos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 6, p. 995-999, 2006.
- HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 1, p. 71-74, 2001.
- 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.
- 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**, v. 32, n. 3, p. 170-175, 2001.
- MATA, G.; DELPECH, P.; SAVOIE, J. M. Selection of strains of *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* adapted for efficient mycelial growth on wheat straw. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, n. 1, p. 118-122, 2001.
- MINHONI, M. T. A.; KOPYTOSKI FILHO, J.; ANDRADE, M. C. N. **Cultivo de Agaricus blazei Murrill ss. Heinemann**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 2005.
- MONTINI, R. M. C.; PASSO, J. R. S.; EIRA, A. F. Digital monitoring of mycelium growth kinetics and vigor of shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) on agar medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 90-95, 2006.
- ÖZÇELİK, E.; PEKSEN, A. Hazelnut husk as a substrate for the cultivation of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2652-2658, 2007.
- ROYSE, D. J.; SANCHEZ-VAZQUEZ, J. E. Influence of substrate wood-chip particle size on shiitake (*Lentinula edodes*) yield. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 3, p. 229-233, 2001.
- 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**, v. 43, n. 11, p. 1633-1635, 2008.
- SAVOIE, J. M.; CESBRON, V.; DELPECH, P. Induction of polyphenol-oxidases in the mycelium of *Lentinula edodes*. In: ELLIOT, T. J. (Ed.). **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkmam, 1995. p. 787-793.
- 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. **Statiscal methods**. 6th ed. Ames: Iowa State University Press, 1972.

Received on May 6, 2007.

Accepted on October 31, 2007.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.