



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
 Coordenação de Capacitação
 Divisão Apoio Técnico

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO INPA
 RELATÓRIO FINAL

CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE ISOLADOS DE *Lentinula raphanica* COLETADOS NA AMAZÔNIA

BOLSISTA: Daniele Rodrigues Silva

ORIENTADORA: Dra. Ruby Vargas Isla

COLABORADORA: Dra. Noemia Kazue Ishikawa

Relatório Final apresentado ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como requisito para a conclusão como participante do Programa de Iniciação Científica do INPA.

Manaus – Amazonas

2017

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA
 CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
 INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





Crescimento micelial *in vitro* de isolados de *Lentinula raphanica* coletados na Amazônia

Resumo

Na Amazônia foi registrada na década de 70 e 80 por Oswaldo Fidalgo e Guillelan Prance a comestibilidade de cogumelos de algumas espécies de ocorrência natural. Uma das espécies é a *Lentinula raphanica* (Murrill) J.L. Mata & R.H. Petersen que pertence ao mesmo gênero do shiitake (*L. edodes* (Berk.) Pegler). Em 2016 foi publicado o livro “Ana Amopö: Cogumelos. Enciclopédia dos alimentos Yanomami (Sanöma)”, onde consta que uma das 15 espécies consumidas é *L. raphanica*. A espécie *L. raphanica* mostra potencial para o cultivo nos trópicos. Atualmente, a busca por isolados resistentes a altas temperaturas é uma das alternativas procuradas para diminuir os custos com energia elétrica gasta para reduzir a temperatura dos locais de cultivo. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar e determinar o efeito da temperatura e meio de cultura no crescimento micelial *in vitro* de 14 isolados de *L. raphanica* coletados na Amazônia. O crescimento micelial foi avaliado pela mensuração do diâmetro e massa da colônia no sétimo dia de crescimento em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA). Cinco diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35 e 40 °C) foram utilizadas como tratamento. Após determinar a temperatura ótima foram testados os meios de cultura: BDA, Extrato de Malte e Peptona Ágar (EMPA), Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) e Ágar Água (AA). Os resultados foram avaliados pelo ANOVA e teste de Scott-Knott ($p < 0,01$) para comparação das médias. O tratamento com temperatura de 30 °C favoreceu a melhor média de crescimento e massa micelial dos 14 isolados. Embora com menor crescimento, houve crescimento micelial a 35 °C o que torna um resultado expressivo para a busca de isolados resistentes a altas temperaturas, considerando que a temperatura média para o shiitake é de 25 °C e normalmente o micélio desta espécie não tem crescimento a 30 °C. Nos meios de cultura BDA, EMPA e SDA, a média dos isolados de *L. raphanica* mantidos a 30 °C foram os melhores para o crescimento micelial. A média do crescimento micelial *in vitro* de 14 isolados de *L. raphanica* é a 30 °C e os meios de cultura que favorecem o crescimento micelial são BDA, EMPA e SDA.

Palavras Chave: Basidiomiceto, cogumelo nativo, comestibilidade, temperatura, meios de cultura.

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Coordenação de Capacitação
Divisão Apoio Técnico

Subárea: Multidisciplinar

Financiamento

PIBIC/CNPq

Data: 23 / 11 / 2017


Orientadora


Bolsista


Colaboradora

Apoio Financeiro



Realização



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVACÕES E COMUNICAÇÕES



1 INTRODUÇÃO

Assim como as plantas formam frutos para proporcionar a continuidade da espécie, alguns grupos de fungos desenvolvem corpos de frutificação visíveis a olho nu, os macrofungos, conhecidos popularmente como cogumelos e orelhas-de-pau (Ishikawa *et al.* 2012).

A importância dos fungos para a manutenção e equilíbrio das florestas e seu potencial de uso biotecnológico é indiscutível. Entre as diversas possibilidades de utilização dos fungos, a produção de cogumelos (fungicultura), tem sido considerada como uma ótima alternativa de bioconversão de resíduos lignocelulósicos em alimento de alto valor nutricional, gastronômico e econômico, por exemplo: *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach (champignon), *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (shiitake), *Pleurotus* spp. (shimeji) e outras espécies de climas temperados (Sánchez 2004). Existem mais de 200 gêneros de macrofungos utilizados pelo homem, principalmente pelas suas propriedades comestíveis (Boa 2004).

A comestibilidade dos cogumelos de algumas espécies de ocorrência natural da Amazônia foi registrada na década de 70 e 80 por Oswaldo Fidalgo e Guillelan Prance, entretanto a produção em escala comercial ainda é pouco explorada (Vargas-Isla *et al.* 2013).

O gênero *Lentinula* que tem como representante o *L. edodes*, um cogumelos mais cultivados no mundo. Nas Américas é encontrada *L. raphanica* (Murrill) J.L. Mata & R.H. Petersen (Figura 1), sendo relatada a primeira ocorrência no estado do Amazonas em 2010 (Capelari *et al.* 2010). Na Colômbia, esta espécie é consumida pelos grupos indígenas Uitoto e Andoke que consideram como um alimento saudável (Vasco-Palacios *et al.* 2008). Em 2016 foi publicado o livro “*Ana Amopö: Cogumelos. Enciclopédia dos alimentos Yanomami (Sanöma)*” onde consta 15 espécies consumidas pelos indígenas Yanomami do grupo Sanöma, sendo uma destas a *L. raphanica*.

A espécie *L. raphanica* mostra potencial para o cultivo nos trópicos. Atualmente, a busca por isolados resistentes a altas temperaturas é uma das alternativas procuradas para diminuir os custos com energia elétrica gasta para reduzir a temperatura dos locais de cultivo.

Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar e determinar o efeito da temperatura e meio de cultura no crescimento micelial *in vitro* de 14 isolados de *L. raphanica* coletados na Amazônia.



Figura 1. Basidiomas de *Lentinula raphanica* no ambiente natural.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

Separou-se 14 isolados de *L. raphanica* (Quadro 1) que se encontram armazenados na coleção interna do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Para a preparação do inóculo foram retirados um fragmento da cultura micelial estoque, transferiu-se o fragmento para placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 15 mL de meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e foram mantidas em estufa com Demanda Biológica de Oxigênio (BOD) a 25 °C, em ausência de luz, durante dez dias.

Quadro 1. Isolado de *Lentinula raphanica* coletados na Amazônia

Nº	Isolado	Herbário	Local de coleta
1	INPACM 1701	INPA 271015	Brasil, Amazonas, Itacoatiara
2	INPACM 1703	INPA 271116	Brasil, Amazonas, Itacoatiara
3	INPACM 1810	INPA 272277	Brasil, Amazonas, Itacoatiara
4	INPACM 1811	INPA 272279	Brasil, Amazonas, Itacoatiara
5	INPACM 1812	INPA 272284	Brasil, Amazonas, INPA-Campus III
6	INPACM 1813	INPA 272278	Brasil, Amazonas, Manaus, Reserva Adolfo Ducke
7	INPACM 1814	INPA 272273	Brasil, Amazonas, Itacoatiara
8	INPACM 1815	INPA 272270	Brasil, Amazonas, Reserva Cuieiras ZF2
9	INPACM 1816	INPA 272283	Brasil, Amazonas, Presidente Figueiredo
10	INPACM 1818	INPA 272274	Brasil, Amazonas, Manaus, Reserva Adolfo Ducke
11	INPACM 1819	INPA 272272	Brasil, Amazonas, Itacoatiara
12	INPACM 1823	INPA 272275	Brasil, Amazonas, Manaus, Reserva Adolfo Ducke
13	INPACM 1824	INPA 272276	Brasil, Amazonas, Itacoatiara
14	INPACM 1825	INPA 272282	Brasil, Amazonas, Itacoatiara

2.2 Efeito da temperatura

Retirou-se de cada placa de Petri um novo fragmento que foi utilizado como inóculo no experimento. No centro de cada placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura BDA adicionou-se o inóculo de cada isolado e mantidos em estufas com temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40 °C, na ausência de luz até que a colônia de um dos isolados atingisse a borda da placa. O mesmo procedimento foi utilizado para a repetição do experimento para confirmação dos dados obtidos.

2.3 Efeito do meio de cultura

Foram utilizados quatro meios de cultura: BDA (Himedia Laboratories PVT. LTD., Índia), Extrato de Malte Peptona Ágar (EMPA; Acumedia, NEOGEN Corporation, Michigan, USA), Sabouraud Dextrose Ágar (SDA; Himedia Laboratories PVT. LTD., Índia) e Ágar Água (AA; Himedia Laboratories PVT. LTD., Índia). Os meios foram preparados e esterilizados a 121 °C durante 15 minutos. Em seguida foram vertidos nas placas de Petri (9 cm de diâmetro) esterilizadas. Após esfriamento dos meios de cultura adicionou-se ao centro de cada placa um fragmento de cultura micelial (2x2 mm aproximadamente) de 14 isolados de *L. raphanica* e incubados a 30 °C em estufa tipo BOD no período de sete dias, na ausência de luz.

2.4 Avaliação do crescimento micelial

Para avaliar o crescimento micelial foi mesurado o diâmetro e massa da colônia micelial de cada um dos isolados. Para avaliar o diâmetro da colônia foi realizado linhas perpendiculares na superfície da placa com ajuda de régua e os diâmetros foram mesurados utilizando paquímetro digital (cm). A massa micelial seca obteve-se seguindo a metodologia descrita por Vargas-Isla e Ishikawa (2008) que consiste na separação da colônia micelial do meio de cultura derretendo com ajuda de microondas por aproximadamente 30 segundos. Após a separação a massa micelial desidrata-se em estufa com circulação de ar a 65 °C por 24h, seguida por 105 °C até obtenção de massa micelial constante. A massa micelial seca mensurou-se com o auxílio de balança analítica.

2.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental consistiu em cinco replicatas e duas repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao ANOVA e as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,01$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *L. raphanica* apresentaram crescimento micelial nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C e na temperatura de 40 °C não houve crescimento micelial dos isolados testados. Com base nos resultados a partir do ANOVA e as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,01$), do diâmetro da colônia e massa micelial seca verificou-se que a 30 °C foi a melhor temperatura para o crescimento micelial dos 14 isolados de *L. raphanica*. Este tratamento proporcionou a melhor média do diâmetro (Figura 2) e da massa micelial seca (Figura 3) dos 14 isolados. Mata e Mishra (2015) avaliaram a taxa de crescimento micelial de cinco espécies de *Lentinula*, dentre elas sete isolados de *L. raphanica* coletados nos Estados Unidos da América (USA), Puerto Rico e Costa Rica. O melhor resultado da taxa de crescimento micelial (mm/dia) para os sete isolados avaliados de *L. raphanica* foi de 25 e 30 °C e fizeram a correlação entre o crescimento *in vitro* em resposta à temperatura e o habitat dos isolados avaliados. Dados similares foram obtidos para *Panus strigellus* (Berk.). Overh. Um isolado da Amazônia que apresentou crescimento *in vitro* a 35 °C o que corresponde com a temperatura do local de coleta que atingia até 38 °C (Vargas-Isla e Ishikawa 2008). O que leva a comparar nossos resultados de crescimento micelial a 30 °C com o local de coleta de cada um dos 14 isolados de *L. raphanica*.

No entanto, dos 14 isolados avaliados houve crescimento micelial a 35 °C o que torna um resultado expressivo para a busca de isolados resistentes a altas temperaturas, considerando que a temperatura média para o shiitake é de 25 °C e normalmente o micélio desta espécie não tem crescimento a 30 °C. Os protocolos de cultivo *in vitro*, descritos em literatura para cogumelos, estão geralmente correlacionados com habitat de espécies de clima temperado, é necessário o estudo de protocolos para as espécies de clima tropical (Vargas-Isla e Ishikawa 2008), como é o caso da *L. raphanica*. Os dados obtidos são o primeiro passo para conhecer as condições ótimas do cogumelo para futuros estudos de fungicultura.

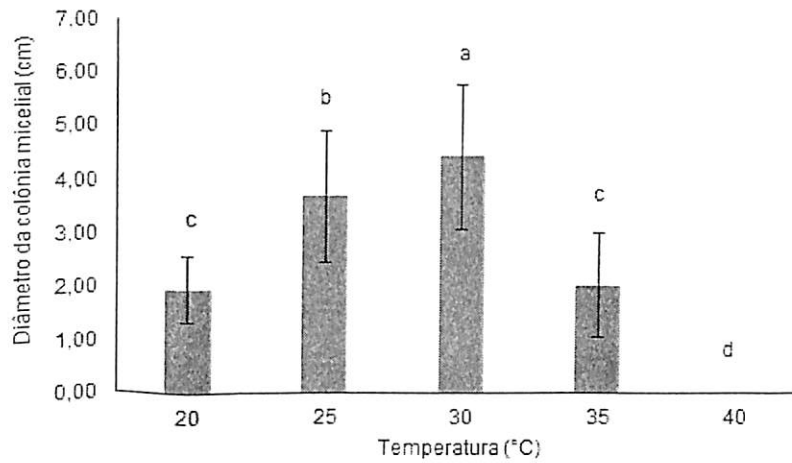


Figura 2. Média do crescimento micelial de 14 isolados de *Lentinula raphanica* em meio de cultura de batata dextrose ágar, mantidos em cinco temperaturas. Médias com a mesma letra minúscula não diferem significativamente ($p < 0,01$) pelo teste de Scott-Knott. Barra em cada coluna indica o desvio padrão. Dados do diâmetro da colônia micelial (cm), $n=5$. Dados mensurados após sete dias de crescimento micelial..

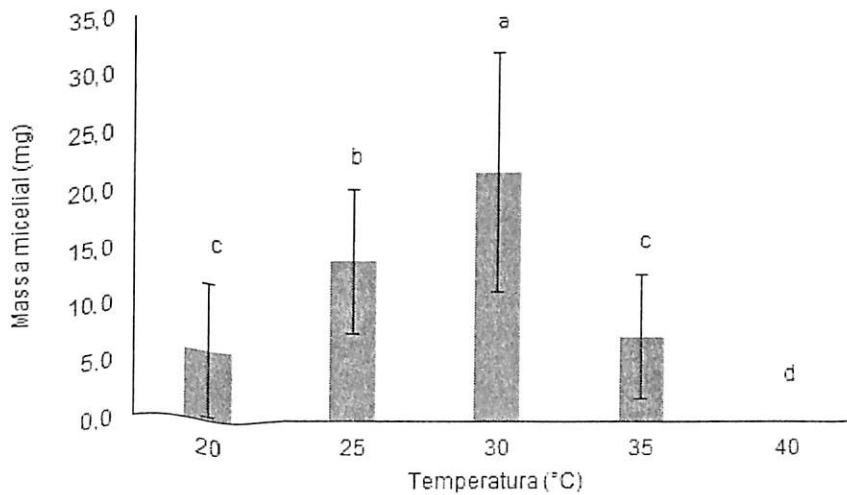


Figura 3. Média do crescimento micelial de 14 isolados de *Lentinula raphanica* em meio de cultura de batata dextrose ágar, mantidos em cinco temperaturas. Médias com a mesma letra minúscula não diferem significativamente ($p < 0,01$) pelo teste de Scott-Knott. Barra em cada coluna indica o desvio padrão. Dados da massa micelial seca (mg), $n=4$. Dados mensurados após sete dias de crescimento micelial.

Nos meios de cultura BDA, EMPA e SDA, a média dos 14 isolados de *L. raphanica* mantidos a 30 °C foram obtidos os melhores crescimentos miceliais (Figura 4) e a maior massa micelial (Figura 5). De acordo com a análise estatística não houve diferença significativa entre os três meios mencionados. Em relação ao meio AA houve crescimento micelial, porém com massa e diâmetro das colônias menores, resultado semelhante obtido para o isolado de *P. strigellus* (Vargas-Isla e Ishikawa 2008). Considerando o menor custo de preparação, o meio BDA foi o melhor meio cultura.

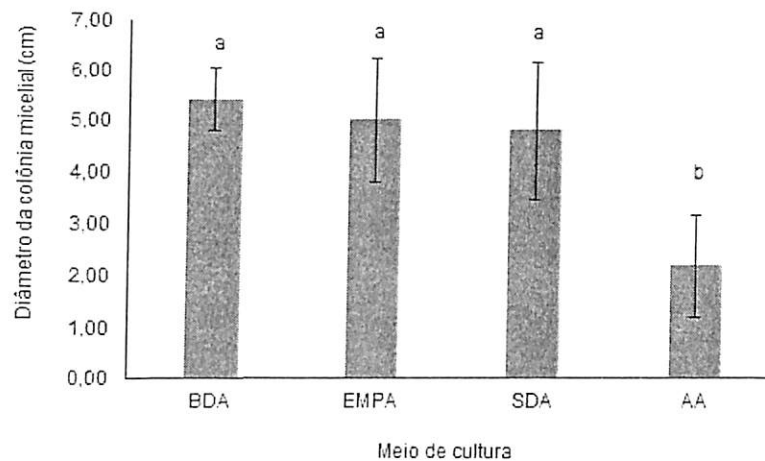


Figura 4. Média do crescimento micelial de 14 isolados de *Lentinula raphanica* em quatro meios de cultura, mantidos a 30 °C. Médias com a mesma letra minúscula não diferem significativamente ($p < 0,01$) pelo teste de Scott-Knott. Barra em cada coluna indica o desvio padrão. BDA=Batata Dextrose Ágar; EMPA=Extrato de Malte e Peptona Ágar; SDA=Sabouraud Dextrose Ágar; AA=Ágar Água. Dados do diâmetro da colônia micelial (cm); n=5. Dados mensurados após sete dias de crescimento micelial.

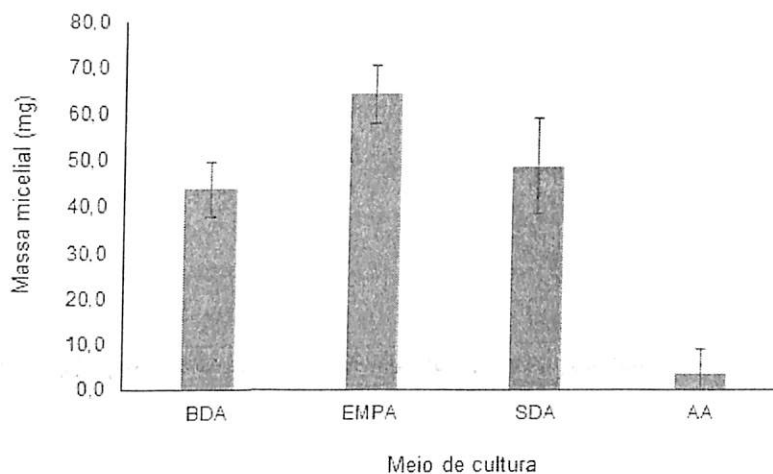


Figura 5. Média do crescimento micelial de 14 isolados de *Lentinula raphanica* em quatro meios de cultura, mantidos a 30 °C. Médias com a mesma letra minúscula não diferem significativamente ($p < 0,01$) pelo teste de Scott-Knott. Barra em cada coluna indica o desvio padrão. BDA=Batata Dextrose Ágar; EMPA=Extrato de Malte e Peptona Ágar; SDA=Sabouraud Dextrose Ágar; AA=Ágar Água. Dados da massa micelial seca (mg); n=5. Dados mensurados após sete dias de crescimento micelial.

4 CONCLUSÃO

A média do crescimento micelial *in vitro* de 14 isolados de *L. raphanica* é a 30 °C. Os meios de cultura que favorecem o crescimento micelial são BDA, EMPA e SDA.

5 REFERÊNCIAS

- Boa, E. 2004. *Wild edible fungi*. A global overview of their use and importance to people. Rome: FAO, 148 pp.
- Capelari, M.; Asai, T.; Ishikawa, N.K. 2010. Occurrence of *Lentinula raphanica* in Amazonas State, Brasil. *Mycotaxon*, 113: 355-364.
- Ishikawa, N. K., Vargas-Isla, R., Chaves, R. S., Cabral, T. S. 2012. Macrofungos da Amazônia importância e potencialidades.
- Mata, J.L.; Mishra, N.T. 2015. Comparative study of worldwide species of genus *Lentinus* (= *Lentinula*, Higher Basidiomycetes) based on linear mycelium growth. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(5): 481-489.
- Sánchez, C. 2004. Modern aspects of mushroom culture technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6): 756-762.
- Sanõma, O.I.; Tokimoto, K.; Sanõma, C.; Autouri, J.; Sanõma, L.R.; Sanõma, M.; Martins, M.S.; Menolli Jr., N.; Ishikawa, N.K.; Apiamõ, R.M. 2016. *Ana amopõ Cogumelos: Enciclopédia dos alimentos Yanomami (Sanõma)*. Instituto Socioambiental, São Paulo. 108 pp.
- Vargas-Isla, R.; Ishikawa, N.K. 2008. Optimal conditions of *in vitro* micelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon. *Mycoscience*, 49: 215-219.
- Vargas-Isla, R.; Ishikawa, N.K.; Py-Daniel, V. 2013. Contribuições Etnomicológicas dos povos indígenas da Amazônia. *Biota Amazônia*, 3(1): 58-65.

Vasco-Palacios, A.M.; Suaza, S.C.; Castaño-Betancur, M.; Franco-Molano, A.E. 2008.
Conocimiento etnoecológico de los hongos entre los indígenas Uitoto, Muinane y Andoke
de la Amazonía Colombiana. *Acta Amazonica*, 38(1): 17-30.

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

