

VIABILIDADE DE *Agaricus blazei* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE PRESERVAÇÃO

Henrique Susumu Tanaka¹
 Talita Rafaela D'Agostini Mantovani¹
 Kassia Vanessa Navarro Geromini²
 Suzana Harue Umeo³
 Lienine Luiz Zaghi Junior³
 Giani Andrea Linde⁴
 Nelson Barros Colauto⁴

TANAKA¹, H. S.; MANTOVANI¹, T. R. D.; GEROMINI², K. V. N.; UMEO³, S. H.; ZAGHI-JUNIOR³, L. L.; LINDE⁴, G. A.; COLAUTO⁴, N. B. Viabilidade de *Agaricus blazei* em diferentes condições de preservação. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, Umuarama, v. 14, n. 1, p. 13-17, jan./jun. 2011.

RESUMO: A técnica de transferências periódicas de fragmentos de micélio para novo meio de cultura é a mais utilizada para a preservação de *Agaricus blazei*. Entretanto, esta técnica apresenta maior risco de contaminação, degeneração genética e perda de características biológicas. O desenvolvimento de técnicas de preservação que permitam a manutenção da viabilidade da espécie por mais tempo e a um menor custo é de interesse biotecnológico. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de *A. blazei* crescido em dois meios de cultivo e preservado à +4 °C ou -20 °C em diferentes recipientes de contenção. O fungo foi crescido em meio de ágar-extrato de malte ou ágar-grão de trigo moído e preservado à +4 °C ou -20 °C em diferentes recipientes de contenção, simples ou duplos, com adição de soluções aquosas de glicerol, sacarose, glicose, água ultrapura ou sem adição de crioprotetor. Após 1 ou 12 meses o micélio preservado foi transferido para ágar-extrato de malte para avaliação da viabilidade micelial. Os crioprotetores glicerol, sacarose e glicose, associados com o meio de cultura ágar-extrato de malte ou ágar-grão de trigo moído, em recipiente de contenção simples ou duplo são efetivos para preservação à +4 °C por períodos curtos, um mês, mas não são efetivos para períodos longos, 12 meses. Os crioprotetores, meios de cultivo e recipientes de contenção simples ou duplos não são efetivos para criopreservação do fungo à -20 °C. Os recipientes simples são tão eficientes quanto os recipientes duplos para evitar contaminações e preservar o fungo.

PALAVRAS-CHAVE: *Agaricus brasiliensis*. Manutenção. Germoplasma. Criopreservação. Refrigeração.

VIABILITY OF *Agaricus blazei* UNDER DIFFERENT PRESERVATION CONDITIONS

ABSTRACT: Continuous mycelial subculturing is frequently used for the preservation of *Agaricus blazei*. However, this technique has a higher risk of contamination, genetic degeneration and loss of biological characteristics. The development of preservation techniques that allow maintaining the viability of this species longer and at lower costs is of biotechnological interest. Thus, the objective of this study was to evaluate the viability of *A. blazei* grown in two culture media and preserved at +4 °C or -20 °C in different containment vessels. The fungus was grown on malt extract agar or grounded wheat grain agar culture medium and preserved at +4 °C or -20 °C in different containment vessels, single or double ones, with the addition of aqueous solutions of glycerol, saccharose, glucose, ultrapure water or without addition of cryoprotectant. After 1 or 12 months, the preserved mycelium was transferred to malt extract agar for assessment of mycelial viability. Glycerol, saccharose and glucose associated with malt extract agar or grounded wheat grain agar culture medium, in single or double containment vessels, are effective for preservation at +4 °C for a short period, one month, but they are not effective for a longer period, 12 months. Cryoprotectants, culture media and single or double containment vessels are not effective for fungus cryopreservation at -20 °C. Simple containment vessels are as efficient as double ones to prevent contamination and to preserve the fungus.

KEYWORDS: *Agaricus brasiliensis*. Maintenance. Germplasm. Cryopreservation. Cooling.

VIABILIDAD DE *Agaricus blazei* EN DIFERENTES CONDICIONES DE PRESERVACIÓN

RESUMEN: La técnica de transferencias periódicas de fragmentos de micelio para nuevo medio de cultura es la más utilizada para la preservación de *Agaricus blazei*. Sin embargo, esta técnica presenta mayor riesgo de contaminación, degeneraciones genéticas y pérdidas de características biológicas. El desarrollo de técnicas de preservación que permitan la mantención y viabilidad de la especie por más tiempo y con un costo más bajo es de interés biotecnológico. De esta manera, el objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad de *A. blazei* sembrado en dos medios de cultivo y preservados en +4 °C o -20 °C en diferentes recipientes de contención. El hongo se cultivó en medio de extracto de agar de malta o agar de grano de trigo molido y preservado en +4 °C o -20 °C en diferentes recipientes de contención simple o doble, con adición de soluciones acuosas de glicerol, sacarosa, glucosa, agua ultra pura o sin adición de crioprotector. Después de 1 o 12 meses, el micelio

¹ Mestre em Biotecnologia Aplicada à Agricultura - UNIPAR

² Acadêmica da Farmácia e Bolsista de Iniciação Científica - PIBIC - UNIPAR

³ Mestrando em Biotecnologia Aplicada à Agricultura - UNIPAR

⁴ Docente do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura – Universidade Paranaense – UNIPAR. E-mail: nbc@unipar.br

preservado fue transferido para extracto de agar de malta para evaluación de la viabilidad del micelio. Los crioprotectores glicerol, sacarosa y glucosa, asociados con el medio de cultura extracto de agar de malta o de agar de grano de trigo molido, en recipiente de contención simple o doble son eficaces para la preservación a +4 °C por períodos cortos, un mes, pero no son eficaces por períodos largos, como 12 meses. Los crioprotectores medios de cultivo y recipientes de contención simples o dobles no son eficaces para la criopreservación del hongo a -20 °C. Recipientes simples son tan eficaces como los dobles para evitar contaminaciones y preservar el hongo.

PALABRAS CLAVE: *Agaricus brasiliensis* Mantenimiento. Germoplasma. Criopreservación. Enfriamiento.

Introdução

Agaricus blazei Murrill ss. Heinemann (HEINEMANN, 1993) também descrito como *Agaricus brasiliensis* (WASSER et al., 2002) ou *Agaricus subrufescens* Peck (KERRIGAN, 2005) é um basidiomiceto nativo do Brasil (COLAUTO et al., 2010a; 2010b; 2010c). Entretanto, Colauto et al. (2011b) relatam que *A. brasiliensis* e *A. subrufescens* são nomes ilegítimos por terem sido publicados anteriormente e portanto neste estudo será utilizado o nome *A. blazei*. Este fungo possui importância biotecnológica devido a sua atividade antitumoral (MOURÃO et al., 2009), imunomoduladora (WASSER et al., 2002), antimutagênica (SOUZA-PACCOLA et al., 2004), antioxidante (MOURÃO et al., 2011b), anti-inflamatória (MOURÃO et al., 2011a), produtora de lacase (D'AGOSTINI et al., 2011) e valor gastronômico (ESCOUTO et al., 2005).

Apesar de sua importância biotecnológica, pouco é relatado sobre as formas de preservação deste fungo. Tradicionalmente a manutenção de basidiomicetos ocorre pela transferência periódica de fragmentos de micélio para meios de cultivo, no entanto esta técnica está sujeita à contaminações e a perda de características biológicas, genéticas ou fisiológicas (HOMOLKA; LISÁ; NERUD, 2006; VOYRON et al., 2009). Ademais, *A. blazei* é sensível a diversos métodos de preservação, necessitando adequação de protocolos específicos. O primeiro relato sobre técnicas de preservação de longo prazo para este fungo foi descrito por Colauto, Eira e Linde (2011) com o uso de criopreservação a -80 °C. Em nosso laboratório verificou-se que para este fungo houve variação da viabilidade micelial após 1,5 anos de congelamento em nitrogênio líquido, apesar de esta técnica ser a mais recomendada e utilizada para basidiomicetos (MATA; PÉREZ-MERLO, 2003; HOMOLKA; LISÁ; NERUD, 2006).

A criopreservação à -20 °C de basidiomicetos apresenta desafios no curto e longo prazo e ainda não foi desenvolvida para *A. blazei*. Entretanto, Mantovani et al. (2008) e Mantovani (2008) criopreservaram à -20 °C *Pleurotus ostreatus* em curto e longo prazo e relataram que apesar desta técnica ser pouco explorada, ela pode trazer um novo enfoque na criopreservação, devido a maior facilidade de aquisição de equipamentos. Colauto, Eira e Linde (2011) citam efeitos deletérios quando temperaturas de refrigeração (+4 °C) são usadas em *A. blazei*, no entanto esta técnica ainda não foi efetivamente testada.

Outros fatores além da temperatura podem afetar a viabilidade deste fungo como meio de cultivo, crioprotetor e recipiente de contensão. Colauto, Eira e Linde (2011) relatam o uso de grãos de cereais como meio de cultivo para a criopreservação de *A. blazei* à -80 °C, porém pouco se sabe sobre o uso de diferentes meios de cultivo e crioprotetores para a manutenção deste fungo à +4 °C ou à -20 °C. O uso de diferentes recipientes de contensão pode afetar a viabi-

lidade do fungo pela proteção que uma camada de ar pode oferecer entre recipientes, com redução de choques térmicos, e maior proteção contra vazamentos e contaminação da amostra. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade micelial de *A. blazei* crescido em dois meios de cultivo, diferentes crioprotetores e preservados à +4 °C ou à -20 °C em diferentes recipientes de contensão.

Material e Métodos

Utilizou-se a linhagem U2/1 de *A. blazei* (antiga ABL97/11) proveniente da micoteca do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Paranaense. O micélio foi transferido para ágar-extrato de malte (AEM, 2%), previamente autoclavado a 121 °C por 20 min e mantido à 25 °C ± 1 °C no escuro por 21 dias. Micélio com crescimento uniforme e sem setoriamento foi selecionado como inóculo.

Os meios de cultivo foram AEM ou ágar-grão de trigo moído (ATR, 40 g/L), sendo que grãos de trigo integrais foram moídos em moinho de facas de bancada, obtendo uma farinha com granulometria menor que 355 µm. Ambos os meios de cultivo foram preparados com água ultrapura, autoclavados a 121 °C por 30 min e transferidos para placas de Petri (90 mm). Um cilindro de AEM contendo o inóculo foi posicionado no centro da placa, tomando-se o cuidado para que o micélio ficasse em contato com o meio de cultivo, e mantido à 25 °C ± 1 °C no escuro por 21 dias.

As ampolas para preservação do fungo foram preparadas a partir de tubos plásticos (canudos de refrigerantes) de 5 cm de comprimento, com uma das extremidades termoselada, e autoclavadas a 121 °C por 30 min (CHALLENGE; ELLIOT, 1986). As ampolas foram divididas em dois tipos: ampola simples e ampola dupla. A ampola simples foi usada somente um tubo de 0,5 cm de diâmetro enquanto a ampola dupla teve um tubo dentro de outro, sendo o tubo menor de 0,5 cm e o maior de 0,6 cm de diâmetro.

Os crioprotetores utilizados foram soluções aquosas de glicerol 5% (GO), sacarose 15% (SA), glicose 4% (GE), água ultrapurificada (AG), previamente autoclavadas a 121 °C por 30 min, ou sem adição de crioprotetor (SC). Em cada ampola foram adicionados 450 µL da solução crioprotetora e cinco discos de meio de cultura (AEM ou ATR) de 0,4 cm de diâmetro contendo o micélio. Em seguida a outra extremidade das ampolas (simples ou dupla) foram termoseladas em temperatura ambiente (23 °C) e armazenadas à +4 °C ou a -20 °C.

Após 1 ou 12 meses de preservação, três ampolas de cada tratamento foram retiradas. As ampolas mantidas à -20 °C foram descongeladas em água a 30 °C por 15 min (MANTOVANI et al., 2008). As ampolas preservadas à +4 °C foram mantidas em temperatura ambiente (23 °C) por 15 min. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as ampolas foram higienizadas com álcool 70% e em seguida com álcool

92%. Uma das extremidades da ampola foi cortada, o excesso de solução crioprotetora removido, os discos transferidos para AEM e mantidos a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ no escuro por 30 dias. Cada disco foi considerado uma repetição, sendo avaliados viáveis e recuperados aqueles tratamentos que obtiveram crescimento micelial igual ou superior a 75% (HOMOLKA; LISÁ; NERUD, 2006; COLAUTO; EIRA; LINDE, 2011; COLAUTO et al., 2011a).

Resultados e Discussão

A preservação à $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um mês foi efetiva para

todos os tratamentos, com viabilidade micelial de 80% a 100%, exceto para SC, porém por 12 meses nenhum tratamento foi efetivo (Tabela 1). Isto comprova as observações de que *A. blazei* apresenta dificuldade de sobreviver em temperaturas de refrigeração (WASSER et al., 2002; KER-RIGAN, 2005; COLAUTO; EIRA; LINDE, 2011). Já a criopreservação à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de *A. blazei* não foi efetiva nem por um mês (Tabela 1). Provavelmente a taxa de congelamento à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, que favorece a formação de cristais de gelo grandes, ainda é o principal fator de danos celulares e de baixa sobrevivência (UENO et al., 2004).

Tabela 1: Viabilidade micelial (%) de *Agaricus blazei* preservado em diferentes condições pelo período de 1 ou 12 meses.

Temperatura	Crioprotetor	Ampola simples				Ampola dupla			
		AEM		ATR		AEM		ATR	
		1 mês	12 meses	1 mês	12 meses	1 mês	12 meses	1 mês	12 meses
$+4\text{ }^{\circ}\text{C}$	GO	100	0	100	0	100	0	100	0
	SA	100	0	100	0	100	0	100	0
	GE	100	0	100	0	100	0	100	0
	AG	80	0	100	0	100	0	100	0
	SC	60	0	60	0	80	0	100	0
$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	GO	0	0	0	0	0	0	0	0
	SA	0	0	40	0	0	0	0	0
	GE	40	0	0	0	0	0	0	0
	AG	0	0	0	0	0	0	0	0
	SC	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: GO (glicerol), SA (sacarose), GE (glicose), AG (água ultrapura), SC (sem crioprotetor), ATR (ágar-trigo moído) e AEM (ágar-extrato de malte).

A. blazei preservado à $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um mês, com GO, SA e GE, foi 100% efetivo. O efeito positivo do crioprotetor é ainda mais evidenciado nos tratamentos à $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ com AG, 80% a 100% efetivo, em que água foi utilizada no lugar de crioprotetor. A água tem um efeito amplificador das crioinjúrias, proporcionando a formação de cristais de gelo e, provavelmente, devido ao metabolismo que não totalmente paralisado, amplificou o efeito da desidratação após 12 meses, inviabilizando a sobrevivência celular. Neste sentido, os crioprotetores GO, SA e GE atuam ligando água externa à célula, aproximando as forças osmóticas intra e intercelulares e reduzindo a desidratação celular causada pela redução da solubilidade dos solutos em baixas temperaturas (HÚBALEK, 2003; DUMONT; MARECHAL; GERVAIS, 2004). A manutenção de água intracelular é fundamental para a solubilização dos solutos e manutenção das reações metabólicas responsáveis pela viabilidade celular. Apesar dos efeitos positivos dos crioprotetores na manutenção celular em baixas temperaturas, estes não foram efetivos para a preservação à $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ após 12 meses. Como este processo de preservação não paralisa a atividade metabólica, somente a reduz, provavelmente o tempo de preservação proporcionou acúmulo de metabólitos secundários produzidos em anaerobiose. Colauto et al. (2011a) verificaram que *A. blazei* preservado sob óleo mineral à $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um ano e $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por quatro anos não foram viáveis, devido no primeiro a temperatura de refrigeração, e no segundo ao tempo de preservação prolongado, similar ao relatado em nossa pesquisa. Desta forma, a preser-

vação de *A. blazei* à $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ é viável, porém está limitada a um período de curto prazo.

O micélio crescido em ATR e criopreservado em ampolas duplas com SC foi de 80% a 100% efetivo por um mês a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto que para ampola simples não foi efetivo (menos que 75% de viabilidade micelial) (Tabela 1). Isto indica a ampola dupla teve um efeito positivo na preservação do fungo. Este efeito pode estar relacionado ao isolamento térmico do frio pela camada de ar entre as ampolas, reduzindo o choque térmico da diferença de temperatura durante as primeiras horas de preservação a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para os outros tratamentos não houve praticamente diferença entre o tipo de ampola, sendo todos viáveis. A taxa de contaminação foi zero, sendo as ampolas simples tão efetivas quanto as ampolas duplas. É possível observar que ATR foi mais consistente na preservação do fungo por um mês, evidenciados quando comparado com os tratamentos AG e SC. O efeito crioprotetor de ATR pode estar relacionado ao amido e proteínas presente no trigo, que tem a capacidade de ligar a água livre, reduzindo a desidratação celular (LOBO; SILVA, 2003). De forma geral, após um mês de preservação à $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ o tempo para início do crescimento micelial foi entre 5 e 11 dias indicando que o fungo sofreu maior estresse do que se imaginava a esta temperatura. Geralmente este tempo de resposta está associada à recuperação após o congelamento.

Conclusões

Conclui-se que os GO, SA e GE associados com o meio de cultura AEM ou ATR e ampola simples ou dupla são efetivos para preservação a +4 °C de *A. blazei* por períodos curtos, um mês, mas não por períodos longos, 12 meses. Os crioprotetores, meios de cultivo e ampolas simples ou duplas não são efetivos para manter a viabilidade do fungo criopreservado à -20 °C. As ampolas simples são tão eficientes quanto as ampolas duplas para evitar contaminações e preservar o fungo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Paranaense e a CAPES pelo apoio financeiro e pela bolsa de estudos concedida.

Referências

- CHALLEN, M.; ELLIOT, T. J. Polypropylene straw ampoules for the storage of microorganisms in liquid nitrogen. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 5, p. 11-23, 1986.
- COLAUTO, N. B.; EIRA, A. F.; LINDE, G. A. Cryopreservation at -80°C of *Agaricus blazei* on rice grains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 27, n. 12, p. 3015-3018, 2011.
- COLAUTO, N. B. et al. Alternative to peat for *Agaricus brasiliensis* yield. **Bioresource Technology**, Barking, v. 101, n. 2, p. 712-716, 2010a.
- COLAUTO, N. B. et al. Pasteurization of brazilian peat for *Agaricus brasiliensis* cultivation. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, p. 1331-1336, 2010b.
- COLAUTO, N. B. et al. Production flush of *Agaricus blazei* on brazilian casing layers. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 616-623, 2011b.
- COLAUTO, N. B. et al. Thermal treatments on lime schist casing layer for *Agaricus brasiliensis* cultivation. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1660-1663, 2010c.
- COLAUTO, N. B. et al. Viability of *Agaricus blazei* after long-term cryopreservation. **Annals of Microbiology**, Milan, 2011a.
- D'AGOSTINI, E. C. et al. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 3, p. 295-300, 2011.
- DUMONT, F.; MARECHAL, P. A.; GERVAIS, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 268-272, 2004.
- ESCOUTO, L. F. S. et al. Acceptability of the sensory characteristics of the brazilian mushroom *Agaricus brasiliensis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, n. 4, p. 321-325, 2005.
- HEINEMANN, P. Agarici Austroamericani. VIII. Agaricea des regions intertropicales d'Amérique du Sud. **Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique**, Meise, v. 62, p. 355-384, 1993.
- HOMOLKA, L.; LISÁ, L.; NERUD, F. Basidiomycete cryopreservation on perlite: evaluation of a new method. **Cryobiology**, New York, n. 3, v. 52, p. 446-453, 2006.
- HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, New York, v. 46, n. 3, p. 205-229, 2003.
- KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**, Lawrence, v. 97, n. 1, p. 12-24, 2005.
- LOBO, A. R.; SILVA, G. M. L. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 219-226, 2003.
- MANTOVANI, T. R. D. **Criopreservação de fungos lignocelulósicos e otimização de substratos a partir de resíduos agroindustriais**. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura) - Universidade Paranaense, Umuarama, 2008.
- MANTOVANI, T. R. D. et al. Criopreservação do gênero *Pleurotus* a -20 °C e a -70 °C. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zootecnia da Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 2, p. 107-112, 2008.
- MATA, G.; PÉREZ-MERLO, R. Spaw viability in edible mushrooms after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. **Cryobiology**, New York, v. 47, n. 1, p. 14-20, 2003.
- MOURÃO, F. et al. Antineoplastic activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 4, p. 901-905, 2009.
- MOURÃO, F. et al. Anti-inflammatory activity of *Agaricus blazei* in different basidiocarp maturation. **Food and Agricultural Immunology**, Abingdon, 2011b.
- MOURÃO, F. et al. Antioxidant activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 197-202, 2011a.
- PACCOLA, E. A. S. et al. Antimutagenic action of *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* on *Aspergillus nidulus* conidia. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 4, p. 311-315, 2004.

UENO, S. et al. Three-dimensional measurement of crystals in frozen dilute solution. **International Journal of Refrigeration**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 302-308, 2004.

VOYRON, S. et al. Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 113, n. 10, p. 1027-1038, 2009.

WASSER, S. P. et al. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun Agaricus (the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, New York, v. 4, p. 267-290, 2002.

Recebido em: 03/10/2011

Aceito em: 02/02/2012