



UNIVERSIDADE PARANAENSE
DIRETORIA EXECUTIVA DE GESTÃO DA PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGRICULTURA
X SIMPÓSIO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGRICULTURA

FABIO GOMES FERREIRA

USO DE GRÃOS PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE BASIDIOMICETOS



IMPORTÂNCIA DA PRESERVAÇÃO

- A natureza e o relógio biológico
- A compreensão do papel de microrganismos
- A sobrevivência do material biológico não constitui o único objetivo.



IMPORTÂNCIA DA PRESERVAÇÃO

A escolha do método de preservação

Manutenção da viabilidade

Manutenção das propriedades originais

Pureza

Custos de preservação e manutenção

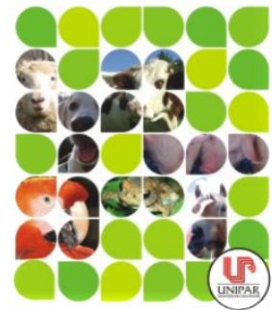
Importância do acervo



Criopreservação: estratégia para conservar a biodiversidade

VIABILIDADE DE *Agaricus blazei* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE PRESERVAÇÃO

Arquivos de Ciências Veterinárias e Zootecia da Unipar



World J Microbiol Biotechnol (2011) 27:3015–3018
DOI 10.1007/s11274-011-0772-9

SHORT COMMUNICATION

Cryopreservation at -80°C of *Agaricus blazei*



Annals of Microbiology (2012) 62:871–876
DOI 10.1007/s12213-011-0368-5

COMMUNICATION

Viability of *Agaricus blazei* after long-term cr

Nelson Barros Colauto • Fábio Aparecido Cordeiro •
Vanessa Navarro Geromini • Tatiana Gomes de Lima • Ana Daniela L
Alessandro Ribeiro Nunes • Fernando de Brito Roratto •
Henrique Susumu Tanaka¹ • Talita Rafaela D'Agostini Mantovani •
Luzia Doretto Paccolla-Meirles • Giani Andrea Linde
¹ Universidade Paranaense – UNIPAR,
Laboratório de Biologia Molecular, UNIPAR, Umuarama, PR, Brasil.

Pesquisas em criopreservação de Basidiomicetos realizadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAR

3.3 AVANCES SOBRE EL CULTIVO DEL “COGUMELO-DO-SOL” EN BRASIL



Cereal Grains and Cryoprotectants
edodes Cryopreservation at

Talita Rafaela D'Agostini Mantovani
Henrique Susumu Tanaka¹, Suzana Harue Umco
Lienine Luiz Zaghi Junior¹, Luzia Doretto Paccolla-Meirles
Giani Andrea Linde¹ and Nelson Barros Colauto

Biotechnology Laboratory, Postgraduate Program in Biotechnology
Laboratory, Umuarama, Brazil; ² Biological Sciences Center, State University of Londrina, Brazil
Email: talita.rd@gmail.com; henrique.tanaka@hotmail.com; suzannucom@gmail.com; jzaghi@hotmail.com; paccolla@uel.br; gianilinde@unipar.br; nbc@unipar.br



CRYOPRESERVATI

CRIOPRESERVAÇÃO DE *Agaricus blazei* EM DMSO COMO CRIOPROTETOR

Nelson Barros COLAUTO¹; Augusto Ferreira da EIRA²; Giani Andrea LINDE¹

1. Professor, Doutor, Titular, Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Paranaense - UNIPAR, Umuarama, PR, Brasil. nbc@unipar.br; 2. Professor, Doutor, Titular, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP, Brasil.



Indian J Microbiol (July–Sept 2012) 52(3):484–488
DOI 10.1007/s12088-012-0289-4

ORIGINAL ARTICLE

Cryopreservation at -20°C and on Grains

Talita Rafaela D'Agostini Mantovani • Henrique Susumu Tanaka •
Suzana Harue Umco • Lienine Luiz Zaghi Junior • Luzia Doretto Paccolla-Meirles • Giani Andrea Linde

IMPORTÂNCIA DA PRESERVAÇÃO



Criopreservação: estratégia para conservar a biodiversidade

Nelson Barros Colauto

Laboratório de Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Aplicada à Agricultura, Universidade Paranaense, Praça Mascarenhas de Moraes, 4282,
CEP 87.502-210, Umuarama-PR, Brasil.

E-mail: nbc@unipar.br



COLAUTO, N. B. Criopreservação: estratégia para conservar a biodiversidade. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MUSHROOMS IN BRASIL e NATIONAL SYMPOSIUM ON EDIBLE MUSHROOMS, 7., 6., 2013, Manaus. **Proceedings...** Manaus: INPA e EMBRAPA, 2013. p. 154-164.

Fatores que interferem na criopreservação

Criopreservação de Basidiomicetos no Brasil



RELEVÂNCIA BIOTECNOLÓGICA

3.3 AVANCES SOBRE EL CULTIVO DEL “COGUMELO-DO-SOL” EN BRASIL

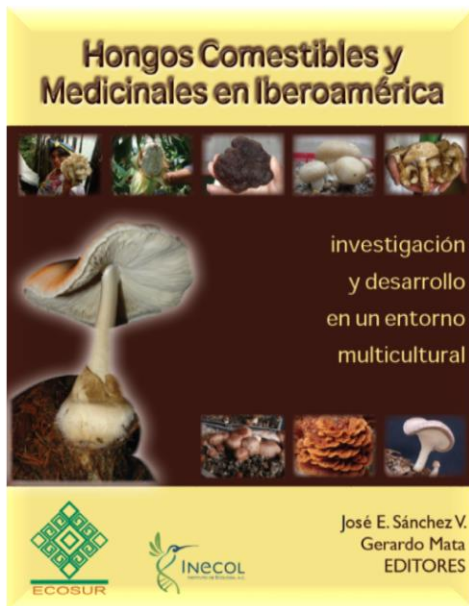
Nelson Barros Colauto y Giani Andrea Linde

Universidade Paranaense, Laboratorio de Biología Molecular
Campus de Umuarama, Umuarama-PR, Brasil CEP 87502-210
nbc@unipar.br



Tabla 3. Reportes sobre los efectos terapéuticos de *Agaricus blazei*

Actividad	Fuente
Antibacteriana	Osaki <i>et al.</i> (1994)
Antidiabética	Kim <i>et al.</i> (2005)
Antihipertensiva	Watanabe <i>et al.</i> (2003)
Anti-inflamatoria	Komura <i>et al.</i> (2010) Mourão <i>et al.</i> (2011a)
Antimutagénica	Osaki <i>et al.</i> (1994) Delmanto <i>et al.</i> (2001) Menoli <i>et al.</i> (2001) Barbisan <i>et al.</i> (2003) Bellini <i>et al.</i> (2003) Souza-Paccola <i>et al.</i> (2004) Machado <i>et al.</i> (2005) Kawamura y Kasai (2007)
Antioxidante	Izawa e Inoue (2004) Huang y Mau (2006) Oliveira <i>et al.</i> (2007) Mourão <i>et al.</i> (2011b)
Antitumoral	Kawagishi <i>et al.</i> (1989) Mizuno <i>et al.</i> (1990a, b) Ito <i>et al.</i> (1997) Ebina y Fujimiya (1998) Mizuno <i>et al.</i> (1999) Ohno <i>et al.</i> (2001) Takaku <i>et al.</i> (2001) Oshiman <i>et al.</i> (2002) Lee <i>et al.</i> (2003) Kaneno <i>et al.</i> (2004) Mourão <i>et al.</i> (2009) Pinto <i>et al.</i> (2009) Jumes <i>et al.</i> (2010)
Inmunomodulatoria	Gennari (2000) Kataoka <i>et al.</i> (2002) Bernardshaw <i>et al.</i> (2005) Liu <i>et al.</i> (2007)
Revisiones sobre el efecto medicinal y farmacológico	Higaki <i>et al.</i> (1997) Mizuno (2002) Firenzuoli <i>et al.</i> (2008)



SHORT COMMUNICATION

Cryopreservation at -80°C of *Agaricus blazei* on rice grains

Nelson Barros Colauto • Augusto Ferreira da Eira •
Giani Andrea Linde

Objetivo do estudo foi avaliar dois protocolos de congelamento para criopreservação em -80°C em linhagens de *Agaricus blazei*.

Linhagens de *Agaricus blazei* ABL 97/11, 99/25 ABL, ABL 99/26, ABL 99/28 e 99/29 ABL - UNESP

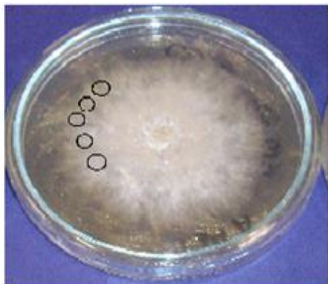
MATERIAS E MÉTODOS



Agaricus blazei



Meio de Cultivo
39 g L⁻¹ (AEM)
121 °C por 20 min
28 °C ± 1 por 15 dias



Meio de cultivo
Grãos de arroz com casca
121 °C por 1 h
28 °C ± 1 por 30 dias
Discos 3 mm



Ampolas
1 mL de Glicerol 10%
121 °C por 30 min



Protocolo I
8 °C por 30 min
-80 °C



Protocolo II
-196 °C por 15 min
-80 °C



Retirada após 1 ano
30 °C por 15 min
Álcool 70% e 96%
Meio (AEM)
28 °C ± 1 por 30 dias
75% após 30 dias

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Table 1 Recovery of *Agaricus blazei* strains grown on rice grains with husk and cryopreserved at -80°C for one year in cryovials with glycerol 10% solution using protocols I and II

Strain	Recovery (%)	
	Protocol I	Protocol II
ABL 97/11	100	40
ABL 99/25	100	0
ABL 99/26	100	40
ABL 99/28	100	0
ABL 99/29	100	0

Protocol I cryopreservation starting at 25°C , then 8°C for 30 min and kept at -80°C

Protocol I cryopreservation starting at 25°C , then 8°C for 30 min, -196°C for 15 min and kept at -80°C

CONCLUSÕES

Conclui-se que após um ano de criopreservação *A. blazei* cultivado em grãos de arroz com casca a -80 °C em glicerol 10% é viável. Congelamento lento mais eficaz.

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.

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.

Linhagem U2/1 de *A. blazei* (antiga ABL97/11) proveniente da micoteca do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Paranaense.

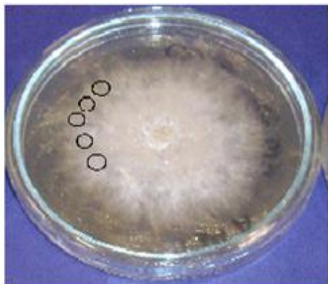
MATERIAS E MÉTODOS



Agaricus blazei



Meio de Cultivo
AEM 2%
121 °C por 20 min
25 °C $\pm$ 1 por 21 dias



AEM
Ágar-grão de trigo moído
121 °C por 30 min
25 °C $\pm$ 1 por 21 dias



Ampolas 0,5 cm diâmetro
Ampolas 0,5 cm e 0,6 cm de diâmetro
450 μ L de Glicerol 5%, sacarose 15%,
glicose 4% e sem crioprotetor
121 °C por 30 min



Armazenadas
à +4 °C ou a -20 °C.



Retirada 1 ou 12 meses
-20 °C a 30 °C por 15 min
+4 °C a 23 °C por 15 min
Álcool 70% e 92%
Meio (AEM)
25 °C $\pm$ 1 por 30 dias
75% após 30 dias

RESULTADOS E DISCUSSÕES

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 °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 °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).

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.

SHORT COMMUNICATION

Viability of *Agaricus blazei* after long-term cryopreservation

Nelson Barros Colauto • Fábio Aparecido Cordeiro •

Kassia Vanessa Navarro Geromini • Tatiana Gomes de Lima • Ana Daniela Lopes •

Renato Alessandro Ribeiro Nunes • Fernando de Brito Roratto •

Henrique Susumu Tanaka • Lienine Luiz Zaghi Jr. • Giani Andrea Linde

O objetivo do trabalho foi verificar *Agaricus blazei* criopreservado a -70° C utilizando diferentes agentes crioprotetores e protocolos de congelamento .

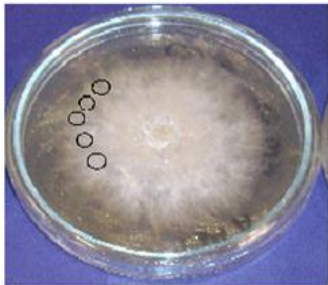
Agaricus blazei (U2/1; ABL97/11) foi obtido a partir da coleção de fungos do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Paranaense.

MATERIAS E MÉTODOS



Agaricus blazei

Meio de Cultivo
AEM; 48 g/L
121 °C por 20 min
28 °C $\pm$ 1 por 15 dias



Ampolas 0,5 cm diâmetro
300 μ L de DMSO 1, 2,5 ou 5%; glicerol 5, 10 ou 30%;
sacarose 5, 15 ou 30%; glucose 2, 4 ou 10%;
polietileno-glicol 6000 3, 6 ou 8%;
extrato de malte 4, 5 ou 13%;
121 °C por 20 min exceto DMSO
28 °C por 14 dias



2 mL óleo mineral
150 °C por 150 min
Micélio crescido em meio (AEM)
Tubos a 4 °C e 20 °C

Protocolo I
25 °C para 4 °C por 30 min, seguindo para -70 °C

Protocolo II
25 °C para direto para -70 °C

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Table 1 Mycelial growth of *Agaricus blazei* in malt extract agar medium supplemented with different cryoprotectants

Cryoprotectant ^a	Concentration (%)	Mycelial growth (mm)	Mycelial growth/ 4% MEX × 100 (%)
DMSO	1	12	27
	2.5	0	0
	5	0	0
GLY	6	24	54
	10	11	25
	30	4	9
SAC	5	52	118
	15	43	98
	30	38	86
GLU	2	44	100
	4	36	82
	10	20	45
PEG	3	44	100
	6	43	98
	8	44	100
MEX	4	44	100
	5	47	107
	13	26	59

^aDMSO, Dimethyl sulfoxide; GLY, glycerol; SAC, saccharose; GLU, glucose; PEG, polyethylene glycol-6000; MEX, malt extract

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Table 2 Mycelial viability of *A. blazei* cryopreserved at -70°C with different cryoprotective solutions for 1 and 4 years

Cryoprotective solution ^a	Viability after 1 year (%)		Viability after 4 years (%)	
	Freezing protocol		Freezing protocol	
	from 25 to 4 to -70°C	from 25 to -70°C	from 25 to 4 to -70°C	from 25 to -70°C
DMSO 1%	96	100	80	20
GLY 6%	95	95	73	27
SAC 15%	100	100	100	100
GLU 4%	100	100	100	100
PEG 8%	100	90	46	67
MEX 5%	76	60	60	27

CONCLUSÕES

Com base nos resultados do estudo, conclui-se que é o agente crioprotetor e não o protocolo de congelamento que é a variável mais importante para a manutenção e viabilidade de *A. blazei* após criopreservação a -70 °C.

A criopreservação de longo prazo (4 anos) é eficaz quando sacarose ou glicose é utilizada como crioprotetor, independentemente do protocolo de congelamento.

Dimetilsulfóxido é eficaz quando utilizado um protocolo de congelamento lento.

O glicerol, polietilenoglicol e extrato de malte foram ineficazes, independentemente do protocolo de congelamento.

Todos os crioprotetores testados foram eficazes na criopreservação a curto prazo de *A. blazei* (1 ano), com exceção do extrato de malte que demonstrou eficácia no protocolo de congelamento lento.

CRYOPRESERVATION OF *Agaricus blazei* IN LIQUID NITROGEN USING DMSO AS CRYOPROTECTANT

CRIOPRESERVAÇÃO DE *Agaricus blazei* EM NITROGÊNIO LÍQUIDO USANDO DMSO COMO CRIOPROTETOR

Nelson Barros COLAUTO¹; Augusto Ferreira da EIRA²; Giani Andrea LINDE¹

1. Professor, Doutor, Titular, Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Paranaense - UNIPAR, Umuarama, PR, Brasil. nbc@unipar.br; 2. Professor, Doutor, Titular, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a criopreservação em nitrogênio líquido de linhagens de *A. blazei*, visando estabelecer os parâmetros iniciais de criopreservação para a espécie.

Linhagens de *A. blazei* ABL 97/11, ABL 99/25, ABL 99/26, ABL 99/28, ABL 99/29, obtidas da UNESP..

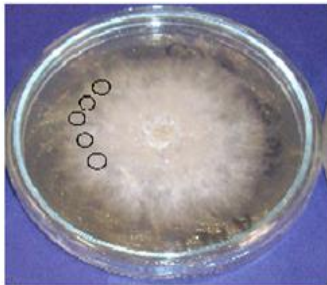
MATERIAS E MÉTODOS



Agaricus blazei



Meio de Cultivo
39 g L⁻¹ (AEM)
121 °C por 20 min
28 °C ± 1 por 15 dias



Ampolas
Discos 3 mm (AEM)
1 mL de DMSO 10%



Protocolo I
8 °C por 30 min
-196 °C



Retirada após 1,5 anos
30 °C por 15 min
Álcool 70% e 96%
Meio (AEM)
28 °C ± 1 por 30 dias
75% após 30 dias

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Table 1. Viability of *A. blazei* strains grown on malt extract agar disks and cryopreserved at -196 °C for 1.5 year in cryovials with the cryoprotectant 10% dimethyl sulfoxide solution.

Strain	Viability (%)
ABL 97/11	100
ABL 99/25	25
ABL 99/26	75
ABL 99/28	60
ABL 99/29	0

CONCLUSÕES

A criopreservação em nitrogênio líquido de *A. blazei*, com dimetilsulfóxido como crioprotetor, não é a forma mais adequada para a preservação desta espécie.



Cereal Grains and Cryoprotectants in *Lentinula edodes* Cryopreservation at -70°C

Talita Rafaela D'Agostini Mantovani¹,
Henrique Susumu Tanaka¹, Suzana Harue Umeo¹,
Lienine Luiz Zaghi Junior¹, Luzia Doretto Paccola – Meirelles²,
Giani Andrea Linde¹ and Nelson Barros Colauto¹

¹ Molecular Biology Laboratory, Postgraduate Program in Biotechnology Applied to Agriculture, The Paranaense University, Paraná, Umuarama, Brazil; ² Biological Sciences Center, State University of Londrina, Paraná, Londrina, Brazil

Email: talita.rd@gmail.com; henrique.tanaka@hotmail.com; suzanaumeo@gmail.com; jczaghi@hotmail.com; paccola@uel.br; gianilinde@unipar.br; nbc@unipar.br

O objetivo do estudo foi avaliar substratos associados a agentes crioprotetores para *Lentinula edodes* criopreservados a - 70 °C.

Linhagens de *Lentinula edodes* U6/12 da coleção cultura da Universidade Paranaense.



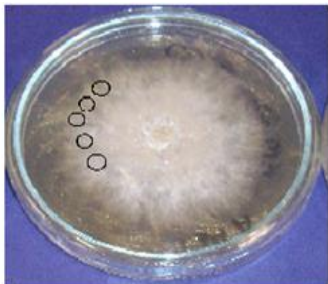
MATERIAS E MÉTODOS



Lentinula edodes



Meio de Cultivo
39 g L⁻¹ (ABD)
121 °C por 20 min
25 °C ± 1 por 15 dias



Grãos de aveia, trigo, arroz
integral sem casca, painço
90 °C por 45 min
121 °C por 20 min
25 °C ± 1



Ampolas
800 μL de DMSO), glicerol, sacarose,
Glicose, polietilenoglicol-6000 e
extrato de malte (MANTOVAN
121 °C por 30 min



23 °C para -20 °C ou
-70 °C



Retirada após 1, 2 e 3 anos
30 °C por 15 min
Álcool 70% e 96%
Meio (AEM)
25 °C ± 1
75% após 30 dias

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Table 1 *Lentinula edodes* mycelial growth inhibition on potato dextrose agar with different concentrations of cryoprotective agents

Crioprotectant*	Concentration (%)	Mycelial growth (mm)	Mycelial growth inhibition (%)
GY	5	75.1	0
	10	69.3	8
	30	0.0	100
DMSO	1	43.3	0
	2.5	26.0	40
	5	0.0	100
GU	2	40.4	0
	4	39.0	3
	10	25.7	36
SA	5	46.2	11
	10	52.2	0
	30	23.8	54
ME	4	41.6	0
	5.5	37.8	9
	13	25.7	38
PEG	3	47.8	0
	6	42.7	10
	10	22.0	54

*GY: glycerol, DMSO: dimethyl sulfoxide, GU: glucose, SA: saccharose, ME: malt extract, PEG: polyethylene glycol-6000.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Table 2 Viability (%) of *Lentinula edodes* grown on potato dextrose agar (PDA) , oat grains (OG) , wheat grains (WG) , rice grains (RG) or millet grains (MG) and cryopreserved at -70 °C for one, two or three years, in different cryoprotective agents

Cryopreservation	Substrate	Cryoprotectant*					
		GY	DMSO	GU	SA	ME	PEG
One year	PDA	100	100	100	100	100	47
	OG	100	100	100	100	100	65
	WG	100	100	100	100	100	100
	RG	100	100	100	100	100	80
	MG	100	100	100	100	100	47
Two years	PDA	93	73	100	100	80	30
	OG	80	67	73	93	73	27
	WG	100	100	93	100	93	73
	RG	73	53	100	100	53	0
	MG	100	80	93	87	67	30
Three years	PDA	93	73	100	100	80	20
	OG	80	67	73	93	73	27
	WG	100	100	93	100	93	73
	RG	73	53	100	100	53	0
	MG	100	80	93	87	67	20

* GY: glycerol 10% , DMSO: dimethyl sulfoxide 1% , GU: glucose 4% , SA: saccharose 10% , ME: malt extract 4% , PEG: polyethylene glycol-6000 6% .

CONCLUSÕES

A criopreservação a longo prazo para *L. edodes* é eficaz em - 70 °C, mas não a - 20 °C.

O substrato de crescimento do micélio, bem como o agente crioprotetor afeta a preservação do fungo.

Após o segundo ano de criopreservação, os resultados de viabilidade do micélio são sustentáveis.

DMSO não é a melhor escolha como crioprotetor para *L. edodes*.

Grãos de trigo e sacarose são o protocolo mais eficaz para a viabilidade do micélio de *L. edodes* na criopreservação a -70 °C durante três anos.

Cryopreservation at -20 and -70 °C of *Pleurotus ostreatus* on Grains

Talita Rafaela D'Agostini Mantovani • Henrique Susumu Tanaka •
Suzana Harue Umeo • Lienine Luiz Zaghi Junior • Juliana Silveira do Valle •
Luzia Doretto Paccola-Meirelles • Giani Andrea Linde • Nelson Barros Colauto

O objetivo deste estudo O objetivo deste estudo foi avaliar substratos associados a agentes crioprotetores para *Pleurotus ostreatus* na criopreservação a -20 °C ou -70 °C.

Pleurotus ostreatus U6/8 da coleção de culturas da Universidade Paranaense.

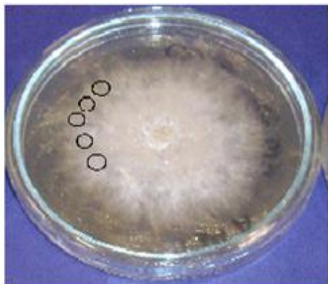
MATERIAS E MÉTODOS



Pleurotus ostreatus



Meio de Cultivo
39 g L⁻¹ (ABD)
121 °C por 20 min
25 °C ± 1 por 15 dias



Grãos de aveia, trigo, arroz
integral sem casca, painço
90 °C por 45 min
121 °C por 20 min
25 °C ± 1



Ampolas
1% de DMSO), 5% glicerol, 10% sacarose,
4% Glicose, 6% polietilenoglicol-6000 e
5% extrato de malte
121 °C por 30 min



23 °C para -20 °C ou
-70 °C



Retirada após 1 ou 3 anos
30 °C por 15 min
Álcool 70% e 96%
Meio (AEM)
25 °C ± 1
75% após 30 dias

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Table 1 *Pleurotus ostreatus* mycelial viability (survival percentage) after cryopreservation at -20°C for 1 and 3 years

Cryoprotectant	After 1 year of cryopreservation (%)						After 3 years of cryopreservation (%)					
	Cultivation medium or substrates					Grain substrate average	Cultivation medium or substrates					Grain substrate average
	PDA	OG	WG	RG	MG		PDA	OG	WG	RG	MG	
GO	0	33	100	12	0	36	0	0	53	0	0	13
DMSO	0	53	100	30	60	61	0	0	60	0	0	12
GU	0	70	100	83	40	73	0	13	87	0	0	25
SA	0	80	100	66	92	84	0	13	87	13	47	40
ME	0	73	100	25	83	70	0	6	67	0	0	18
PEG	0	60	100	40	52	63	0	0	47	0	0	19
Cryoprotectant average	0	62	100	43	54	—	0	5	67	2	8	—

Cultivation medium and substrates with mycelium: potato dextrose agar disks (PDA); whole oat grains (OG); whole wheat grains (WG), whole rice grains without hulls, known as brown rice (RG) and whole millet grains (MG). Cryoprotective agents: 1 % dimethyl sulfoxide (DMSO); 5 % glycerol (GO); 10 % saccharose (SA); 4 % glucose (GU); 6 % polyethylene glycol-6000 (PEG) and 5 % malt extract (ME)

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Table 2 *Pleurotus ostreatus* mycelial viability (survival percentage) after cryopreservation at -70°C for 1 and 3 years

Cryoprotectant	After 1 year of cryopreservation (%)						After 3 years of cryopreservation (%)					
	Cultivation medium or substrates					Grain substrate average	Cultivation medium or substrates					Grain substrate average
	PDA	OG	WG	RG	MG		PDA	OG	WG	RG	MG	
GO	56	100	100	100	100	100	0	93	100	87	100	95
DMSO	93	100	100	100	93	98	54	87	100	75	80	86
GU	18	100	100	100	100	100	0	100	93	93	100	96
SA	83	100	100	100	100	100	40	100	100	100	100	100
ME	23	100	100	100	100	100	0	100	87	93	93	93
PEG	0	100	100	100	100	100	0	100	80	80	73	83
Cryoprotectant average	46	100	100	100	99	–	16	97	93	88	91	–

Cultivation medium and substrates with mycelium: potato dextrose agar disks (PDA); whole oat grains (OG); whole wheat grains (WG), whole rice grains without hulls, known as brown rice (RG) and whole millet grains (MG). Cryoprotective agents: 1 % dimethyl sulfoxide (DMSO); 5 % glycerol (GO); 10 % saccharose (SA); 4 % glucose (GU); 6 % polyethylene glycol-6000 (PEG) and 5 % malt extract (ME)

CONCLUSÕES

A combinação do substrato e o crioprotetor afetam a viabilidade do micélio após criopreservação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Grãos de trigo combinados com qualquer crioprotetor são eficazes para manter o micélio viável após 1 ano de criopreservação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, e quando combinado com sacarose ou glicose tornou-se eficaz após 3 anos.

Para a criopreservação a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ após 1 ou 3 anos, qualquer substrato combinado com qualquer crioprotetor é eficaz para preservar o micélio viável, exceto para os grãos de painço com polietilenoglicol-6000 após 3 anos.

ABD é ineficaz para a criopreservação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 ou 3 anos, exceto quando combinados com DMSO ou sacarose para 1 ano a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os crioprotetores sacarose e glicose são os mais eficazes para a criopreservação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 ou 3 anos.

CEREAL GRAINS AND GLYCEROL IN Agaricus blazei CRYOPRESERVATION

GRÃOS DE CEREAIS E GLICEROL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE *Agaricus blazei*

Henrique Susumu TANAKA¹; Talita Rafaele D'Agostini MANTOVANI¹;

Mateus Pasko dos SANTOS¹; Giani Andrea LINDE²; Nelson Barros COLAUTO²

1. Biólogo, Mestre em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Paranaense – UNIPAR, Umuarama, PR, Brasil; 2. Professor, Doutor, Titular, Laboratório de Biologia Molecular, UNIPAR, Umuarama, PR, Brasil.
nbc@unipar.br .

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos físicos e químicos de diferentes meios de cultivo e do glicerol na criopreservação de *A. blazei* à -20 °C e à -70 °C.

Linhagem *A. blazei* U2/1, a partir da coleção de culturas da Universidade Paranaense.

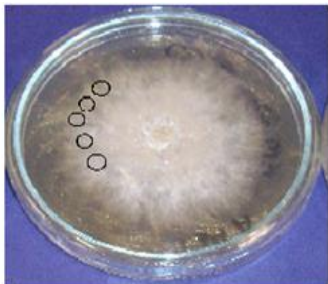
MATERIAS E MÉTODOS



A. blazei



Meio de Cultivo
39 g L⁻¹ (ABD)
121 °C por 20 min
25 °C ± 1 por 15 dias



Grãos grãos inteiros ou moídos
HW + GY, MW + GY e HR + GY ou
como HWG + GY, MWG + GY e HRG
+ GY
90 °C por 45 min
121 °C por 180 min
25 °C ± 1



Ampolas
5% glicerol, água ultra-purificada (UW)
ou sem crioprotetor (WC)
121 °C por 20 min



23 °C para -20 °C ou
-70 °C



Retirada após 1 ou 3 anos
30 °C por 15 min
Álcool 70% e 96%
Meio (AEM)
25 °C ± 1
75% após 30 dias

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Table 1. *Agaricus blazei* mycelial viability (%) grown on different cultivation media, with or without 5% glycerol, and cryopreserved at -70 °C for one or two years with 5% glycerol, ultrapure water or without cryoprotectant in the cryotube.

Cultivation medium*	Cryopreservation after 1 year			Cryopreservation after 2 years		
	Cryoprotectant in the cryotube			Cryoprotectant in the cryotube		
	GY	UW	WC	GY	UW	WC
HW	100	33	87	87a	0	73ab
MW	93	27	87	80a	0	53b
HR	93	27	87	68ab	0	53b
HW+GY	93	47	87	87a	0	67ab
MW+GY	93	27	87	87a	0	73ab
HR+GY	87	40	87	73ab	0	53b
HWG	87	13	67	0	0	0
MWG	93	13	60	0	0	0
HRG	93	13	80	0	0	0
HWG+GY	93	33	93	0	0	0
MWG+GY	87	27	93	0	0	0
HRG+GY	93	27	93	0	0	0
MEA	87	7	73	0	0	0
MEA+GY	60	20	73	0	0	0

*HW: whole grain of hard endosperm wheat, MW: whole grain of medium hard endosperm wheat, HR: whole grain of hard endosperm rye, GY: 5% glycerol, HWG: agar + ground HW, MWG: agar + ground MW, HRG: agar + ground HR, MEA: malt extract agar, UW: ultrapure water and WC: without cryoprotectant. Means followed by different letters indicate significant differences among the groups according to Friedman's test ($p \leq 0.01$).

CONCLUSÕES

A estrutura física de grãos inteiros de trigo semiduro ou duro é efetiva, quando em $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para criopreservação por dois anos.

O uso de glicerol tanto no meio de cultivo ou como solução crioprotetora é viável à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A criopreservação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mostrou-se ineficaz na manutenção da viabilidade do fungo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

