

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

SIBELE MARQUES BOLSON

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DA RAÇÃO COM O FUNGO *Pleurotus*
citrinopileatus SINGER NA CAPACIDADE DE REPRODUÇÃO DE *Drosophila*
melanogaster (MEIGEN, 1830)**

São Gabriel

2014

SIBELE MARQUES BOLSON

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DA RAÇÃO COM O FUNGO *Pleurotus citrinopileatus* SINGER NA CAPACIDADE DE REPRODUÇÃO DE *Drosophila melanogaster* (MEIGEN, 1830)

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao programa de graduação *Stricto sensu* em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Margéli Pereira de Albuquerque

São Gabriel

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

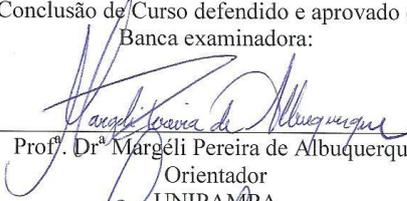
SIBELE MARQUES BOLSON

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DA RAÇÃO COM O FUNGO *Pleurotus*
citrinopileatus SINGER NA CAPACIDADE DE REPRODUÇÃO DE *Drosophila*
melanogaster (MEIGEN, 1830)**

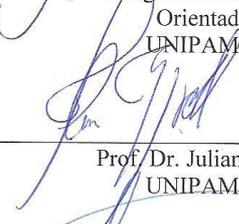
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Biotecnologia da Universidade
Federal do Pampa, como requisito
parcial para obtenção do Título de
Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 24/01/2014

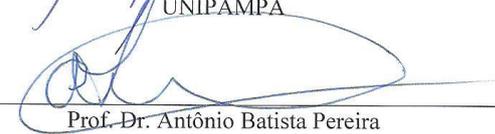
Banca examinadora:



Prof. Dr.^a Margéli Pereira de Albuquerque
Orientador
UNIPAMPA



Prof. Dr. Juliano Boldo
UNIPAMPA



Prof. Dr. Antônio Batista Pereira
UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus amados familiares
pais, Renato Bolson e Mariza Marques e irmão,
Sávio M. Bolson maiores incentivadores e fontes
inesgotáveis de apoio, amor e compreensão.

AGRADECIMENTO

Agradeço a minha família pelo apoio em todos os momentos, ao incentivo nos momentos de dificuldades e ao companheirismo para enfrentar os momentos bons e ruins. Agradeço a meu pai Renato Bolson pelo apoio, mesmo que distante, ao seu esforço para que pudesse passar todas as etapas de minha jornada estudantil sem dificuldades. A minha mãe, Mariza Marques Bolson, pela dedicação, paciência e por me acompanhar em todas as etapas de minha vida, e ao meu irmão Sávio Marques Bolson, pelo companheirismo e compreensão nos momentos difíceis, por me apoiar e incentivar nas horas de necessidade e principalmente por me compreender e distrair nos momentos de tristeza.

Agradeço a Prof^ª. Dr^ª. Margéli Pereira de Albuquerque pela orientação, paciência e principalmente ao apoio, que foi fundamental para que eu realizasse o curso de graduação.

A todos os professores, minha gratidão pelo ensinamento, dedicação e pela forma de conduzir o curso em todas as etapas. Em especial ao Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria pelo apoio, incentivo e pelos esclarecimentos nos momentos de dúvidas.

A todos os colegas do grupo de pesquisa pelo convívio, distração e pelos momentos de amizade, em especial as amigas Karine Janner e Estela Oliveira por estarem presentes em todas as etapas e ajudar a superar obstáculos. A os demais amigos que mesmo distantes não se fizeram ausente.

Agradeço ao meu companheiro Mateus Quadros Severo pela paciência, compreensão e apoio para que terminasse os meus estudos e por não deixar a distância nos afetar.

Deixo o meu agradecimento a todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Efeito da suplementação da ração com o fungo *Pleurotus citrinopileatus* Singer na capacidade de reprodução de *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830)

A espécie *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) é referência em estudos biológicos e genéticos, destacando-se por ser de fácil manutenção em laboratório e principalmente por ter reações metabólicas similares a dos mamíferos. Na natureza utiliza como alimentação leveduras que colonizam frutos, flores e fungos em estágio de putrefação. Os cogumelos do gênero *Pleurotus* são muito utilizados na alimentação humana. Rico em proteínas e antioxidantes, quando agregado á alimentação animal eleva o seu valor nutritivo. Os fungos deste gênero destacam-se por crescer facilmente em uma ampla variedade de substratos o que facilita o seu cultivo e amplia o seu uso biotecnológico. O presente trabalho objetiva identificar o efeito de *Pleurotus citrinopileatus* no organismo de *Drosophila melanogaster*. Primeiramente o micélio de *P. citrinopileatus*, desenvolvido em BDA (batata-dextrose-ágar) foi homogeneizado á ração composta de farinha de milho (Klein et Al, 1999) e fornecido como alimento para *D. melanogaster*, sendo mantidas em BOD a $23^{\circ}\text{C} \pm 1$. Após, as moscas foram retiradas do contato com o fungo e mantidas em substrato sem micélio. As moscas descendentes das que haviam sido alimentadas com *P. citrinopileatus*, mas que não receberam a ração homogeneizada com micélio, foram observadas até a sua terceira geração para identificar se os efeitos da ração suplementada com fungo seriam percebidos nas gerações subsequentes. Por fim, foram testados diferentes concentrações de micélio no substrato. Os resultados foram testados utilizando à análise de variância com o auxílio do programa Statistix8. Foi observado que o micélio de *P. citrinopileatus* estimulou a reprodução em *D. melanogaster*, aumentando significamente o número de indivíduos por ciclo reprodutivo. A concentração de 0,12g de micélio/g de substrato foi a que melhor expressou essa característica. O estímulo ocorreu somente quando da exposição ao substrato com micélio, não sendo permanente e nem transmitido para as gerações seguintes. O experimento sugere que o uso do micélio de *P. citrinopileatus* agregado á ração para *D. melanogaster* cultivadas em laboratório, pode ser utilizado como estimulante reprodutivo para este organismo.

Palavras chave: *Pleurotus*, moscas-das-frutas, estímulo reprodutivo

ABSTRACT

Effect of supplementation of diet with the fungus *Pleurotus citrinopileatus* Singer's ability to reproduce *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830)

The species of fly, *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) is a reference in biological and genetic studies, highlighting to be easily maintained in the laboratory and especially for having metabolic reactions similar to mammals. In nature uses as food yeasts that colonize fruits, flowers and fungi in stage of putrefaction. The mushrooms of the genus *Pleurotus* are widely used in human, rich in proteins and antioxidants power when added to animal feed increases its nutritional value. Fungi of this genus are noted for easily grow in a wide variety of substrates which facilitates its cultivation and extends its biotechnological use. This paper aims to identify the effect of *Pleurotus citrinopileatus* the organism *Drosophila melanogaster*. First mycelium of *P. citrinopileatus* developed on PDA (potato-dextrose-agar) was homogenized ration consisting of corn flour (Klein et al, 1999) and provided as food for *D. melanogaster*, these were kept in BOD at $23^{\circ} \text{C} \pm 1$. After the flies were removed from contact with the fungus and kept without substrate mycelium. The descendants of flies that were fed aviam *P. citrinopileatus*, but have not received the diet with homogenized mycelia were observed up to the third generation to identify the effects of dietary supplementation with fungus would be homogeneous in subsequent generations. Finally, we tested different concentrations of the substrate mycelium. The results were tested by analysis of variance with the help of Statistix8 program. It was observed that the mycelium of *P. citrinopileatus* stimulated reproduction in *D. melanogaster*, significantly increasing the number of individuals per reproductive cycle. The concentration of 0.12 g mycelium / g substrate was best expressed this feature. The stimulation occurred only when exposed to substrate mycelium, not permanent and not transmitted to subsequent generations. The experiment suggests that the use of mycelium of *P. citrinopileatus* added to the ration *D. melanogaster* cultured in the laboratory, can be used as a reproductive stimulant.

Keywords: *Pleurotus*, fruit -flies, reproductive stimulant

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tratamento das moscas com <i>Pleurotus citrinopileatus</i>	20
Figura 2 – Quantidade de larvas e pupas do primeiro tratamento	21
Figura 3 – Gráfico comparativo entre as gerações de moscas.....	24
Figura 4 – Representação gráfica da quantidade de larvas e pupas em diferentes concentrações do micélio de <i>P. citrinopileatus</i>	26
Figura 5 – Gráfico do número de moscas ao final do tratamento com diferentes concentrações do micélio de <i>P. citrinopileatus</i>	27

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Quantidade média de larvas e pupas observadas após 144 horas	20
Tabela 2 – Moscas exposta ao meio isento de <i>P. citrinopileatus</i>	21
Tabela 3 – Análise da primeira geração G ₁	22
Tabela 4 – Análise da segunda geração G ₂	23
Tabela 5 – Análise da terceira geração G ₃	23
Tabela 6 – Exposição das moscas a diferentes concentrações de micélio	25

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	11
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 – Histórico da espécie <i>D. melanogaster</i>	13
2.2 – Reprodução na espécie <i>D. melanogaster</i>	13
2.3 – Gênero <i>Pleurotus</i>	14
2.4 – A espécie <i>Pleurotus citrinopileatus</i>	15
3 – OBJETIVO DA PESQUISA	16
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 – Reativação do micélio de <i>P. citrinopileatus</i>	17
4.2 – Tratamento de <i>D. melanogaster</i> com o micélio de <i>P. citrinopileatus</i>	17
4.3 – Efeito cumulativo no organismo de <i>D. melanogaster</i>	17
4.4 – Efeito com diferentes concentrações do micélio no meio de cultura	18
5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
5.1 – Tratamento com o micélio no meio de cultura	19
5.2 – Efeito cumulativo do micélio	21
5.3 – Ação do micélio em gerações posteriores	22
5.4 – Efeito das diferentes concentrações	25
6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
7 – REFERÊNCIAS	29

1 – INTRODUÇÃO

Drosophila melanogaster (MEIGEN, 1830) pertence á ordem *Díptera*, e ao subgênero *Drosophila* é conhecida popularmente como mosca-da-fruta, por encontrar-se próxima a frutas em estágio de decomposição. *D. melanogaster* é muito utilizada como modelo em estudos biológicos e genéticos destacando-se por suas características, fácil manutenção em laboratório, baixa exigência nutricional, ciclo de vida curto e principalmente por possuírem reações metabólicas similares a dos mamíferos. Esta espécie utiliza uma ampla variedade de substrato para sua reprodução (SHORROCKS, 1982), os quais estão relacionados á alimentação e á oviposição (CUNHA; MAGALHÃES, 1965; CARSON, 1971; STARMER, 1981; TIDON et al 2005). Dentre os recursos alimentares estão as leveduras que colonizam frutos, flores e fungos em decomposição (FREIRE-MAIA; PAVAN, 1949). Kyung-jin (2005), descreveu que fêmeas de *D. melanogaster* quando expostas a uma dieta rica em levedura elevam o número de ovos.

Entre os cogumelos comestíveis estão presentes os fungos da ordem *Agaricales* na qual está classificado o gênero *Pleurotus* (HANSKI, 1989; KOMONEN, 2003; AMAT-GARCÍA et al., 2004). O gênero *Pleurotus* compreende espécies comestíveis difundidas na gastronomia, com modesta exigência de cultivo, propriedades organolépticas favoráveis além de propriedades medicinais. São reconhecidos por apresentarem glicanos como constituintes da parede celular tanto do basidioma como do micélio. (BOBEK et al., 1991A; BOBEK et al., 1991B; ZHANG et al., 1994; NOSÁL OVÁ, et al., 2001; HOSSAIN et al., 2003; PRAMANIK, 2005).

A maioria dos cogumelos comestíveis apresentam índices relevantes de desenvolvimento micelial em diversos tipos de matéria-prima. *Pleurotus* destaca-se por crescer facilmente em uma ampla gama de substratos, tais como palhas de cereais, grãos, polpa de café, bagaço de cana-de-açúcar, folhas de bananeira entre outros. (PATRABANSH; MADAN, 1997; OBODAI et al., 2003; HERNÁNDEZ et al., 2003; BONATI et al., 2004; SALMONES et al., 2005). Esta espécie pode ser empregada também na alimentação animal, como por exemplo na colonização do micélio na forragem aumentando seu valor nutritivo (COHEN et al., 2002; SCHIMIDT et al., 2003). Devido à degradação do substrato pelos fungos, este é mais facilmente digerido pelos ruminantes. (CASTRO et al., 2004).

Inúmeras espécies de fungos utilizadas na alimentação humana também poderiam ser utilizados como fonte de alimento para organismos mantidos em laboratórios. Para isso a espécie que se deseja utilizar deve ser testada para que não cause alterações no organismo em questão. O presente estudo tem como objetivo verificar o efeito da suplementação da ração de *Drosophila melanogaster* com o fungo *Pleurotus citrinopileatus*.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Histórico da espécie *Drosophila melanogaster*

A espécie *Drosophila melanogaster* é muito utilizada em laboratório e muitas são as aplicações da mesma. Uma aplicação desta espécie é a técnica de bioensaio, um método de triagem utilizado na determinação de resíduos (ALMEIDA; REYES, 1999; ALMEIDA et al., 2001; BAGDONAS et al., 1988; JOSEPH JR.; KNOBEL, 1980; PAULINO et al., 1992).

D. melanogaster é um organismo eucarionte, da ordem Díptera, com $2n = 8$ cromossomos sendo 3 pares de autossomos e 1 par sexual, tem sido material biológico largamente utilizado pelos pesquisadores, por ser de fácil manutenção em laboratório e principalmente, como citado por Graf (1994) apresentam reações metabólicas semelhantes às dos mamíferos, o que permite um certo grau de extrapolação para humanos. (FONSECA; PEREIRA, 2004).

Trata-se de organismos intensamente estudados na biologia e servem como um sistema modelo para a investigação de muitos processos do desenvolvimento celular e comuns aos eucariotas superiores, incluindo seres humanos. (MARK et al, 2000).

2.2 - Reprodução na espécie *D. melanogaster*

De acordo com Savalli (2001), a ecologia comportamental é um dos temas centrais da biologia evolutiva, varia devido à variedade de comportamentos e táticas associadas com acasalamento, bem como as consequências de aptidão ligados a essas estratégias. Kokko e Jennions (2008), relatam que as fêmeas fazem um investimento maior do que os machos na reprodução, há uma tendência das fêmeas se tornarem mais seletivas na escolha do companheiro, o que implica uma seleção sobre a capacidade masculina de competir por oportunidades de acasalamento (COSTA et al, 2010).

Drosophila melanogaster tem uma Relação Sexual Operacional (OSR) tendenciosa em condições naturais (MARKOW, 2000) e em experimentos de laboratório, responde a essa condição com o aumento da exposição da corte masculina e taxa de cruzamento. (WHIGBY; CHAPMAN, 2004). Como consequência do “*trade-off*” envolvendo reprodução e longevidade, o aumento da exposição á corte e a taxa de acasalamento acaba reduzindo a

expectativa de vida (CORDTS; PARTRIDGE, 1996), embora a aptidão global está positivamente relacionada com a taxa de reprodução (LESSELLS, 2006).

2.3 - Gênero *Pleurotus*

O gênero *Pleurotus* compreende um grupo de cogumelos comestíveis ligninolíticos com propriedades medicinais e aplicações biotecnológicas e ambientais importantes. O cultivo de espécies deste gênero é economicamente importante em todo o mundo e se expandiu nos últimos anos. *P. ostreatus* é o terceiro cogumelo cultivado mais importante para fins alimentares. Nutricionalmente, tem propriedades aromáticas e de sabor, é rico em proteínas, hidratos de carbono, vitaminas e minerais. *Pleurotus* spp são promissores como cogumelos medicinais, exibindo atividade hematológica, antiviral, antitumoral, antibiótica, antibacteriana, hipocolesterolêmica e atividades imunomodulatórias. As moléculas bioativas isoladas a partir de diferentes fungos são os polissacarídeos. Um dos aspectos mais importantes de *Pleurotus* spp está relacionado com a utilização do seu sistema ligninolítico para uma variedade de aplicações, tais como a bioconversão de resíduos agrícolas, em produtos valiosos para a alimentação animal e outros produtos alimentares, e a utilização das suas enzimas ligninolíticas pela biodegradação de organopoluentes, xenobióticos e contaminantes industriais. (COHEN et al 2002).

A medicina tradicional atribui propriedades medicinais para *Pleurotus* spp, várias substâncias deste fungo têm sido caracterizadas por exibir atividades antibióticas, antiviral, antitumoral e atividades anticolesterolêmica. Diferentes substâncias farmacêuticas foram purificadas e caracterizadas (WASSER; WEIS, 1999a), tornando-os biotecnologicamente importante. *Pleurotus* spp estão entre os cogumelos mais fáceis de cultivar (HILBER, 1997). Na natureza, eles crescem na madeira, geralmente em árvores mortas em pé ou em troncos caídos. Vários substratos que contêm celulose e lignina podem ser utilizados para o cultivo de *Pleurotus*, como lascas de madeira, milho trigo, palha de arroz, hastes de algodão, casca de resíduos e outros resíduos agrícolas, alguns dos quais podem ser reciclados e aplicados no uso como ração animal ou na preparação de outros produtos. A principal vantagem do cultivo de *Pleurotus* spp em resíduos lignocelulósicos é a sua seletiva degradação da lignina e hemicelulose, resultando na exposição da celulose e facilitando a utilização por ruminantes. (COHEN et al., 2002).

2.4 - A espécie *Pleurotus citrinopileatus*

A produção de *Pleurotus citrinopileatus* é significativa, uma vez que não só leva à formação de compostos mais simples, mas também resulta em alimentos ricos em proteínas. O fungo *Pleurotus citrinopileatus* é um cogumelo comestível, que confere vantagens sobre outros cogumelos por sua capacidade de crescer em resíduos lignocelulósicos não fermentados e produzir um corpo de frutificação por sua vez, com maior teor de nitrogênio. (PANDEY; SINGH, 2012).

P. citrinopileatus é considerado um cogumelo de boa palatabilidade e rico em nutrientes (GHOSH et al 1991). Com base em pesquisas sobre modelos animais sugere-se que esta espécie pode ter alguns efeitos fisiológicos, incluindo efeito antitumoral, aprimoramento imunológico e anti-hiperglicemia. (WANG et al. 2005; SHU et al 2006).

3 - OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo geral verificar o potencial do uso do fungo *Pleurotus citrinopileatus* como suplemento alimentar verificando o potencial de alteração da espécie *Drosophila melanogaster* após o consumo da ração suplementada com o fungo *Pleurotus citrinopileatus*.

Objetivos específicos

- Observar o efeito da suplementação alimentar com *Pleurotus citrinopileatus*;
- Estabelecer a dosagem mais adequada para obtenção dos resultados esperados.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Reativações do micélio de *Pleurotus citrinopileatus*

A espécie *P. citrinopileatus* foi cedida pelo módulo de cultivo/UNESP/BOTUCATU. A linhagem estava preservada em óleo mineral Castelani (1967). O micélio foi reativado em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar). O meio BDA foi preparado com 200g de batata, 12g de Ágar e 10g de Dextrose para um litro de água destilada. O meio foi vertido em placas de Petri em capela de fluxo laminar onde o micélio foi inoculado. Os meios com o inóculo foram mantidos em BOD $\pm 25^{\circ}\text{C}$ até a colonização total do meio em 14 dias.

4.2 – Tratamentos de *D. melanogaster* com o micélio de *Pleurotus citrinopileatus*

Os exemplares de *D. melanogaster* foram cedidos pelo grupo de pesquisa Estresse Oxidativo e Sinalização Celular da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA/campus São Gabriel. As moscas foram mantidas em meio de cultura a base de farinha de milho preparado com, 1kg de farinha de milho grossa, 800g de farinha de milho média, 250g de germe de trigo, 180g de açúcar, 12g de leite em pó, 6g de sal, 6g de farinha de soja e 6g de centeio. (Klein et al, 1999).

Após o preparo da ração de farinha de milho, foi acrescentado a esse meio o micélio de *P. citrinopileatus* proveniente de três placas. O meio enriquecido com o micélio foi dividido em três tubos de vidro os quais foram tampados com esponjas para que permitisse a passagem do ar. Para o controle foi preparado um tubo com meio livre do micélio. O meio de cultura ocupou 1/3 da capacidade do frasco. Cada recipiente recebeu 20 exemplares aleatoriamente, sem identificação de machos ou fêmeas. Os tratamentos foram mantidos em BOD a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ no período de seis dias.

4.3 – Efeito cumulativo no organismo de *D. melanogaster*

Para verificar se os efeitos eram continuados, observou-se as gerações seguintes dos exemplares. Foram retirados 15 exemplares jovens de cada réplica do tratamento anterior

totalizando 75 moscas. Estas foram individualizadas em 5 tubos plásticos com dimensões de 9 x 2,5 cm. Também foram retirados 15 exemplares dos tubos controle e transferidos para novos meios. Sendo um total de 30 moscas para dois tubos controle.

As moscas foram mantidas em meio de cultura isento de micélio. As observações foram mantidas até a terceira geração, sendo realizada a troca de tudo a cada nova geração. As moscas foram mantidas nas mesmas condições do tratamento, em BOD a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ no período de 13 dias para cada geração. A contagem de larvas e pupas iniciou-se após o sexto dia.

4.4 – Efeito em diferentes concentrações do micélio no meio de cultura

O passo seguinte foi quantificar diferentes concentrações do micélio a ser homogeneizado no meio a ser submetido ao consumo das moscas. Essa etapa foi conduzida num período de quatorze dias. Para tanto foram repetidos os procedimentos descritos no item 4.2. Os micélios foram retirados das placas, onde haviam sido reativados, com o auxílio de uma espátula e pesados em papel alumínio em balança de precisão Bel M503. A massa do micélio foi subtraída do peso total de substrato que se desejava ter nos tubos, demonstrando a quantidade de meio de cultura que deveria ser adicionado. Isto resultou em diferentes concentrações do micélio, com a mesma massa de substrato composto em todos os tubos (15g), conforme a equação abaixo:

$$Q_m = S_{c(g)} - M_{(g)}$$

Q_m = Quantidade de meio que deve ser misturado com micélio

$S_{c(g)}$ = Quantidade total de substrato composto que deve conter o tubo

M = massa do micélio

Foram avaliadas as seguintes concentrações (g) de micélio 0,7; 0,9; 1,3; 1,6; 5. Também foram feitos dois tubos controle, contendo 15g de meio de cultura, livre do micélio. Em cada tubo foi colocado vinte e cinco moscas, que foram mantidas em BOD a $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ num espaço de tempo de 14 dias, com contagem de larvas e pupas a cada setenta e duas horas após os primeiros sete dias. Os resultados observados foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey para avaliação da significância estatísticas. As análises estatísticas foram realizados com o auxílio do programa Statistix 8.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 – Tratamentos com o micélio no meio de cultura

Após os seis primeiros dias de alimentação com o meio enriquecido com o micélio iniciou-se a contagem de larvas e pupas. A quantificação resultou em um maior número de larvas e pupas nos tubos de tratamento em comparação com o tubo controle que não recebeu o micélio. A quantificação foi realizada em apenas um dia devido ao grande número de indivíduos sendo também alto o número de larvas e pupas como pode ser visualizado na figura 1, onde o número 1 e 3 são os tratamentos com o micélio e o número 2 o controle.

Com a contagem chegou-se a um número de larvas e pupas significativo (Tabela 1) onde se observa a atuação do fungo no organismo de *D. melanogaster* como possível estimulante da reprodução.

A quantificação de larvas e pupas com tratamento isento de micélio, obteve um percentual de 4,4% e 0,4% respectivamente, enquanto o tratamento com *P. citrinopileatus* obteve um percentual de 8,13% para larvas e 13,6% para pupas. Uma variação significativa no percentual de larvas e pupas, no tratamento com o micélio. As gerações seguintes foram observadas visando identificar se o efeito causado por *P. citrinopileatus* na reprodução de *D. melanogaster* possui efeito cumulativo.

Figura 1 – Tratamento das moscas com *P. citrinopileatus*



Figura 1 - Moscas alimentadas com *P. citrinopileatus* no período de 144 horas. Frascos 1 e 3 -moscas com ração suplementada com o fungo, frasco 2-controle. Fonte: Sibe M. Bolson, 2013

Tabela 1 - Quantidade média de larvas e pupas observadas após 144 horas de tratamento com *Pleurotus citrinopileatus**

	Larvas	Pupas
Controle	22,00b	2,00b
Tratamento com PC	40,66a	68,00a

*As letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si aos níveis de significância no Teste de Tukey ($p < 0,05$)

Fonte: Sibe M. Bolson

5.2 – Teste de Efeito cumulativo do micélio

As moscas que haviam sido alimentadas com *P. citrinopileatus* foram transferidas para meios livres de micélio figura 2. Após foi realizada a quantificação de larvas e pupas. Foi observado o aumento na taxa de reprodução (Tabela 2), porém de forma não significativa de acordo com as análises estatísticas.

Figura 2 – Quantidade de larvas e pupas do primeiro tratamento

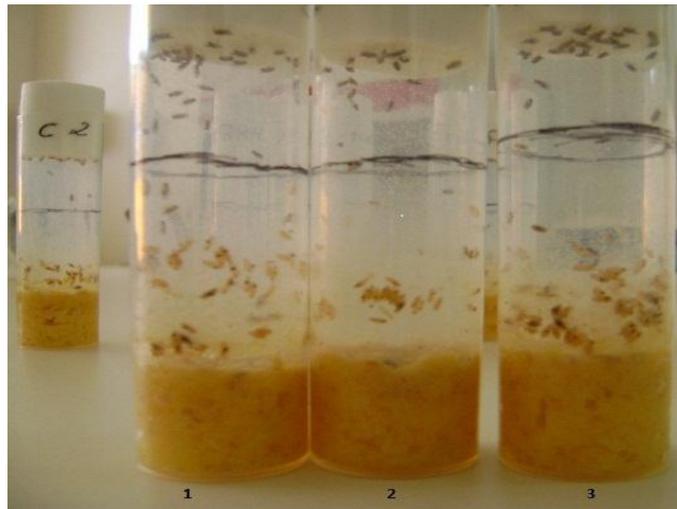


Figura 2 – Quantificação de larvas e pupas no espaço de 30 cm acima do substrato. O frasco 1 e 3 representam as moscas que foram alimentadas com *P. citrinopileatus*, frasco 2- controle.

Tabela 2 – Moscas que foram alimentadas com *Pleurotus citrinopileatus*, quando expostas ao meio isento do fungo, após 168 horas de tratamento*.

	1º contagem		2º contagem		3º contagem	
	Larvas	Pupas	Larvas	Pupas	Larvas	Pupas
Controle 1	0	2	7	8	14	50
Controle 2	0	0	5	7	2	45
Replica 1	2	3	3	41	3	82
Replica 2	0	2	4	34	4	74
Replica 3	4	1	7	29	3	72
Replica 4	2	3	3	26	4	79
Replica 5	3	2	2	46	2	80

*Os valores não diferem entre si ao nível de significância no Teste de Tukey(p<0,05)

Fonte: Sibebe M. Bolson, 2013

Foi obtido um percentual de 0,48% para larvas e 11,61% para pupas em moscas retiradas do tratamento por um período de 168h. Para o controle o percentual foi de 1,2% e 7,12% respectivamente. Observa-se que houve mais desenvolvimento de pupas quando comparado com o controle, porém este aumento não foi estatisticamente significativo. O que denota que a atuação do fungo só ocorre com a exposição direta ao micélio.

5.3 – Ação do micélio em gerações posteriores

As gerações provenientes das moscas que haviam sido alimentadas com o micélio foram observadas quanto ao percentual de reprodução, quantificado em larvas e pupas. Os resultados observados nas gerações seguintes, geração 1 (G1) primeira geração após tratamento com *P. citrinopileatus*, geração 2 (G2) segunda geração e geração 3 (G3) terceira geração das moscas que tiveram contato com o fungo são demonstrados nos gráficos 3, 4 e 5.

Tabela 3 - Resultado da análise da G₁ das moscas tratadas com *Pleurotus citrinopileatus* em meio isento do fungo, após 168 horas de tratamento*.

	1º contagem		2º contagem		3º contagem	
	Larvas	Pupas	Larvas	Pupas	Larvas	Pupas
Controle 1	0	2	7	8	14	50
Controle 2	0	0	5	7	2	45
Replica 1	2	3	3	41	3	82
Replica 2	0	2	4	34	4	74
Replica 3	4	1	7	29	3	72
Replica 4	2	3	3	26	4	79
Replica 5	3	2	2	46	2	80

*Os valores não diferem entre si ao nível de significância no Teste de Tukey(p<0,05)

Fonte: Sibeles M. Bolson, 2013

Tabela 4 - Resultado da análise da G_2 das moscas tratadas com PC em meio isento o PC após sete 168 horas de tratamento*.

	1º contagem		2º contagem		3º contagem	
	Larvas	Pupas	Larvas	Pupas	Larvas	Pupas
Controle 1	0	2	7	8	14	50
Controle 2	0	0	5	7	2	45
Replica 1	2	3	3	41	3	82
Replica 2	0	2	4	34	4	74
Replica 3	4	1	7	29	3	72
Replica 4	2	3	3	26	4	79
Replica 5	3	2	2	46	2	80

*Os valores não diferem entre si ao nível de significância no Teste de Tukey($p < 0,05$)

Fonte: Sibe M. Bolson, 2013

Tabela 5 - Resultado da análise da G_3 das moscas tratadas com PC em meio isento o PC após 168 horas de tratamento*.

	1º contagem		2º contagem		3º contagem	
	Larvas	Pupas	Larvas	Pupas	Larvas	Pupas
Controle 1	0	2	7	8	14	50
Controle 2	0	0	5	7	2	45
Replica 1	2	3	3	41	3	82
Replica 2	0	2	4	34	4	74
Replica 3	4	1	7	29	3	72
Replica 4	2	3	3	26	4	79
Replica 5	3	2	2	46	2	80

*Os valores não diferem entre si ao nível de significância no Teste de Tukey($p < 0,05$)

Fonte: Sibe M. Bolson, 2013

Figura 3 – Gráficos comparativo entre as gerações de moscas

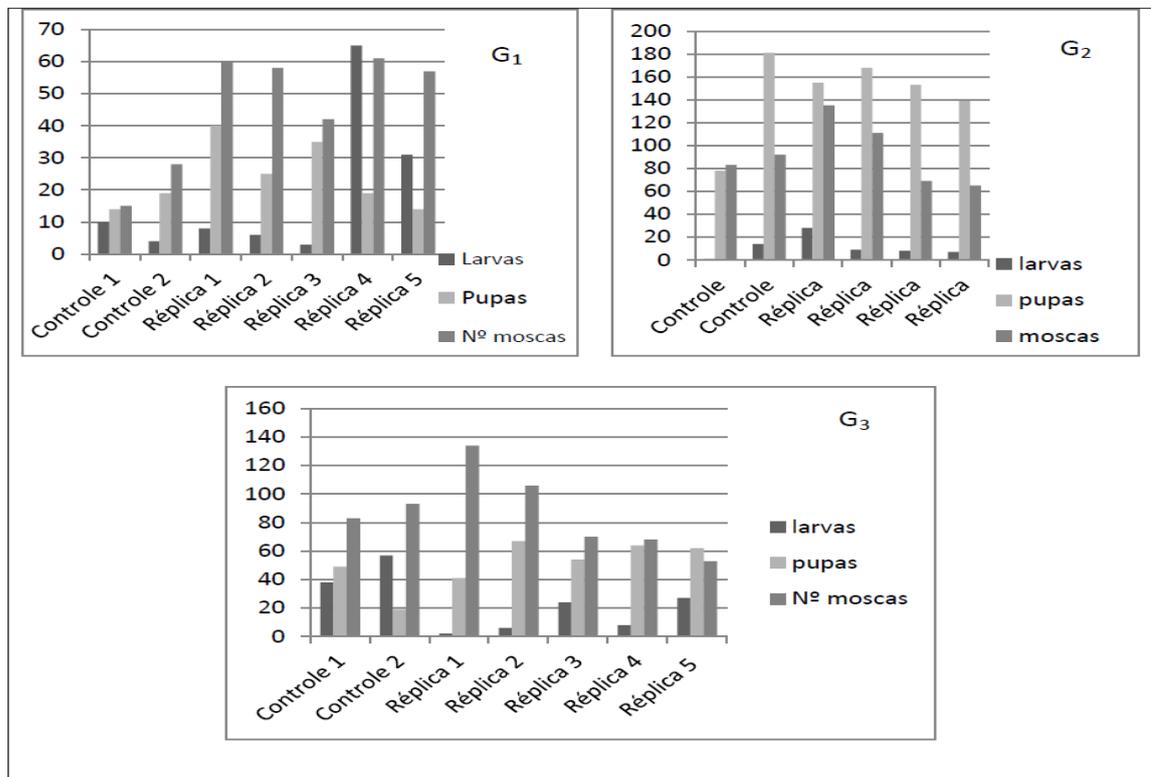


Gráfico 1 – Gráfico comparando o número de larvas, pupas e moscas ao final da observação das três gerações analisadas.

Fonte: Sibeles M. Bolson, 2013

A quantificação na G1, livre do micélio foi de 10,69% para larvas e 12,93% para pupas e no controle foi 6,6% e 3,6% respectivamente. As análises da G2 resultaram no controle com 0,49% de larvas e 9% de pupas, nas réplicas 1,4% para larvas e 19% em pupas. Na G3 o percentual foi de 11,87% de larvas e 8,5% pupas para o controle e para as réplicas 3,35% e 14,4% respectivamente.

As análises realizadas com o programa Statistix8 nas três gerações demonstraram que os valores não diferiram significativamente entre si. O que pode ser interpretado como a não atuação do fungo no organismo das gerações observadas. Interpreta-se que o estímulo a reprodução só ocorre quando o organismo está exposto a o micélio de *P. citrinopileatus*.

5.4 – Efeito das diferentes concentrações

Os resultados das diferentes quantidades do micélio acrescido a o meio de cultura quanto a o número de larvas e pupas, os dados observados são demonstrados na tabela 6.

Tabela 6 - exposição das moscas a diferentes concentrações do micélio no período de 336 horas*.

	Micélio (g)	Nº moscas	Larvas	Pupas	Nº moscas
Controle 1	0	25	37ab	37d	27d
Tratamento 1	0,7	25	16bc	62b	63c
Tratamento 2	0,9	25	8c	61b	73b
Tratamento 3	1,3	25	7c	68a	74b
Tratamento 4	1,6	25	40a	50c	94a
Tratamento 5	5	25	18bc	26e	30d

*As letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si ao nível de significância no Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Sibeles M. Bolson, 2013

Figura 4 – Representação gráfica da quantidade de larvas e pupas em diferentes concentrações do micélio.

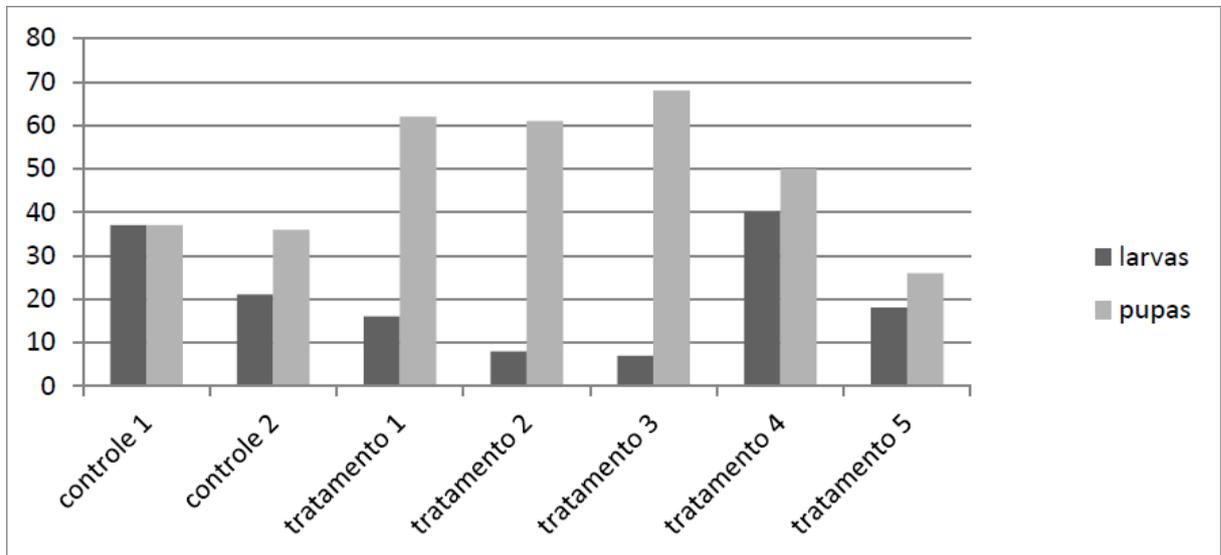


Gráfico 2 – Quantidade de larvas em cinza escuro e quantidade de pupas em cinza claro, nos controles e nas diferentes concentrações do micélio.

Fonte: Sibebe M. Bolson

O percentual de larvas para o controle foi 9,25% e para os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 foi de 4%, 2%, 1,75%, 10% e 4,5% respectivamente. Para pupas o controle ficou 9,25% e para os tratamentos foi de 15,5%, 15,25%, 17%, 12,5% e 6,5% respectivamente.

Esses dados podem ser embasados no aumento da concentração de nutrientes encontrados na ração devido á agregação do micélio.

Figura 5 – Representação gráfica do número de moscas ao final do tratamento com diferentes concentrações do micélio de *Pleurotus citrinopileatus*.

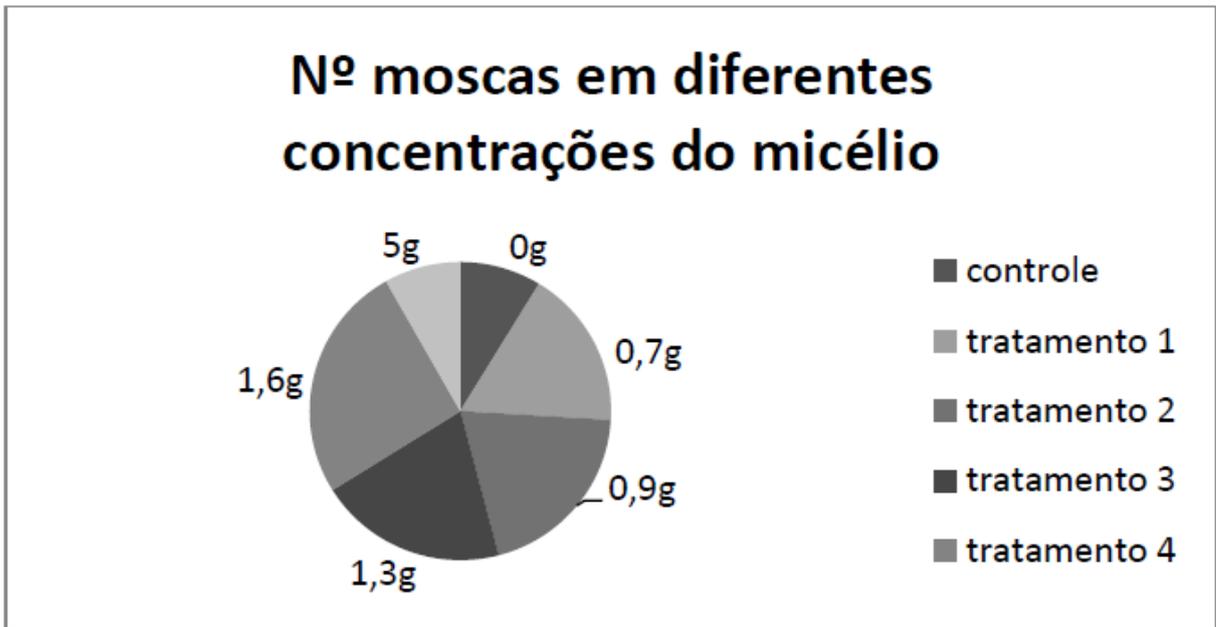


Gráfico 3: Quantidade de moscas ao final dos tratamentos com diferentes concentrações. Controle (0g), tratamento 1 (0,7g), tratamento 2 (0,9g), tratamento 3 (1,3g), tratamento 4 (1,6g), tratamento 5 (5g).

Os valores encontrados no tratamento com diferentes concentrações demonstram que as concentrações inferiores 1,6g de micélio mantiveram o estímulo na reprodução em comparação com o controle. A concentração que teve o melhor resultado como estimulante reprodutivo foi de 1,6g de micélio onde houve o aumento do número de larvas, pupas e moscas ao fim do tratamento. A concentração superior a 1,6g ocasionou a sua redução.

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição de *Drosophila melanogaster* ao micélio de *Pleurotus citrinopileatus* alterou a taxa reprodutiva da mesma durante a exposição direta, aumentando o número de larvas e pupas. A reprodução das moscas não foi estimulada nas gerações seguintes, na ausência do fungo. As diferentes concentrações de micélio demonstraram que os melhores valores para o estímulo reprodutivo é a concentração de 0,12g de micélio por grama de substrato. As concentrações superiores a 0,12g reduziram os estímulos reprodutivos. Os resultados observados na utilização de *Pleurotus citrinopileatus* no meio de cultura demonstra que existe uma melhora na taxa reprodutiva, essa melhora está condicionada a concentrações definidas de micélio.

Estes resultados ressaltam o potencial desta espécie como estimulante da reprodução em cobaias.

7 - REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G.R. & REYES, F.G.R. ***Drosophila melanogaster* Meigen: 1. Sensibilidade Ao Endosulfan E Biomonitoramento De Seus Resíduos Em Couve-Manteiga.** Rev. Inst. Adolfo Lutz, v.58, n.2, p.15-24, 1999.

ALMEIDA, G.R.; REYES, F.G.R.; RATH, S. ***Drosophila melanogaster* Meigen: 3. Sensibilidade Ao Carbofuran E Biomonitoramento De Seus Resíduos Em Repolho.** Quím. Nova, v.24, n.6, p.768-772, 2001.

AMAT-GARCÍA, E.C., AMAT-GARCÍA, G.D. & HENAO-M., L.G. **Diversidad taxonómica y ecológica de la entomofauna micófaga en un bosque altoandino de la cordillera oriental de Colombia.** Ecología, 28, 223-231, 2004.

BAGDONAS, M.; MELLO, M.H.S. DE; UNGARO, M.T.S.; GUINDANI, C.M.A.; FERREIRA, M.S.; GAETA, R. **Ensaio Biológico Como Testes Preliminares Na Detecção De Resíduos De Inseticidas Em Frutas E Hortaliças.** Rev. Bras. Toxicol., v.1, n.1, p.3-5, 1988.

BOBEK, P., GINTER, E., KUNIAK, L., BABALA, M.D., JURCOVICOVÁ, M., OZDÍN, L., CERVEN, J. **Effect Of Mushroom *Pleurotus Ostreatus* And Isolated Fungal Polysaccharide On Serum And Liver Lipids In Syrian Hamsters With Hyperlipoproteinemia.** Nutrition, v.7, n.2, p.105-108, 1991 a.

BOBEK, P., GINTER, E., JURCOVICOVÁ, M., KUNIAK, L. **Cholesterol-Lowering Effect Of The Mushroom *Pleurotus ostreatus* In Hereditary Hypercholesterolemic Rats.** Annual Nutritional Metabolism, v.35, p.191-195, 1991 b

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H.M.; FURLAN, S.A. **Evaluation Of *Pleurotus Ostreatus* And *Pleurotus Sajor-Caju* Nutritional Characteristics When Cultivated In Different Lignocellulosic Wastes.** Food Chemistry, v. 88, n. 3, p. 425-428, 2004.

CARSON, H.L., **The ecology of *Drosophila* breeding sites**. University of Hawaii. Harold L-Lyon Arboretum Lecture, Honolulu, 2: 1-28.1971

CASTELLANI A. **Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water**. Further Researches. J Trop Med Hyg 1967; 70: 181-184.

CASTRO, A. L. A.; PAIVA, P. C. A.; DIAS, E. S.; SANTOS, J. **Avaliação das alterações bromatológicas e de degradabilidade do resíduo de lixadeira do algodão após tratamento biológico com *Pleurotus sajor-caju***. Ciência e Agrotecnologia, v.28, n.3, 2004, p.608-613.

COHEN R., PERSKY L., HADAR Y. **Biotechnological Applications And Potencial Of Wood-Degrading Mushrooms Of The Genus *Pleurotus***. Applied Microbiology and Biotechnology, v.58, n.5, p. 582-594, 2002.

CORDTS, R., L. PARTRIDGE. **Courtship reduces longevity of male *Drosophila melanogaster***. Animal Behaviour 52: 269–178, 1996.

COSTA M., MATEUS R. P., MOURA M. O., MACHADO L. P. B., **Adult Sex Ratio Effects On Male Survivorship Of *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera, Drosophilidae)**, Revista Brasileira de Entomologia, 2010.

DA CUNHA, A. B. E L. E. MAGALHÃES. **A ecologia e a genética de populações de *Drosófila* no Brasil**. Ciência e Cultura, São Paulo, 1965, 17 (4): 525-527.

FONSECA C. A., PEREIRA. D. G., **Aplicações Da Genética Toxicológica Em Planta Com Atividade Medicinal**, Informa, v.16, nº 7-8, 2004

FREIRE-MAIA N E C. PAVAN. 1949. **Introdução ao estudo da drosófila**. Cultus, São Paulo, 1949, 1: 1-171.

GHOSH, N.; CHAKRAVARTY, D. K; **Predictive analysis of the protein quality of *Pleurotus citrinopileatus***, 1990.

GHOSH, N.; MITRA, D. K.; CHAKRAVARTY, D. K. **Composition Analysis Of Tropical White Oyster Mushroom (*Pleurotus citrinopileatus*)**. Ann. Appl. Biol. 1991, 118, 527-531.

GRAF, U. **The Actual Situation of SMART (Somatic Mutation And Recombination Test) In *D. melanogaster***. Ver. Int. Contam. Ambient. v.10, suplement. v.1, p.5-7, 1994.

HANSKI, **Metapopulation dynamics does it help to have more of the same?** Trends ecology and evolution 4: 113-114, 1989.

HERNÁNDEZ, D.; SÁNCHEZ, J.; YAMASAKI, K. **A Simple Procedure For Preparing Substrate For *Pleurotus ostreatus* Cultivation**. Bioresource Technology, v. 90, p. 145-150, 2003.

HILBER, O. **The genus *pleurotus* (fr.) Kummer**. Erschienen im selbstverlag, 1997.

HOSSAIN, S., HASHIMOTO, M., CHOUDHURY, E.K., NUHU ALAM, HUSSAIN, S., HASAN, M., CHOUDHURY, S.K. & MAHMUD, I. **Dietary mushroom (*Pleurotus ostreatus*) ameliorates atherogenic lipid in hypercholesterolameic rats**. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 30: 470-475, 2003.

JOSEPH JR., H. & KNOBEL, M.G. **Estudo Preliminar Da Sensibilidade Da Mosca *Drosophila melanogaster* A Diversos Pesticidas Organoclorados**. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v.40, n.1, p.43-47, 1980.

KOKKO, H. & M. D. JENNIONS. **Parental Investment, Sexual Selection And Sex Ratios**. Journal of Evolutionary Biology 21: 919–948, 2008.

KOMONEN, A. **Hotspots of insect diversity in Boreal forests**. Conservation Biology, 17, 976-981, 2003.

KYUNG-JIN MIN, MARC TATAR, ***Drosophila* diet restriction in practice: Do flies consume fewer nutrients?**, 2005.

LESSELLS, C. M. **The Evolutionary Outcome Of Sexual Conflict.** *Philosophical Transactions* of the Royal Society B 361: 301–317, 2006.

MARK, D. Adans, et al. **The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*.** *Science* 24 March 2000, Vol. 287, 5461 pg. 2185-2195.

MARKOW, T. A. 2000. **Forced matings of *Drosophila* Females In Natural Populations.** *American Naturalist* 156: 100–103, 2000.

MEIGEN, J.W. **Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten.** 6 Theil. 401 pg. Schulzische Buchhandlung, Hamm, 1830.

NOSAL OVA, V., BOBEK, P., CERNA, S., GALBAVY, S., STVRTINA, S. **Effects of pleuran (beta-glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats.** *Physiology Research*, v. 50, n. 6, p. 575-581, 2001.

OBODAI, M., CLELAND-OKINE, J., VOWOTOR, K.A. **Comparative Study On The Growth And Yield Of *Pleurotus Ostreatus* Mushroom On Different Lignocellulosic Byproducts.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v, 30, n.3, p. 146-149, 2003.

PATRABANSH, S; MADAN, M. **Studies On Cultivation, Biological Efficiency And Chemical Analyses Of *Pleurotus sajor-Caju* (Fr.) Singer On Different Bio-Wastes.** *Acta Biothecnology*, v.17, n. 2, p. 107-122, 1997.

PAULINO, C.A.; MAZANTI, M.T.; GAETA, R. **Método De Triagem Para Detecção De Intoxicações Pelo Carbofuran Usando Moscas *Drosophila melanogaster*.** *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.27, n.1, p.209-212, 1992.

PRAMANIK, M.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; ROUT, D.; ISLAM, S.S. **Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*.** *Carbohydrate Research*, v.340, n. 4, p. 629-636, 2005.

R. COHEN · L. PERSKY · Y. HADAR, **Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus pleurotus**, Appl Microbiol Biotechnol, 2002.

SALMONES, D.; MATA, G.; WALISZEWSKI, K.N. **Comparative Culturing Of Pleurotus Spp. On Coffee Pulp And Wheat Straw: Biomass Production And Substrate Biodegradation**. Bioresource Technology, v. 96, n. 5, p. 537-544, 2005.

SAVALI, U. M. **SEXUAL SELECTION**, p. 207–221. In: C. W. Fox; 2001

SCHMIDT, P.; WECHSLER, F. S.; NASCIMENTO, J. S.; VARGAS JUNIOR, F. M. **Tratamento do feno de braquiária pelo fungo Pleurotus ostreatus**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.32, n.6, 2003a, p.1866-1871.

SHORROCKS, B. **Os locais de reprodução de Drosophilas em florestas temperadas**. Genética e Biologia de drosophila. Eds A. Ashburner, H. L. Carson & J. N. Jr. Thompson, Vol. 3-B. pp 385 - 428 . Academic Press, Londres, 1982 .

STARMER, W. T. **A comparison of Drosophila habitats according to the physiological attributes of the associated yeast communities**. Evolution, Lancaster, 35:35-52. 1981

TIDON, R.; D. F. LEITE; L. B. FERREIRA E B. F. D. LEÃO. **Drosofilídeos (Diptera, Insecta) do Cerrado**. Ecologia e Biodiversidade do cerrado, 1, 412p. 2005

V. K. PANDEY, M. P. SINGH, A. K. SRIVASTAVA, S. K. VISHWAKARMA e S. TAKSHAK, **Biodegradation Of Sugarcane Bagasse By Pleurotus citrinopileatus**, Cellular e Molecular Biology, 2012.

WASSER, S. P. **Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides**. Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 258–274, 2002.

WHIGBY, S. & T. CHAPMAN. **Female Resistance To Male Harm Evolves In Response To Manipulation Of Sexual Conflict**. Evolution 58: 1028–1037, 2004.

ZHANG, J.; WANG, G.; LI, H.; ZHUANG, C.; MIZUNO, T.; ITO, H.; SUZUKI, C.; OKAMOTO, H.; LI, J. **Antitumor polysaccharides from a chinese mushroom, "yuhuangmo", the fruiting body of pleurotus citrinopileatus.** Biosci., Biotechnol., Biochem. 1994, 58, 1195-1201.