



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

***ASPERGILLUS* SEÇÃO *FLAVI*: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES
AFLATOXIGÊNICAS DA CASTANHA DO BRASIL E ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DE
ASPERGILLUS ORYZAE EM RELAÇÃO A DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA CANA-
DE-AÇÚCAR**

GLÁUCIA EMY OKIDA MIDORIKAWA

Brasília, Junho de 2014.

GLÁUCIA EMY OKIDA MIDORIKAWA

***ASPERGILLUS* SEÇÃO *FLAVI*: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES
AFLATOXIGÊNICAS DA CASTANHA DO BRASIL E ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DE
ASPERGILLUS ORYZAE EM RELAÇÃO A DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA
CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho apresentado à Universidade de
Brasília como requisito parcial para
qualificação de tese de doutorado em
Biologia Molecular pelo Programa de Pós
Graduação em Biologia Molecular

Orientador

Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller

Brasília, Junho de 2014.

**ASPERGILLUS SEÇÃO FLAVI: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES
AFLATOXIGÊNICAS DA CASTANHA DO BRASIL E ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DE
ASPERGILLUS ORYZAE EM RELAÇÃO A DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA
CANA-DE-AÇÚCAR**

GLÁUCIA EMY OKIDA MIDORIKAWA

Banca examinadora

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho
Examinador interno (UnB – Departamento de Biologia Celular)

Prof^a Dra. Eliane Ferreira Noronha
Examinador interno (UnB – Departamento de Biologia Celular)

Prof^a Dra. Marisa Álvares da Silva Ferreira
Examinador externo (UnB – Departamento de Fitopatologia)

Dra. Daniela Matias Bittencourt
Examinador externo (Embrapa Amazônia Ocidental)

Prof. Dr. Ricardo H. Kruger
Examinador suplente (UnB – Departamento de Biologia Celular)

Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller
Orientador (UnB – Departamento de Biologia Celular)

Brasília, Junho de 2014.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília (UnB), aos professores e funcionários que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular pela oportunidade de realização deste curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) pelo apoio financeiro, tornando possível a realização desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller que me guiou durante a minha formação acadêmica transmitindo os seus conhecimentos com empenho, paciência, dedicação e otimismo;

Ao Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho pela disponibilidade da estirpe de *Aspergillus oryzae*, assim como a disponibilidade de equipamentos e reagentes usados para o desenvolvimento desse estudo;

À Prof^a. Dra. Eliane Ferreira Noronha pela parceria e o compartilhamento dos seus conhecimentos;

À Dra. Daniela Matias Bittencourt da Embrapa Amazônia Ocidental, à Jurema Azevedo Dias da Embrapa Amapá, ao Dr. Rivadalve Gonçalves da Embrapa Acre e ao Dr. Francisco Freire da Embrapa CNPAT pela disponibilidade dos isolados de *Aspergilli* usados nesse estudo;

À Dra. Maria de Lourdes M de Sousa da Embrapa Agroindústria de Alimentos pela realização da análise UPLC/MS/MS das estirpes de *Aspergilli*;

Às amigas Camila Louly, Suelen Rabelo, Gisela Signorelli e Paula Jaramillo pelo apoio, carinho, compreensão, incentivo, paciência, meus sinceros agradecimentos;

Aos integrantes dos Laboratórios Planta x Praga e Enzimologia pelo compartilhamento de conhecimentos e o meu engrandecimento profissional e pessoal;

Aos meus familiares, em especial à minha mãe Sílvia Okida e tias Elisa Okida e Mary Nozu pelo incentivo, apoio, motivação e paciência;

À Delma Araujo por fazer a minha ser mais fácil;

À minha cachorrinha Nina pelo companheirismo de todas as horas.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ANEXOS	x
RESUMO GERAL	xi
GENERAL ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 <i>Aspergillus</i> : Seção <i>Flavi</i>	15
1.2 <i>A. flavus</i> X <i>A. oryzae</i>	16
CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO MELECULAR DE <i>Aspergillus</i> AFLATOXIGÊNICOS	
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Micotoxinas e seu impacto na agricultura e saúde humana	19
1.2 Aflatoxinas	20
1.3 Importância das culturas de castanha-do-Brasil, castanha de cajú e amendoim para o Brasil	22
1.4 Processo de infecção do <i>A. flavus</i>	24
1.5 Métodos de diagnose de micotoxinas: Limitações e estratégias inovadoras	26
1.5.1 Controle e monitoramento do sistema alimentar	26
1.5.2 Identificação morfológica de fungos micotoxigênicos	26
1.5.3 Detecção cromatográfica de micotoxinas	29
1.5.4 Detecção Imunológica de micotoxinas	31
1.5.5 Diagnose molecular de fungos micotoxigênicos	33
1.5.5.1 DNA ribossomal nuclear	34
1.5.5.2 DNA mitocondrial	35
1.5.5.3 Metabólitos secundários de <i>A. flavus</i>	37
1.5.5.4 Genes da via biossintética de aflatoxinas: polimorfismos e expressão diferencial	41
2 JUSTIFICATIVA	45
3 HIPÓTESES A SEREM TESTADAS	46
4 OBJETIVOS	46
4.1 Objetivo Geral	46
4.2 Objetivos Específicos	46
5 MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1 Coleção e manutenção de isolados do gênero <i>Aspergillus</i>	47
5.2 Identificação morfológica de fungos contaminates da castanha do Brasil da região Amazônica, Acre e Amapá	47
5.3 Extração do DNA genômico	48
5.4 Identificação molecular de fungos contaminates da castanha do Brasil da região Amazônica, Acre e Amapá	49
5.5 Caracterização de isolados do gênero <i>Aspergillus</i> quanto a produção de aflatoxinas.	50
5.6 Caracterização da região mtDNA SSU rDNA e desenho de primer para o Gênero <i>Aspergillus</i>	51
5.7 Análise PCR RFLP da região mtDNA SSU rDNA de espécies de <i>Aspergillus</i> da seção <i>Flavi</i>	52
5.8 Análise da diversidade nucleotídica dos genes <i>aflR</i> , <i>aflP</i> e <i>aflQ</i> da via biossintética de isolados de <i>A. flavus</i> contrastando em produção de aflatoxinas	52
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1 Identificação morfológica e molecular da região rDNA ITS, e dos genes β -tubulina e calmodulina dos fungos presentes em castanha do Brasil da região Amazônica, Acre e Amapá	55

6.2	Caracterização de isolados do Gênero <i>Aspergillus</i> quanto a produção de aflatoxinas.	58
6.3	Caracterização da região mtDNA SSU rDNA das espécies de <i>Aspergillus</i> da seção <i>Flavi</i> aflatoxigênicos	63
6.4	Análise PCR RFLP da região mtDNA SSU rDNA de espécies de <i>Aspergillus</i> da seção <i>Flavi</i>	64
6.5	Caracterização da diversidade nucleotídica dos genes <i>aflR</i> , <i>aflP</i> e <i>aflQ</i> da via biossintética de <i>A. flavus</i> aflatoxigênico e não aflatoxigênico.	65
7	DISCUSSÃO	69
7.1	Identificação morfológica e molecular da região rDNA ITS, e dos genes β -tubulina e calmodulina dos fungos presentes em castanha do Brasil da região Amazônica, Acre e Amapá	69
7.2	Caracterização da região mtDNA SSU rDNA	70
7.3	Caracterização dos genes <i>aflP</i> , <i>aflQ</i> e <i>aflR</i> da via biossintética de <i>A. flavus</i>	71
8	CONCLUSÃO	73
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
10	ANEXOS	87
11	ARTIGO CIÊNTEFICO PUBLICADO PELA REVISTA BMC MICROBIOLOGY.	89
12	TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS	111

CAPÍTULO 2: ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DE *Aspergillus oryzae* EM RELAÇÃO A DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR PRÉ-TRATADO

1	INTRODUÇÃO	116
1.1	<i>Aspergillus oryzae</i>	116
1.2	Biocombustível	116
1.2.1	Estrutura da biomassa Lignocelulósica	119
1.2.1.1	Celulose	121
1.2.1.2	Hemicelulose	121
1.2.1.3	Lignina	122
1.2.1.4	Pectina	122
1.2.2	Produção do bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica	123
1.2.2.1	O pré-tratamento	123
1.2.2.2	A hidrólise	124
1.2.3	Enzimas produzidas por fungos capazes de despolimerizar a parede celular vegetal	125
1.2.3.1.1	Degradação da celulose	125
1.2.3.1.2	Degradação da hemicelulose	127
1.2.3.1.3	Degradação da Pectina	128
1.2.3.1.4	Degradação da Lignina	129
1.3	Genômica e transcritômica aplicada a fungos lignocelulolíticos	130
1.3.1	Genômica	130
1.3.2	Transcritômica	131
1.3.3	Next Generation Sequencing-NGS	133
1.4	Prospecção de fungos lignocelulolíticos	135
2	JUSTIFICATIVA	137
3	HIPÓTESE A SER TESTADA	138
4	OBJETIVOS	138
4.1	Objetivo Geral	138
4.1.2	Objetivos Específicos	138
5	MATERIAL E MÉTODOS	139
5.1	Condições de cultura e identificação molecular do fungo <i>A. oryzae</i>	139
5.2	Avaliação da produção enzimática de <i>A. oryzae</i> cultivado em bagaço de cana de açúcar e glicose	140
5.3	Avaliação de protocolos para a extração do RNA total de <i>A. oryzae</i> cultivado em bagaço de cana de açúcar pré-tratado	141
5.4	A caracterização do transcritoma de <i>A. oryzae</i>	143

5.4.1 Construção da bibliotecas de cDNA e sequenciamento Illumina RNAseq	144
5.4.2 Análise bioinformática	145
5.4.2.1 Análise de qualidade das sequências	145
5.4.2.2 Alinhamento das leituras ao genoma de referência e análises da expressão diferencial in silico	146
5.4.2.3 Níveis de expressão dos genes normalizados	146
5.4.2.4 Categorização de enzimas com atividade carboidrato	147
5.4.2.5 Categorização de fatores de transcrição	147
5.4.2.6 Desenho de primers constitutivos para validação em qRT-PCR	147
6 RESULTADOS	149
6.1 Confirmação da posição taxonômica do <i>A. oryzae</i> BLU37	149
6.2 Quantificação da atividade enzimática <i>A. oryzae</i> BLU37 cultivado em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e glicose	150
6.3 A caracterização do transcrito de <i>A. oryzae</i>	152
6.3.1 Extração e quantificação do RNA total de <i>A. oryzae</i>	152
6.3.3 Estatísticas das sequências	158
6.3.4 Análise de qualidade das sequências	160
6.3.5 Análise dos genes expressos por biblioteca de cDNA	161
6.3.6 Análise da expressão de genes CAZy de <i>A. oryzae</i> cultivado sob diferentes tratamentos	164
6.3.6.1 Caracterização de genes codificantes de enzimas CAZy	164
6.3.9.4 Fatores de transcrição	168
7 DISCUSSÃO	169
7.1 Confirmação da posição taxonômica do <i>A. oryzae</i> BLU37	169
6.2 Perfil da atividade enzimática <i>A. oryzae</i> BLU37 cultivado em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e glicose	169
6.3 Análise da expressão gênica diferencial por biblioteca de cDNA	170
6.3.1 Análise da expressão diferencial de genes CAZy	171
6.3.2 Fatores de transcrição e controle da expressão gênica em fungos	176
7 CONCLUSÃO	179
8 TRABALHOS EM ANDAMENTO E PERSPECTIVAS	180
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181
10 ANEXOS	186
11 TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS	188

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO MELECULAR DE *Aspergillus* AFLATOXIGÊNICOS

Tabela 1: Genes envolvidos na via biossintética da aflatoxinas de *A. flavus*. Nomenclatura atual dos genes envolvidos na síntese da aflatoxina, outras denominações usadas para cada gene correspondente, produtos enzimáticos e suas funções são descritas nessa tabela. Siglas usadas na tabela indicam: FAS (ácidos graxos sintases), PKS (policetídeo), NOR (ácido norsolorínico), AVN (averatina), HAVN (5'-hidroxiaveratina), AVF (averufina), VHA (acetato versiconal hemiacetal), VAL (versiconal), VERB (versicolorina B), VERA (versicolorina A), ST (esterigmatocistina), DMST (demetilesterigmatocistina), DMDHST (demetilidihidroesterigmatocistina), OMST (O-metilesterigmatocistina), DHOMST (dihidro-O-metilesterigmatocistina). 40

Tabela 2: Combinações entre *primers* dos genes *afIR*, *afIP* e *afIQ* de *A. flavus*, com sequências dos *primers Forward* e *Reverse*, respectivamente, tamanhos dos amplicons esperados e temperatura de anelamento utilizada (adaptada de Midorikawa, 2009). 53

Tabela 3: Identificação morfológica e molecular de *Aspergillus* isolado de castanha do Brasil da região Amazônica. A tabela mostra informações quanto a identificação de cada isolado de *Aspergillus*, seguida por origem geográfica da coleta, identificação taxonômica morfológica clássica, e identificação molecular para os marcadores das regiões do rDNA ITS, β -tubulina e calmodulina. Para cada classificação BLASTn, são dados os valores de cobertura, E-value, máxima de identidade para cada sequência analisada em homologia com as sequências do banco de dados NCBI, assim como o número de acesso da sequência homóloga do NCBI. 56

Tabela 4: Caracterização, por meio de UPLC/MS/MS, de *Aspergillus* da seção *Flavi* aflatoxigênico. Informações quanto a identificação do isolado, origem geográfica da coleta das amêndoas, hospedeiro de origem e micotoxinas detectadas, estão descritas. aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1), aflatoxina G2 (AFG2), aflatoxina M1 (AFM1), Acido Kojico (AK) e ácido ciclopiazônico (ACP). Micotoxinas não detectadas são representadas por ND. Os sinais + e ++ correspondem à produção de aflatoxina dentro do limite de quantificação da curva de calibração e produção acima do limite da curva de calibração, respectivamente. Os limites de quantificação correspondente à AFB1 0,13 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFB2 0,12 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFG1 0,08 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e AFG2 0,11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e ACP 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 59

Tabela 5: Caracterização CCD e UPLC-FLD de *A. flavus*. A tabela mostra informações quanto a identificação do isolado, origem geográfica da coleta das amêndoas, hospedeiro de origem e toxinas produzidas, aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1), aflatoxina G2 (AFG2), aflatoxina M1 (AFM1), Acido Kojico (AK) e ácido ciclopiazônico (ACP). Micotoxinas não detectadas são representadas por ND. 60

Tabela 6: Identificação das amostras analisadas, haplótipos identificados nos genes *afIP*, *afIQ* e *afIR*, concentração de aflatoxina B produzida por cada isolado, e concentração de ácido ciclopiazônico produzido por cada isolado. Os haplótipos são definidos individualmente por cada gene. As concentrações de toxinas são definidas em $\mu\text{g}/\text{L}$. Concentrações de toxinas não detectadas são apresentadas por ND. 67

CAPÍTULO 2: ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DE *Aspergillus oryzae* EM RELAÇÃO A DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR PRÉ-TRATADO

Tabela 7: Composição química de resíduos agroindustriais (in Sarkar et al., 2012) 120

Tabela 8: Resumo do desenho experimental para a análise do transcrito de *A. oryzae* mostrando tratamentos, réplicas e aplicação na flowcell do canal Illumina. 144

Tabela 9: Sequência de primers forward e reverse, temperatura de anelamento e tamanho esperado do produto de PCR em pares de bases. 148

Tabela 10: Integridade e cálculos de concentração para cada das 16 amostras de RNA total de *A. oryzae* selecionada para análise do transcrito por meio de RNAseq Illumina. O canal de sequenciamento Illumina segue de acordo com os substratos de cultivo. Amostras cultivadas em bagaço de cana com sequenciamento no canal 1 e amostras cultivadas em glicose com sequenciamento no canal 2. 157

Tabela 11: Resumo dos dados estatísticos em relação ao número de dados gerados (Gbases), número de sequências lidas (milhões), porcentagem de sequências com qualidade FASTQ GTE30 e a media do valor de qualidade FASTQ GTE30 a partir dos dados de RNAseq para cada biblioteca de cDNA de *A. oryzae*. 159

Tabela 12: Resumo do número de sequências mapeadas a partir dos dados de RNAseq para cada das 16 biblioteca de cDNA de *A. oryzae* cultivado em meios de cultura líquido e semi-sólido, usando o bagaço de cana, ou a glicose como única fonte de carbono, em dois momentos distintos. A tabela segue linhas de informações por biblioteca de cDNA. 160

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Aspergillus* AFLATOXIGÊNICOS

Figura 1: A: Ciclo de vida de *Aspergillus* spp. (Adaptado de Dube, 1990 in FAO, Barley Post-Harvest Operation: Chapter 4 (http://www.fao.org/inpho/content/compend/text/ch31/ch31_04.htm); B: Esclerócio de *Petromyces flavus* formado em cultura (adaptado de Horn et al., 2009); C: Ascósporo de *Petromyces flavus* mostrando a divisão equatorial e característica das espículas (adaptado de Horn et al., 2009). 25

Figura 2: Colônia das espécies membro da seção *Flavi* em meio de cultura semi-sólido CYA (A, D e G), MEA (B, E e H) e YES (C, F e I) cultivadas por 7 dias a 25°C. A – C: Colônia de *Aspergillus flavus*. D – F: Colônia de *Aspergillus nomius*. G – I: Colônia de *Aspergillus parasiticus* (modificada de Varga et al., 2011). 28

Figura 3: Conídio de espécies membro da seção *Flavi*. A: Conídio de *A. flavus*; B: Conídio de *A. nomius*; C: Conídio de *A. parasiticus* (modificada de Varga et al., 2011). 28

Figura 4: Conidióforo de espécies membro da seção *Flavi*. A: Conidióforo de *A. flavus*; B: Conidióforo de *A. nomius*; C: Conidióforo de *A. parasiticus*; D e E: Esclerótia de *A. nomius* (modificada Singh et al., 1991). 29

Figura 5: Localizações de laboratórios credenciados pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), ANVISA, e outros (Midorikawa, 2009). 31

Figura 6: Disposição dos genes 18S, 5,8S e 28S, e espaçadores não transcritos ITS1 e ITS2 do rDNA. As repetições em tandem do grupo de genes rDNA são separadas por um espaçador intergênico (IGS). Identificação da posição de hibridização dos primers ITS universais, ITS5 e ITS4. 35

Figura 7: Pequena subunidade do DNA mitocondrial ribossomal com local de anelamento de primers universais MS1 e MS2; e grande subunidade do DNA mitocondrial ribossomal com local de anelamento de primers universais ML1 e ML2, ML3 e ML4, ML5 e ML6, ML7 e ML8 36

Figura 8: Grupo de genes responsáveis pela síntese de aflatoxina de *A. flavus*. As setas indicam a direção de transcrição de cada gene. As diferentes cores usadas nas setas indicam a função de cada gene na via. *afIA*, *afIB* participam da síntese de ácidos graxos, e *afIC* (gene em azul) sintetiza o ácido norsolorínico (*NOR*). O *NOR*, mais a frente, é sintetizado para esterigmatocistina (genes em amarelo) e em seguida para aflatoxina (genes em verde). Os genes regulatórios, *afIR* e *afIS*, são mostrados em vermelho. Nomenclatura atual dos genes é mostrada acima das setas, e a nomenclatura antiga dos genes, é mostrada abaixo. Os genes em cinza não têm a sua função atribuída (modificado de Amaike & Keller, 2011). 37

Figura 9: Biossíntese da aflatoxina por *A. flavus*. Setas indicam a direção de síntese da via. Círculos sem preenchimento indicam produto enzimático. Quadrados indicam a identificação da enzima (*Enzyme Commission number - E.C. number*). Genes codificadores de enzimas são indicados ao longo da via (modificado KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) - <http://www.genome.jp/kegg/>). 38

Figura 10: Amplificação por PCR específica de uma região mtDNA SSU rDNA exclusivamente em membros do gênero *Aspergillus*, com co-amplificação de um IAC. M: marcador 1 Kb ladder Plus; 1 ao 3: isolados UCB036, UCB040 e UCB044 de *A. flavus*; 4: isolado 1 de *A. awamori*; 5: isolado 1 de *A. fumigatus*; 6: isolado 1 de *A. niger*; 7 e 8: isolados CMUnB 1824 e 1848 de *F. solani* f. sp. *glycines*; 9: isolado CMUnB 1974 de *F. solani*; 10: isolado 1 de *Penicillium citrinum*; 11: isolado 1 de *Trichoderma harzianum*; 12: isolado 1 de *Cladosporium cladosporioides*; 13: controle negativo (adaptado de Midorikawa, 2009). 63

Figura 11: Amplificação por PCR específica de uma região mtDNA SSU rDNA de *Aspergillus*.

Figura 12: Amplificação por PCR da região mtDNA SSU rDNA por meio de primers específicos de *Aspergillus*, ASP_GEN_MTSSU_F₁ e ASP_GEN_MTSSU_R₁. M: Marcador molecular Low DNA MASS Ladder (Invitrogen); 1: *A. flavus* UBC 30; 2: *A. parasiticus*; 3: *A. tamarii*; 4: *A. fumigatus*; 5:

A. nomius; 6: *A. versicolor*; 7: *A. terreus*; 8: *A. niger*; 9: *A. ochraceus*; 10 e 11: *Emericella* ssp.; 12: *Penicillium citrinum*; 13: *Trichoderma brevicompactum*; 14 e 15: *Fusarium solani*. 65

Figura 13: Digestão pela enzima *DraI* (*Invitrogen*) do produto de PCR da região mtDNA SSU rDNA amplificado pelo par de *primers* específicos de *Aspergillus*, ASP_GEN_MTSSU_F₁ e ASP_GEN_MTSSU_R₁. 1-3: *A. flavus* UBC 13, UCB 30 e UCB 27; 4: *A. parasiticus*; 5: *A. nomius*; 6: *A. tamarii*; 7: *A. fumigatus*; 8: *A. terreus*; 9: *A. niger*; 10: *A. ochraceus*; M: Marcador molecular Low DNA MASS Ladder (*Invitrogen*). 65

Figura 14: Desequilíbrio de ligação do gene *afIP*. Correlação par-a-par entre SNPs são plotadas contra a distância física entre os SNPs em pares de bases. A linha reta é referente ao valor de r^2 68

Figura 15: Desequilíbrio de ligação do gene *afIQ*. Correlação par-a-par entre SNPs são plotadas contra a distância física entre os SNPs em pares de bases. A linha reta é referente ao valor de r^2 68

Figura 16: Desequilíbrio de ligação do gene *afIR*. Correlação par-a-par entre SNPs são plotadas contra a distância física entre os SNPs em pares de bases. A linha reta é referente ao valor de r^2 68

CAPÍTULO 2: ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DE *Aspergillus oryzae* EM RELAÇÃO A DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR PRÉ-TRATADO

Figura 17: Diagrama esquemático dos componentes estruturais da parede celular primária e seus arranjos. As microfibrilas de celulose são revestidas com hemiceluloses (como as xiloglicanas), que podem interligar as microfibrilas umas as outras. As pectinas formam um bloqueio de matriz e interage com proteínas estruturais (modificada de Taiz & Zeiger, 2010). 120

Figura 18: Celobiose. Ligação β -1,4-glicosídica entre dois resíduos de glicose em orientação invertida (modificada de Taiz & Zeiger, 2010). 121

Figura 19: Estrutura parcial da hemicelulose xiloglicana (modificada de Taiz & Zeiger, 2010). 122

Figura 20: Estrutura parcial da pectina. A) rhamnogalacturonan; B) homogalacturonan (modificada Taiz & Zeiger, 2010). 123

Figura 21: Estrutura esquemática da celulose com enzimas celulolíticas. β -glicosidase (BGL), celobiohidrolase (CBH) e β -1,4-endoglucanase (Pérez et al., 2002). 126

Figura 22: Estrutura esquemática de duas hemiceluloses, xilana e xiloglicanas com enzimas hemicelulolíticas. ABF α -arabinofuranosidase; AFC α -frucosidase; AXE acetil esterase; AGU α -glucuronidase; AXH arabinoxilana α -arabinofuranohudrolase; AXL α -xilosidase; BLX β -1,4-xilosidase; FAE feruloil esterase; LAC β -1,4-galactosidade; XEG xiloglucana ativa β -1,4-endoglucanase; XLN β -1,4-endoxilanase (modificado Brink & Vries, 2011). 128

Figura 23: Estrutura esquemática de duas pectinas, ramnogalacturônica I e xilogalacturônica com enzimas pectinolíticas. ABF α -arabinofuranosidase; ABN endoarabinase; ABX exoarabinase; BLX β -1,4-xilosidase; FAE feruloil esterase; GAL β -1,4-endogalactanase; LAC β -1,4-galactosidade; RGAE ramnogalacturônico acetil esterase; RGL ramnogalacturônico liase; RGH endoramnogalacturonase; RGX exoramnogalacturonase; XGH engoxilo-galacturonase; XGX exoxilogalacturonase, α -ramnosidase (RHA) (modificado Brink & Vries, 2011). 129

Figura 24: Diagrama do bioensaio da análise do transcrito de *A. oryzae* BLU37 cultivado em culturas líquidas e semi-sólidas, usando bagaço de cana de açúcar e glicose como única fonte de carbono, em cultivos de 36 e 48 horas. 139

Figura 25: Diagrama da análise bioinformática do transcrito de *A. oryzae* BLU37 cultivado em culturas líquidas e semi-sólidas, usando o bagaço de cana de açúcar e glicose como única fonte de carbono, em cultivos de 36 e 48 horas. 145

Figura 26: Análise RefSeqGene Nucleotide Blast derivado de dados de alinhamento da sequência da região nuclear rDNA ITS1-5,8S-ITS2 de *A. oryzae* BLU36 (Query) contra a amostra de *A. oryzae* RIB40, mostrando a posição de 5 gaps e 98% de identidade entre as amostras..... 150

Figura 27: Perfil da atividade enzimática do secretoma de *A. oryzae* BLU37 cultivado em meio líquido com bagaço de cana de açúcar pré-tratado como única fonte de carbono. Quantificação da atividade de xilanase (losângulo azul), pectinase (quadrado vermelho), CMCase (triângulo verde), FPase (cruz roxo) e concentração de proteínas totais (círculo azul claro) foram medidas em triplicatas a partir de secretomas de 240 h com intervalos de 24 h..... 151

Figura 28: Perfil da atividade enzimática do secretoma de *A. oryzae* BLU37 cultivado em meio líquido com glicose como única fonte de carbono. Quantificação da atividade de xilanase (losângulo azul), pectinase (quadrado vermelho), CMCase (triângulo verde), FPase (cruz roxo) e concentração de proteínas totais (círculo azul claro) foram medidas em triplicatas a partir de secretomas de 240 h com intervalos de 24 h. 151

Figura 29: Comparação da integridade das amostras de RNA total extraídos com diferentes protocolos de extração de RNA. A). Canaletas 1 a 3: RNA total extraído com Concert® RNA Plant Reagent (Invitrogen); canaletas 4 e 5: RNA total extraído com TRIzol® Plus RNA Purification System (Ambion, USA); canaleta 6: marcador molecular 1 Kb DNA Ladder (New England BioLabs, USA). B). Canaletas 1 a 4: RNA total extraído com TRIzol® Plus RNA Purification System (Ambion, USA) com beads de metal em Fastprep-24™ (MP Biomedicals, USA). C). Canaletas 1 a 2: RNA total extraído com INVISORB Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex), com maceração de micélio baseado no uso de beads de metal e agitação mecânica no Fastprep-24™ (MP Biomedicals, USA). D). Canaletas 1 a 6: RNA total extraído com o método fenol quente (modificado de Ribeiro et al., 2007). E). Canaleta 1: marcador molecular 1 Kb DNA Ladder (New England BioLabs, USA); canaletas 2 a 6: RNA total extraído com o método fenol (Brasileiro & Carneiro, 1998). 153

Figura 30: Análise da integridade das amostras de RNA de *A. oryzae* extraído usando o método de Brasileiro & Carneiro (1998). A). Canaleta 1: Marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen); 2-7: RNA total de *A. oryzae* 36 horas pós inóculo, cultivado em MM com glicose, cultura semi-sólida. B). Canaleta 1: Marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen); ; 2-7: RNA total de *A. oryzae* 36 horas pós inóculo, cultivado em MM com bagaço de cana de açúcar, cultura líquida..... 154

Figura 31: Espectro de absorvância do RNA total observado usando espectrofotometria NanoDrop ND-1000 spectrophotometry. RNA total foi extraído de *A. oryzae* usando o método de Brasileiro & Carneiro (1998), 36 horas pós inóculo, cultivado em MM com bagaço de cana de açúcar, cultura líquida. OD A260/A280 = 1.79; OD A260/A230 = 2.08. 154

Figura 32: Avaliação da integridade de RNA total de *A. oryzae* pelo Bioanalyzer (Agilent Technologies). Um total de 16 amostras de RNA total representam os tratamentos encaminhados para sequenciamento. Cada tratamento foi conduzido em duplicata: *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana, cultura líquida, 36 horas; *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana, cultura líquida, 48 horas; *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana, cultura semi-sólida, 36 horas; *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana, cultura semi-sólida, 48 horas; *A. oryzae* cultivado em glicose, cultura líquida, 36 horas; *A. oryzae* cultivado em glicose, cultura líquida, 48 horas; *A. oryzae* cultivado em glicose, cultura semi-sólida, 36 horas; *A. oryzae* cultivado em glicose, cultura semi-sólida, 48 horas; A: Separação electroforética das amostras de RNA total pelo Bioanalyzer. O canaleta L corresponde ao marcador de tamanho de RNA e as canaletas numeradas a amostras de RNA total de *A. oryzae*. As duas bandas intensas correspondem ao rRNA 28S e 18S. B: Os picos correspondem a intensidades de fluorescência medidos durante a electroforese das amostras, com o eixo Y mostrando unidades de fluorescência e o eixo X mostrando tamanhos dos fragmentos de RNA em nucleotídeos. 156

Figura 33: Heatmap dos genes expressos nos tratamentos de *A. oryzae* LB36, LG36, LB48, LG48, SB36, SG36, SB48 e SG48. As comparações foram avaliadas de acordo com os valores de log2FoldChange de acordo com a fonte de carbono usada em cada tratamento. Padj aplicado < 0,01. 162

Figura 34: Heatmap dos genes expressos nos tratamentos de *A. oryzae* LB36, LB48, SB36, SB48. As comparações foram avaliadas de acordo com os valores de log2FoldChange de cada tratamento com bagaço de cana. Padj aplicado < 0,01..... 163

Figura 35: Heatmap dos genes expressos nos tratamentos de *A. oryzae* LG36, LG48, SG36, SG48. As comparações foram avaliadas de acordo com os valores de log2FoldChange de cada tratamento com glicose. Padj aplicado < 0,01. 163

Figura 37: Diagrama de Venn mostrando a distribuição do número de genes CAZy com expressão e co-expressão diferencial, com regulação positiva, de acordo com cada tratamento. Circulo vermelho contém os genes CAZy com expressão diferencial no tratamento em cultivo líquido com 36 horas após inóculo. Circulo azul contém os genes CAZy com expressão diferencial no tratamento em cultivo líquido com 48 horas após inóculo. Circulo roxo contém os genes CAZy com expressão diferencial no tratamento em cultivo semi-sólido com 36 horas após inóculo. Circulo verde contém os genes CAZy com expressão diferencial no tratamento em cultivo semi-sólido com 48 horas após inóculo. 166

Figura 36: Análise comparativa de dispersão dos genes relacionados a famílias CAZy, fatores de transcrição e não anotados. A: LB36 x LG36; B: LB48 x LG48; C: LB36 x LB48; D: LG36 x LG48; E: SB36 x SG36; F: SB48 x SG48; G: SB36 x SB48; H: SG36 x SG48; I: SB36 x LB36; J: SB48 x LB48; K: SG36 x LG36; L: SG48 x LG48. Cultural líquida (L), cultura semi-sólida (S), suplementado com bagaço de cana (B), suplementado com glicose (G), cultivo por 36h (36), cultivo por 48h (48). Pontos amarelos: genes da família CAZy GH, pontos verdes: genes da família CAZy CBM, pontos vermelhos: genes da família CAZy CE, pontos laranjas: genes da família CAZy GT, pontos azuis: genes da família CAZy PL, pontos roxos: fatores de transcrição, pontos cinzas: genes não anotados..... 167

LISTA DE ANEXOS

CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO MELECULAR DE *Aspergillus* AFLATOXIGÊNICOS

Anexo 1: Perfil de restrição da endonuclease Dral das espécies de *Aspergillus*. Tabela descreve nome da espécie e identificador Genbank, seguida pela tamanho do amplicon gerado pelos primers específicos ASP_GEN_MTSSU_F1 e ASP_GEN_MTSSU_R1, posição dos sítios de restrição para Dral, e tamanhos (pb) dos fragmentos após a digestão. Os 13 primeiros perfis, são de espécies de *Aspergillus* da seção Flavi aflatoxigênicos.88

CAPITULO 2: ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DE *Aspergillus oryzae* EM RELAÇÃO A DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR PRÉ-TRATADO

Anexo 2: Análise BLASTn derivado de dados de alinhamento da sequência de 573 pb da região nuclear rDNA ITS1-5,8S-ITS2 de *A. oryzae* BLU36 contra as sequências de fungos disponíveis no banco de dados do NCBI. 187

RESUMO GERAL

MIDORIKAWA, Gláucia Emy Okida. *Aspergillus* seção *Flavi*: Caracterização molecular de espécies aflatoxigênicas da castanha do Brasil e análise do transcrito de *Aspergillus oryzae* em relação a degradação enzimática do bagaço de cana. 2012. Páginas (120p). Tese de Doutorado em Biologia Molecular – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Fungos do Gênero *Aspergillus* da seção *Flavi* são conhecidos por compreenderem espécies com cabeça conidial entre o amarelo esverdeado à marrom e esclerótia escura. A taxonomia desse grupo é complexa e está evoluindo continuamente. Dois grupos têm sido descritos nessa seção: O primeiro composto pelas espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus pseudotamarii*, *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus parvisclerotigenus*, *Aspergillus arachidicola* e *Aspergillus minisclerotigenes*, conhecidos pela capacidade de produção de aflatoxinas; e a segunda composta por *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus tamarii* e *Aspergillus caelatus*, espécies que não produzem aflatoxinas.

Aflatoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por *Aspergilli* quando em condições de temperatura e umidade favoráveis. Contaminações da castanha do Brasil, castanha de caju e amendoim devem-se principalmente por fungos que produzem aflatoxinas, primariamente por espécies do grupo de *Aspergillus* da seção *Flavi*. O *A. oryzae* é uma espécie economicamente importante usado com um amplo espectro de aplicações tecnológicas em escala industrial. A preparação de produtos de alimentos fermentados e a produção de enzimas hidrolíticas que atuam na conversão da biomassa de resíduos agroindustriais como o bagaço de cana de açúcar, em açúcares fermentáveis, para a aplicação na produção do biocombustível de segunda geração são as suas principais aplicações. No nível molecular, *A. oryzae* é relacionado próximo à *A. flavus*. Esse trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um método de diagnóstico molecular para espécies aflatoxigênicas membro do grupo *Aspergillus* da seção *Flavi*, a investigação da diversidade nucleotídica de genes da via biossintética da aflatoxina de isolados de *A. flavus* em relação à produção de aflatoxina, e a caracterização do transcrito de *A. oryzae* BLU37, uma estirpe promissora para a produção de enzimas lignocelulolíticas. Isolados de fungos foram coletados a partir de castanha do Brasil, castanha de caju e amendoim contaminados através de quatro Estados brasileiros. Isolados pertencentes ao Gênero *Aspergillus* foram identificados baseados em sua morfologia. Uma identificação molecular foi conduzida pela análise da sequência da região rDNA ITS. Um método molecular para a identificação específica de membros produtores de aflatoxinas de *Aspergillus* da seção *Flavi*, os quais ocorrem na castanha do Brasil, foi desenvolvido por meio da digestão restritiva de amplicons da região mtDNA SSU rDNA. Um total de 80 isolados de *A. flavus* a partir da castanha do Brasil, castanha de caju e amendoim foram caracterizados quanto a aflatoxigenicidade quando submetidos a condições ambientais indutoras da produção de aflatoxina. Esses isolados foram cultivados por sete dias à 28°C em culturas semi-sólidas em meio YES, atividade de água 0,99 e analisados por meio de CLAE-FLD. Treze pares de *primers* foram desenhados com cobertura completa de três genes da

via biossintética de *A. flavus*. Os genes são: o fator de transcrição *afIR* e dois genes, *afIP* e *afIQ*, que codificam enzimas precursoras envolvidas na conversão da aflatoxina. Um total de 13 isolados produtores e 13 não produtores de aflatoxinas, previamente estabelecidos para a produção de aflatoxinas por CCD, tiveram o gene *afIR* parcialmente seqüenciado. A edição das sequências, alinhamento e identificação de polimorfismos SNP foi conduzida usando o programa Sequencher v4.8 (Gene Codes Corporation). A diversidade nucleotídica intra-específica baseada na frequência de SNP foi usada para definir haplótipos e desequilíbrio de ligação por meio do programa Tassel. Entender a diversidade nucleotídica entre *A. flavus* produtor e não produtor de aflatoxina é importante para o desenvolvimento de sistemas de diagnose molecular a serem aplicados em estratégias adequadas de prevenção e controle. Análise do transcrito do isolado *A. oryzae* BLU37 foi examinada a partir de culturas *in vitro* cultivadas em diferentes fontes de carbono. Uma suspensão de esporos a concentração final de 1×10^{10} esporos/mL foi usada para inocular culturas líquidas e semi-sólidas em meio mínimo e fonte específica de carbono [glucose 0,5% (w/v); bagaço de cana pré-tratado 0,5% (w/v) (pH 7,0)]. As culturas foram incubadas à 28°C por um período de 36 e 48 horas pós inóculo, totalizando oito tratamentos distintos, cada um conduzido em duplicata. Seguida o isolamento do RNA total a partir do micélio do fungo coletado, o isolamento do mRNA, preparo de enriquecimento das 16 bibliotecas de cDNA e *RNA-Seq* *Illumina* (www.Illumina.com) foram conduzidos em colaboração com a empresa *Eurofins MWG Operon* (Alabama, USA). Leituras processadas de qualidade foram mapeadas ao genoma de *A. oryzae* RIB40 (*National Research Institute of Brewing Stock Culture ATCC-42149*). Um total de 68,67 Gbases de dados de sequencias de qualidade processados foram gerados a partir de 16 bibliotecas de cDNA seqüenciadas, com uma média de 50,2 milhões de leituras de sequências por biblioteca e uma media de comprimento de leitura de 80,34 pb. O banco de dados CAZy (<http://www.cazy.org/>) foi empregado de modo a definir todas as hidrolases glicosídicas (GHs), Glicosil Transferases (GT), polissacarídeo liases (PLs), carboidrato esterases (CEs) e Módulos de Ligação a Carboidratos (CBM) expressas por *A. oryzae* BLU37 sob os diferentes tratamentos. Um total de 202 genes pertencentes às famílias CAZy foram encontrados. A partir do banco de dados *Fungal Transcription Factor Database* (<http://ftfd.snu.ac.kr/index.php?a=view>), 44 genes pertencentes à cinco famílias de fator de transcrição, foram encontrados. Esse estudo contribuirá para o entendimento da complexidade do transcrito de *A. oryzae*, um fungo de importância para produção de enzimas com um amplo espectro de aplicações tecnológicas, principalmente para a aplicação desse fungo no desenvolvimento de biocombustível de segunda geração a partir de resíduos agroindustriais.

Palavras – chave: *Aspergillus flavus*, aflatoxina, SNP, *Aspergillus oryzae*, bagaço de cana, transcrito, RNA-Seq, *Illumina*.

Orientador – Robert Neil Gerard Miller – Universidade de Brasília.

GENERAL ABSTRACT

MIDORIKAWA, Gláucia Emy Okida. *Aspergillus* section *Flavi*: Molecular characterization of aflatoxigenic species in brazil nut and analysis of the transcriptome in *Aspergillus oryzae* in relation to enzymatic degradation of sugarcane bagasse. 2012. Páginas. Thesis (Doctorate in Molecular Biology) – Universidade de Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

Aspergillus section *Flavi* comprises species with conidial heads from yellow-green to brown and dark sclerotia. The taxonomy of this group is complex and continually evolving. Two groups have been described in this section: The first consists of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus pseudotamarii*, *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus parvisclerotigenus*, *Aspergillus arachidicola* and *Aspergillus minisclerotigenes*, which are producers of aflatoxins, and the second comprises *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus tamarai* and *Aspergillus caelatus*, which are aflatoxin non-producing species. Aflatoxins are toxic secondary metabolites produced by *aspergilli* when under favorable moisture and temperature conditions. Contamination of Brazil nuts is mainly by fungi that produce aflatoxins, primarily by species within *Aspergillus* section *Flavi*. *A. oryzae* is an economically important fungus used in a wide range of technological applications on industrial scales. Its main applications comprise the preparation of fermented food products and the production of hydrolytic enzymes that act in the conversion of agro-industrial residues, such as sugar cane bagasse, into fermentable sugars for the production of second generation biofuel. At the molecular level, *A. oryzae* is classified next to *A. flavus*. The aims of this study are to develop a molecular diagnostic method for aflatoxigenic member species of *Aspergillus* section *Flavi*, to investigate the nucleotide diversity in aflatoxin biosynthetic pathway genes in *A. flavus* strains contrasting in aflatoxin production, and to characterize the transcriptome of *A. oryzae* BLU37, a promising fungal strain for the production of lignocellulolytic enzymes. Fungal isolates were collected from contaminated Brazil nut, cashew and peanut materials across a number of states in Brazil. Isolates belonging to the genus *Aspergillus* were identified through morphological examination. Molecular-based identification was conducted by sequence analysis of rDNA ITS regions. A molecular-based method for specific identification of aflatoxin-producing members of the *Aspergillus* section *Flavi* which occur in contaminated nuts in Brazil was developed through restriction digestion of mtDNA SSU rDNA region amplicons. A total of 80 isolates of *A. flavus* from Brazil nut and cashew nut were characterized for aflatoxin production when exposed to environmental conditions that induce the production of aflatoxin. These strains were cultured for seven days at 28°C in semi-solid culture medium YES, water activity 0.99 and analyzed by HPLC - FLD. Thirteen overlapping primers pairs were designed for complete coverage of aflatoxin biosynthesis genes in *A. flavus*, namely the transcription factor *afIR*, and the genes *afIP* and *afIQ*, which code for enzymes involved in conversion of aflatoxin precursors. For a total of 13 aflatoxin producing and 13 non-producing isolates, previously characterized for aflatoxin production by TLC, the *afIR* gene was partially sequenced. Sequence editing, alignment and SNP polymorphism identification was conducted using Sequencher v4.8 program (Gene Codes Corporation). Intra-specific nucleotide diversity based on SNP frequency was used for defining haplotypes and linkage

disequilibrium with the program Tassel. Understanding of nucleotide diversity between *A. flavus* aflatoxin producers and non-producers is important for development of a molecular diagnostic system for application in appropriate strategies for mycotoxin prevention and control. Transcriptome analysis of *A. oryzae* strain BLU37 was examined from in-vitro cultures grown on different carbon sources. *A. oryzae* spore suspensions at a final concentration of 1×10^{10} sporos/mL were used to inoculate semi-solid and liquid media cultures containing a minimal medium plus specific carbon source [glucose 0.5% (w/v); pre-treated sugarcane bagasse (pH 7.0) 0,5% (w/v)]. Cultures were incubated at 28°C over a time-course of 36 h and 48 h, totaling eight distinct treatments, each carried out in duplicate. Following total RNA isolation from harvested fungal mycelia, messenger RNA isolation, full-length enriched cDNA library preparation and Illumina RNAseq (www.Illumina.com) was carried out in collaboration with Eurofins MWG Operon (Alabama, USA). Quality-trimmed reads were mapped to the *A. oryzae* RIB40 genome (National Research Institute of Brewing Stock Culture ATCC-42149). A total of 68.67 Gbases of quality-trimmed sequence data was generated from 16 sequenced cDNA libraries, with an average of 50.2 million reads per library and a mean read length of 80.34 bp. The CarbohydrateActive Enzyme database (CAZy - <http://www.cazy.org/>) was employed in order to identify all glycoside hydrolases (GHs), glycosyl transferases (GT), polysaccharide lyases (PLs), carbohydrate esterases (CEs) and Carbohydrate-Binding Modules (CBM) expressed by *A. oryzae* under growth condition treatments. A total of 202 genes belonging to CAZy families were found. The Fungal Transcription Factor Database (<http://fffd.snu.ac.kr/index.php?a=view>), identified 44 genes belonging to 5 transcription factor families. This study will contribute to understand the complexity of the *A. oryzae* BLU37 transcriptome, an importance fungus for production of enzymes that have a wide range of technological applications, particularly in development of second generation biofuels from agro-industrial wastes.

Keywords: *Aspergillus flavus*, aflatoxin, SNP, *Aspergillus oryzae*, transcriptome, RNA-Seq, Illumina, sugarcane bagasse,

Supervisor: Robert Neil Gerard Miller – Universidade de Brasília.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Aspergillus*: Seção *Flavi*

No mundo são conhecidas mais de 100 mil espécies de fungos, tendo o Gênero *Aspergillus* um grupo muito importante por serem amplamente distribuídos, possuem papel importante para o ecossistema e economia humana. Atualmente são conhecidos mais de 200 espécies do gênero *Aspergillus*.

A taxonomia do grupo *Aspergillus* da seção *Flavi* é complexa e está evoluindo continuamente. Os fungos dessa seção são subdivididos em duas classes baseado nos seus efeitos sob alimentos e saúde humana. A primeira classe é a de espécies produtoras de aflatoxinas, metabólitos secundários tóxicos que algumas espécies de fungos produzem quando sob condições de umidade e temperatura favoráveis. Incluem a essa classe o *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus pseudotamarii*, *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus parvisclerotigenus*, *Aspergillus arachidicola* e *Aspergillus minisclerotigenes*. *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* são as mais encontradas em alimentos como castanha do Brasil, amendoim, arroz, trigo, causando grandes prejuízos à agricultura. A segunda classe é a de espécies não produtoras de aflatoxinas como, o *Aspergillus sojae*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tamarii* e *Aspergillus caelatus*. O *A. oryzae* e *A. sojae* são espécies economicamente importantes usadas na preparação de produtos de alimentos fermentados. No nível molecular, *A. oryzae* e *A. sojae* são relacionados próximos à *A. flavus* e *A. parasiticus*, respectivamente, diferindo principalmente, na habilidade de produção da aflatoxina (Gêiser et al., 1998).

As aflatoxinas produzidas por *Aspergillus* da seção *Flavi* são diferenciadas em aflatoxina B1, B2, G1 e G2, onde todas têm sido detectadas em castanha do Brasil. *A. flavus* comumente produz AFB1 e AFB2, enquanto as outras espécies aflatoxigênicas produzem os quatro tipos citados. Atualmente há controvérsias quanto as espécies que mais contribuem para produção de aflatoxinas em castanha do Brasil (Freitas-Silva & Venancio, 2011). Apesar de *A. flavus* ser descrito como o fungo dominante em castanha do Brasil (Freire et al. 2000, Arrus et al. 2005), de acordo com Olsen et al (2008), *A. flavus* não é o principal produtor de aflatoxinas contaminante de castanha do Brasil. Evidências mostram que *A. nomius* também é um produtor importante. Essa controvérsia é devido a dificuldade na identificação da espécie do fungo.

Espécies membro do grupo *Aspergillus* seção *Flavi* historicamente compreendem espécies com cabeça conidial entre o amarelo esverdeado à marrom e esclerócio escura. Características baseada em métodos tradicionais como os parâmetros morfológicos, incluindo diâmetro da colônia, cor e textura, tamanho e textura do conídio e estrutura do conidióforo (Klich, 2002) também são consideradas para a classificação das espécies

membro *Aspergillus* seção *Flavi*. Entretanto, a classificação das espécies tem se tornado difícil devido a divergências entre as características morfológicas produzidas por um alto nível de variabilidade genética (Kumeda & Asao 1996). Apesar da investigação intensa, a taxonomia desse grupo é ainda complexa. Estudos mostram que diversas espécies classificadas na seção *Flavi* não podem ser diferenciadas baseada somente nas características morfológicas (Frisvad et al. 2005, Pildain et al. 2008). Godet & Munaut (2010), descreveram uma estratégia molecular de seis passos usando análises em PCR em tempo real, padrões de RAPD e perfis de restrição do DNA genômico com a enzima *SmaI* baseado nos genes *afIT*, *afIR*, regiões do rDNA ITS e gene da calmodulina. Essa estratégia identificou nove de onze espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi*, incluindo *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sojae*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. nomius*, *A. arachidicola* e *A. parvisclerotigenus*, porém os autores reconhecem que a composição das espécies membro da seção *Flavi* ainda é taxonomicamente incerta. Análise filogenética também tem sido usada para resolver a taxonomia da seção *Flavi* (Varga et al., 2011). Nesse estudo análise baseada em dados de sequências de porções dos genes da calmodulina e região nuclear rDNA ITS revelaram 7 clados principais que compõem a seção *Flavi* com 20 ou mais taxas. São os clados: *A. flavus*, *A. tamarii*, *A. nomius*, *A. alliaceus*, *A. togoensis*, *A. leporis* e *A. avenaceus*. Entretanto, as relações filogenéticas quando comparados os dados de sequências de porções dos genes calmodulina, β -tubulina e região nuclear rDNA ITS, mostraram-se inconsistentes, mantendo a resolução do grupo da seção *Flavi* ainda problemática.

1.2 *A. flavus* X *A. oryzae*

O clado "*A. flavus*" é composto por *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. fasciculatus*, *A. subolivaceus*, *A. thomii*, *A. kambarensis*, *A. minisclerotigenes*, *A. parvisclerotigenus*, *A. arachidicola*, *A. parasiticus*, *A. sojae* e *A. toxicarius* (Varga et al., 2011). Espécies caracterizadas com a Q-10(H₂) como ubiquinona principal, coloração conidial entre os tons de verde, e produção de esclerócio escuro por diversos isolados. O *A. flavus* é a espécie aflatoxigênica mais comum, com ocorrência em diversos alimentos de países tropicais (Sargeant, et al., 1961).

A. flavus possui uma população genética e fenotípica diversa (Geiser et al. 2000). Um exemplo, são variações de de *A. flavus* relacionadas com o tamanho do esclerócio. Conhecidas como forma de reprodução de fungos, o esclerócio, é uma massa rígida de micélio que permanecem no solo até que as condições ambientais estejam favoráveis para o seu crescimento. Uma amostra tipo de *A. flavus* produz esclerótia grande (L) com tamanho maior que 400 μ m, enquanto a variedade, produz esclerótia pequena (S) com tamanho menor que 400 μ m. Diferenças quanto ao tamanho da esclerótia, podem influenciar nos níveis de produção de aflatoxinas. Alguns isolados produzem conídios abundantemente,

esclerócio L, e níveis de aflatoxinas variável, enquanto outros isolados produzem esclerócio S abundantemente, poucos conídios e níveis altos de aflatoxinas (Cotty, 1989).

Um tipo relacionado ao *A. flavus*, é o *A. oryzae*. Essa espécie é atoxigênica e tem sido muito usada como cultura iniciadora para o preparo do koji na produção de alimentos e bebidas fermentadas tradicionais da cultura Oriental como, miso, molho shoyo e sake. Também possui papel importante como fonte de diversas enzimas hidrolíticas industriais. *A. flavus*, classificado como espécie distinta porém geneticamente similar a *A. oryzae*, não é usada em aplicações comerciais principalmente devido a sua capacidade de produção de aflatoxinas (Chang & Ehrlich, 2010). Devido a sua importância econômica e segurança alimentar, o *A. oryzae* é classificado como táxon separado de *A. flavus*. A longa história de uso seguro de *A. oryzae* pela indústria de fermentação de alimentos e a falta de produção de aflatoxina, garantiu o status *GRAS* (*Generally Recognized as Safe*) de *A. oryzae*.

A análise comparativa dos genomas de *A. flavus* NRRL3357 e *A. oryzae* RIB40 mostrou que ambos possuem tamanho de 37 Mb, são organizados em oito cromossomos, codificam aproximadamente 12.074 proteínas e são notavelmente similares (Machida et al., 2005; Payne et al., 2006). A análise comparativa também revelou 43 genes exclusivos de *A. flavus* e 129 genes exclusivos de *A. oryzae*. Apenas 709 genes foram identificados como exclusivamente polimórfico entre as duas espécies (Georgianna and Payne, 2009).

A inabilidade de produzir aflatoxinas por isolados de *A. oryzae* deve-se a várias mutações no grupo de genes da via biossintética de aflatoxinas. Em particular, pela falta ou diferença significativa do gene *afIR* de *A. oryzae* (Lee et al. 2006).

Amostras de *A. oryzae* podem ser classificadas em três grupos de acordo com a estrutura do grupo de genes da biossíntese de aflatoxinas (Tominaga et al., 2006). No grupo 1 são incluídos isolados que possuem todos os genes ortólogos da biossíntese de aflatoxinas, no grupo 2 são incluídos isolados que possuem deleção além da região do gene *ver-1*, ou seja, deleção dos genes *afIM*, *afIN*, *afIO*, *afIP* e *afIQ*, e no grupo 3 incluem os isolados que possuem parte do grupo de genes para síntese de aflatoxinas, deleção dos genes *afIK*, *afIL*, *afIM*, *afIN*, *afIO*, *afIP* e *afIQ*. Apesar dos isolados do grupo 1 possuírem o genes necessários para a síntese de aflatoxinas, o nível de expressão do gene regulador *afIR* é baixa e há a falta de expressão de diversos genes como, *afIG*, *afIK*, *afIL*, *afIP*. Estudos também têm mostrado que substituições de aminoácidos no gene *afIJ*, induzem a inativação a nível protéico (Kiyota et al., 2011).

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS* AFLATOXIGÊNICOS

1 INTRODUÇÃO

1.1 Micotoxinas e seu impacto na agricultura e saúde humana

Alimentos como grãos e seus derivados são extremamente suscetíveis a contaminação por fungos em todo o mundo. Alguns destes fungos que contaminam os alimentos, também são produtores de micotoxinas. As micotoxinas são definidas como pequenas moléculas de baixo peso molecular e são produtos naturais do metabolismo secundário de fungos filamentosos. Esses metabólitos constituem um conjunto toxigênico de diferentes classes químicas tóxico a vertebrados e outros grupos de animais mesmo em baixas concentrações (Bennett, 1987). As micotoxinas variam em grau de severidade, podendo alguns fungos produzir toxinas letais e outros produzirem toxinas que não apresentam tanto impacto na saúde humana e animal.

O termo micotoxina surgiu em 1960 em uma crise veterinária incomum nos arredores de Londres, Inglaterra, onde cerca de 100.000 aves morreram (Blout, 1961; Forgacs, 1962). Essa misteriosa doença foi ligada a alimentação com amendoim contaminado com o metabólito secundário de *A. flavus*, a aflatoxina. O acontecido sensibilizou cientistas na possibilidade de outros metabólitos de fungos serem mortais. Logo um grande número de toxinas de fungos previamente conhecidos foram incluídas no grupo das micotoxinas.

Mais de 300 micotoxinas já foram relatadas (Jestoi et al., 2004). Entretanto, baseado em extensivos estudos analíticos e estudos detalhados da distribuição desses fungos na natureza, a IARC (*International Agency for Research on Cancer*) determinou cinco toxinas importantes para a agricultura. As toxinas determinadas pela IARC são as aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, zearalenona e deoxinivalenol (tricotecenos). Além de serem carcinogênicas, essas toxinas também são imunossupressores, neurotoxigênicos e nefrotoxigênicos. As aflatoxinas produzidas por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* usam como substrato castanhas e amendoim. Já as fumonisinas produzidas por *Fusarium moliniforme*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium globosum*, usam como substrato milho, trigo, cereais. As ocratoxinas produzidas por *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*, usam como substrato café, uvas, milho. As zearalenonas que são produzidas por *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* e *Fusarium sporotrichioides*, são normalmente encontrados em milho, sorgo, trigo. O deoxinivalenol produzido por *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* e *Fusarium sporotrichioides* utilizam o trigo, milho, cevada como substratos (Cast, 2003).

As micotoxinas geralmente aparecem na cadeia alimentar do homem, tendo início da contaminação do alimento pelo fungo produtor da toxina na lavoura. Fungos micotoxigenicos usam os grãos como fonte de alimento e liberam enzimas para a degradação do substrato. O resultado é a degradação dos grãos e perda do valor nutricional. Práticas de prevenção e controle da contaminação de fungos micotoxigênicos em lavouras são de grande importância para a obtenção de produtos agrícolas livres de micotoxinas, onde a exposição a micotoxinas

é mais provável de ocorrer em lugares em que os métodos de manipulação e armazenamento de alimentos são precários, lugares que haja a desnutrição e lugares que existam poucos regulamentos para proteger a população exposta a esse tipo de contaminação.

De acordo com FAO, (2009) perdas econômicas significantes estão associadas com impactos na saúde humana, produtividade animal, e o comércio nacional e internacional. Estima-se que 25% da agricultura mundial é afetada por fungos produtores de micotoxinas, o que gera uma perda global, em termos de produção, de 1 bilhão de toneladas por ano. Os Estados Unidos, por exemplo, possuem perdas anuais de culturas, como milho, cereais e castanhas, que somam aproximadamente US\$ 1 bilhão ao ano (Cast, 2003). Já no Brasil, cerca de 45% da produção de milho é contaminada por micotoxinas, representando uma perda de 14 a 16 milhões de toneladas ao ano (CIB, 2004, jornal Embrapa milho e sorgo, 2012 - <http://grao.cnpms.embrapa.br>). Contaminação de grãos por aflatoxinas resulta em perdas anuais de mais de 750 milhões de dólares na África, sendo um dos grandes problemas econômicos e de saúde (Goyal et al., 2003).

Além de perdas na agricultura, alguns casos de doenças associados à micotoxinas incluem hepatite aflatoxigênica no Kênia em 2004/2005, ergotismo entérico na Índia, ergotismo vascular na Etiópia e micotoxicose deoxinivalenol na Índia e China (Alemu et al., 2008; Bhat & Miller 2010). As micotoxinas têm atraído a atenção mundial devido a perdas significativas associadas com o seu impacto na saúde humana e animal, e conseqüente implicações econômicas.

1.2 Aflatoxinas

As aflatoxinas comumente produzidas por *A. flavus*, *A. parasiticus* (Codner et al. 1963), *A. nomius* (Kurtzman et al. 1987), *A. pseudotamarii* (Ito et al. 2001), *A. bombycis* (Peterson et al. 2001), *A. parvisclerotigenus* (Saito and Tsurota 1993) *A. arachidicola* e *A. minisclerotigenes* (Pildain et al. 2008), são normalmente encontradas em castanhas, amendoins, trigo, arroz ou qualquer outro substrato em que o fungo possua afinidade (Geiser et al. 1998). Quatro formas principais de aflatoxinas são conhecidas, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, e outras formas hidroxiladas derivadas da AFB1 como a AFM1 e AFM2, respectivamente (Fonseca, 2008).

Populações de países em desenvolvimento são as mais suscetíveis à doenças por aflatoxicoses devido a falta de severidade no controle de alimentos agrícola, leite e derivados. É estimado que mais de cinco bilhões de pessoas no mundo, que vivem em países em desenvolvimento, estão em risco de exposição crônica a aflatoxinas por meio de alimentos (Shephard, 2003). A aflatoxicose pode ser causada pela ingestão de aflatoxina e por inalação de esporos. É dividida em duas formas, aguda e crônica. A forma aguda, é produzida quando níveis moderado a alto de aflatoxinas são consumidos. O fígado é o primeiro órgão a ser atingido quando ingerida a aflatoxina B₁. Os sintomas são normalmente

manifestados por hepatotoxicidade, onde a exposição a altos níveis podem progredir para hepatite letal (Strosnider et al., 2006). A ingestão de baixos à moderados níveis de aflatoxinas causam a aflatoxicose crônica. Os efeitos geralmente são subclínicos e difíceis de serem reconhecidos. Entretanto, a exposição crônica a AFB₁ resulta em aumento a suscetibilidade a infecções, afetando pulmões e todo o sistema respiratório (Kelly et al., 1997). Hepatocarcinoma em humanos está geralmente associada à infecções dos vírus que causam hepatite dos tipos B (HBV) e C (HCV) (Wild et al., 1992; Peers et al., 1987; Henry et al., 2002; Omer et al., 2004). Em conjunto com as aflatoxinas, esses vírus aumentam significativamente o risco de hepatocarcinoma em pacientes com hepatite.

Os efeitos do consumo de aflatoxinas por animais é similar para todas as espécies, porém a suscetibilidade varia de acordo com a espécie, idade e variação individual. Estudo dos sintomas clínicos da aflatoxicose em suínos, variaram em função da quantidade da toxina ingerida. A ingestão de níveis menores que 100 ppb (partes por bilhão) não levou à apresentação de sinais clínicos, mas o abate revelou presença de resíduos da toxina no fígado do animal. A ingestão de 200 a 400 ppb resultou em disfunção hepática e imunodepressão. E a ingestão de 400 a 800 ppb levou à redução do crescimento, diminuição do consumo de alimento, icterícia, hipoproteinemia e pêlo arrepiado. Já níveis de 1.200 a 2.000 ppb induziram a icterícia, hemorragias subcutâneas, coagulopatia, depressão, anorexia e algumas mortes. A ingestão acima de 2.000 ppb resultou em insuficiência hepática, hemorragias e morte em três a dez dias (<http://www.sct.embrapa.br/>).

Em modelos de animais, durante a detoxificação pelo cotocromo P450 monooxigenase no fígado, a AFB₁ é modificada em um produto mais tóxico e carcinogênico (Eaton & Gallagher, 1994; Lewis et al., 2005). A forma epóxido de aflatoxina B₁ e exo-epóxidos AFB₁ se ligam a resíduos de guanina do DNA. Essa ligação forma adutos guanil-N7 e induz a mutações. A transversão de G para T na terceira base do codon 249, resulta em uma mutação no gene p53 supressor de tumor e associado ao mecanismo de iniciação da formação de hepatocarcinoma. O gene p53 codifica um fator de transcrição envolvido na regulação do ciclo celular e é normalmente mutado (AGG para AGT) em casos de cancer de fígado em humanos (Hsu et al., 1991; Groopman et al., 1994). Essa mutação é considerada uma assinatura a exposição a aflatoxinas.

Do ponto de vista micológico, existem grandes diferenças qualitativas e quantitativas nas habilidades toxigênicas apresentadas por diferentes isolados dentro de cada espécie aflatoxigênica. Dos isolados de *A. flavus*, somente metade produzem aflatoxinas (Klich, & Pitt, 1988.), enquanto os que produzem, podem produzir mais de 10⁶ µg/kg (Cotty et al., 1994). Variações nos níveis de produção da aflatoxina também é associada com os grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs), onde somente aqueles isolados com compatibilidade het (heterocariótica) loci podem formar fusões de hifas estáveis (Bayman & Cotty, 1991; Tran-Dinh, 1999). Níveis de aflatoxinas parecem ser estáveis dentro de VCGs e identificação de VCGs aflatoxigênicos tem sido importante para o desenvolvimento de agentes de controles biológicos (Donner et al., 2010).

Para minimizar a potencial exposição a aflatoxinas, muitos países têm estabelecido leis que especificam os limites aceitáveis de aflatoxinas em diversos alimentos. No Brasil, para alimentos de consumo humano, o Ministério da Saúde estabelece através da Resolução RDC nº 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002 que, para amendoim com casca, descascado, cru ou tostado, e para pasta de amendoim ou manteiga de amendoim, o limite máximo para a presença de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ é de 20µg/kg (ppb). A mesma concentração se aplica para milho em grão inteiro, partido, amassado, moído, farinhas e sêmolos. Já para leite fluido, o limite máximo é de 0,5 µg/kg (ppb), enquanto que para o leite em pó, o limite é de 5µg/kg (ppb). Entretanto, em agosto de 2011, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou no Diário Oficial da União a Instrução Normativa N°25 que define os limites máximos de contaminantes tolerados, reduziu o limite de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ tolerados para 10µg/kg (ppb) em castanha do Brasil. Os produtos alimentícios que não constam nessa Instrução Normativa, prevalece a legislação de 1974 do Ministério da Saúde, onde o limite tolerado de AFB₁ e AFG₁ é de 30µg/kg (ppb). Alimentos de consumo animal como matéria prima e rações, o MAPA estabelece limite máximo tolerado de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ de 50µg/kg (ppb).

Países integrantes do MERCOSUL, possuem legislação comum a todos os países, de limite máximo para a presença de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ de 20µg/kg (ppb). Entretanto, a Comissão Européia estabelece limites para amendoins após processamento de 15 ppb para aflatoxinas totais e 8 ppb para AFB₁. Para castanhas e frutas secas processadas, é estabelecido limite de 10 ppb para aflatoxinas totais e 5 ppb para AFB₁. Os padrões de limite para cereais, frutas secas e castanhas destinadas ao consumo humano direto são ainda mais restritos, sendo o limite de aflatoxinas totais de 4 ppb e 2 ppb de AFB₁ (Van Egmond & Jonker, 2005). Após a União Européia ter estabelecidos esses limites de aflatoxinas totais, em 2003, a importação, procedente do Brasil, da castanha do Brasil com casca, resultou em uma queda de 91,78% nas exportações brasileiras (Bittencourt et al., 2012).

Devido às restrições que limitam o comércio de culturas contaminadas, a contaminação de aflatoxinas dos produtos agrícolas não é apenas um problema de segurança alimentar grave, mas também possuem implicações econômicas significativas para a indústria agrícola em todo o mundo.

1.3 Importância das culturas de castanha-do-Brasil, castanha de cajú e amendoim para o Brasil

Apesar da grande produção, o Brasil é um dos principais países que tem grande porcentagem de seus produtos agrícolas contaminados por fungos produtores de aflatoxinas. Esta contaminação se dá devido às formas inadequadas de manejo e baixo valor agregado ao produto, impossibilitando a melhoria de técnicas de manejo.

Um dos principais produtos que apresentam grande porcentagem de contaminação por fungos produtores de aflatoxinas é a castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), também conhecida como castanha do Pará. É o fruto de uma das árvores mais altas e importantes da floresta Amazônica. Possui ocorrência em todo o Estado nativo da região amazônica, sendo os Estados do Acre, Amazonas, Amapá, Rondônia e Pará os principais produtores brasileiros.

A castanha do Brasil é o primeiro produto extrativista em importância para as comunidades que vivem na Amazônia, onde somente nos quatro primeiros meses de 2012 atingiu 4.940 toneladas exportadas para Europa e Estados Unidos, gerando um receita de U\$ 6,5 milhões. Atualmente, o Brasil é o segundo país que mais exporta a castanha-do-Brasil. Sua produtividade é de aproximadamente 30 mil toneladas anuais, perdendo semente para a Bolívia, que possui produtividade anual de 50 mil toneladas e sendo o maior exportador do mundo (CONAB, 2013).

Apesar de ser grande exportador, o Brasil possui grande incidência de infecção fúngica e altos níveis de aflatoxinas em suas amêndoas (Freire *et al.*, 2000; Pacheco & Scussel, 2007). Devido a alta incidência de infecção por fungos produtores de aflatoxinas, perdas anuais da castanha-do-Brasil em países em desenvolvimento, como o Brasil, provocam uma redução na economia do país devido a não aceitação dos produtos que excedem os limites regulamentares de micotoxinas pelo mercado estrangeiro. Além de afetar a economia do país, as amêndoas que são rejeitadas pelo mercado externo são vendidas no mercado interno, o que aumenta o risco de contaminação por micotoxinas pela população brasileira.

Países produtores como, a Bolívia, Peru e Brasil, têm implementado restrições para evitar a contaminação por aflatoxinas das castanhas do Brasil com intuito de estarem de acordo com as exigências dos padrões sanitários internacionais e fortalecer o mercado de exportação. Um exemplo é o projeto *Safenut* coordenado pela União Européia. Esse projeto tem o intuito de validar métodos de análise fáceis e confiáveis para a detecção de níveis de aflatoxinas em indústrias (STDF 2008). Tecnologias de boas práticas de manejo que melhoram a qualidade da castanha do Brasil também tem sido aplicadas pela Embrapa Acre desde 2000, orientando extrativistas do Acre para a adoção de cuidados simples que conferem a qualidade do produto.

Outro produto agrícola que possui grande porcentagem de contaminação por fungos produtores de aflatoxinas é o amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.). A produção agrícola do amendoim cobre uma área mundial de 25,5 milhões de hectares, com produção global de aproximadamente 37 milhões de toneladas na safra de 2012/2013 (CONAB, 2013). É uma das seis principais culturas oleaginosas cultivadas em todo mundo, sendo uma importante fonte de proteína vegetal comestível (FAO, 2008).

O gênero *Arachis* tem seu centro de origem na América do Sul, mas a maior produção da cultura encontra-se na China, com 16 mil toneladas, Índia, com 5.800 toneladas e Estados Unidos, com 2.139 toneladas em 2012/2013 (CONAB, 2013). No Brasil, o amendoim é

produzido em todo o território brasileiro principalmente em regiões semi-áridas. Cobre uma área de mais de 101 mil hectares, chegando a produzir cerca de 300 mil toneladas na safra de 2012/2013 (CONAB, 2013), onde aproximadamente 38 mil toneladas são exportadas e/ou destinadas para a indústria de alimentos (SECEX, 2011). No nordeste do Brasil, onde a produção é tipicamente de agricultura familiar e sujeita às típicas variações no regime de chuvas, o amendoim é mais suscetível à contaminação por aflatoxina na etapa de pré colheita. A contaminação por fungos produtores de aflatoxinas é responsável por perdas de até 50% em cultivares não resistentes em todo o mundo (Meena *et al.*, 2002). Análises nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, apresentaram 27% e 49%, respectivamente, de suas amostras contaminadas por mais de 30µg/kg (ppb) de aflatoxinas totais (IAPAR, 2009).

A castanha de caju, fruto do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), é um dos cultivos mais importantes da região nordeste do Brasil. A estimativa do IBGE para a safra de 2012/2013 é que sejam produzidas cerca de 306.509 toneladas de castanha de caju, em uma área de 770.691 hectares (CONAB, 2013). O Nordeste possui 95% da produção nacional entre os Estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, onde 85% das exportações brasileiras são destinadas para os Estados Unidos, Holanda e Canadá (SECEX, 2012). O Brasil é o sétimo maior produtor mundial de castanha de caju, sendo a Nigéria, Índia e Costa do Marfim classificados como os três maiores produtores, respectivamente.

Apesar da castanha de caju não ser um hospedeiro frequente de *A. flavus*, autores têm descrito a ocorrência dessa espécie em castanha de caju. Freire *et al.* (1996) relatou a presença da aflatoxina G1 em castanha de caju. Já em outro trabalho, Freire & Kozakiewicz (2005) descrevem a presença de *A. flavus* em castanha de caju e consequentemente levando a perda econômica desse fruto.

A cultura do cajueiro é de grande importância social para o Brasil gerando cerca de 300 mil empregos. A produção ocorre no período seco, na entressafra das demais espécies cultivadas, o que lhe confere papel estratégico na redução da sazonalidade na renda e na ocupação da mão de obra.

1.4 Processo de infecção do *A. flavus*

A. flavus é um fungo filamentososaprófito, que alimenta-se absorvendo substâncias orgânicas. Seus pequenos esporos e habilidade de crescimento a 37°C favorecem a patogenicidade em animais e humanos. Entretanto, o *A. flavus* é predominantemente associado a patogenicidade em plantas como, milho, castanhas, amendoim, algodão, assim como outros cultivos e produtos agrícolas (Chang & Ehrlich, 2010).

A contaminação do *Aspergillus* aflatoxigênico pode ocorrer durante os estágios de pré e pós colheita. Condições ambientais e práticas de manejo durante a colheita, beneficiamento e armazenamento podem afetar na contaminação, uma vez que o solo é umas das grandes fontes de inóculo do *A. flavus* (Gonzalez *et al.*, 2008). O ciclo celular do *A. flavus* presente no solo, em sua fase assexuada, se dá a partir da germinação dos conídios

em um substrato adequado. As hifas somáticas são formadas, seguida da formação dos aparelhos de conidiação, compostos por conidióforo, vesícula, filíade e conídio. A fase sexuada do *A. flavus* inicia a plasmogamia, a fusão do ascogônio e anterídeo por meiose, e forma o ascos. A plasmogamia resulta em ascos diplóides (2n), seguida de divisão meiótica (n) e mitótica. Os ascósporos são liberados no meio, dando início à germinação (figura 1a). *A. flavus* foi descrito por Link em 1809 e é conhecido por ser uma espécie que só produz esporos, conídios e esclerócios assexuados. Recentemente, a fase sexual, teleomórfica, de *A. flavus* foi descrita e classificada como *Petromyces flavus* (Horn, 2009) (figura 1b e c).

Duas condições importantes significativas para a infecção por *A. flavus* e a produção da aflatoxina são a temperatura e a umidade do meio. A temperatura do ambiente está relacionada tanto com a reprodução e crescimento (12-48°C), quanto com a produção de aflatoxinas (25-30°C) pelo *A. flavus* (Klich et al., 1994). A combinação entre temperatura e estresse hídrico (15-32%), levam a altos níveis de produção da aflatoxina pelo *A. flavus* (Payne, 1998). Essa habilidade de se manter em substratos com estresse hídrico favorece o crescimento de *A. flavus* sob outros fungos, aumentando a sua competitividade.

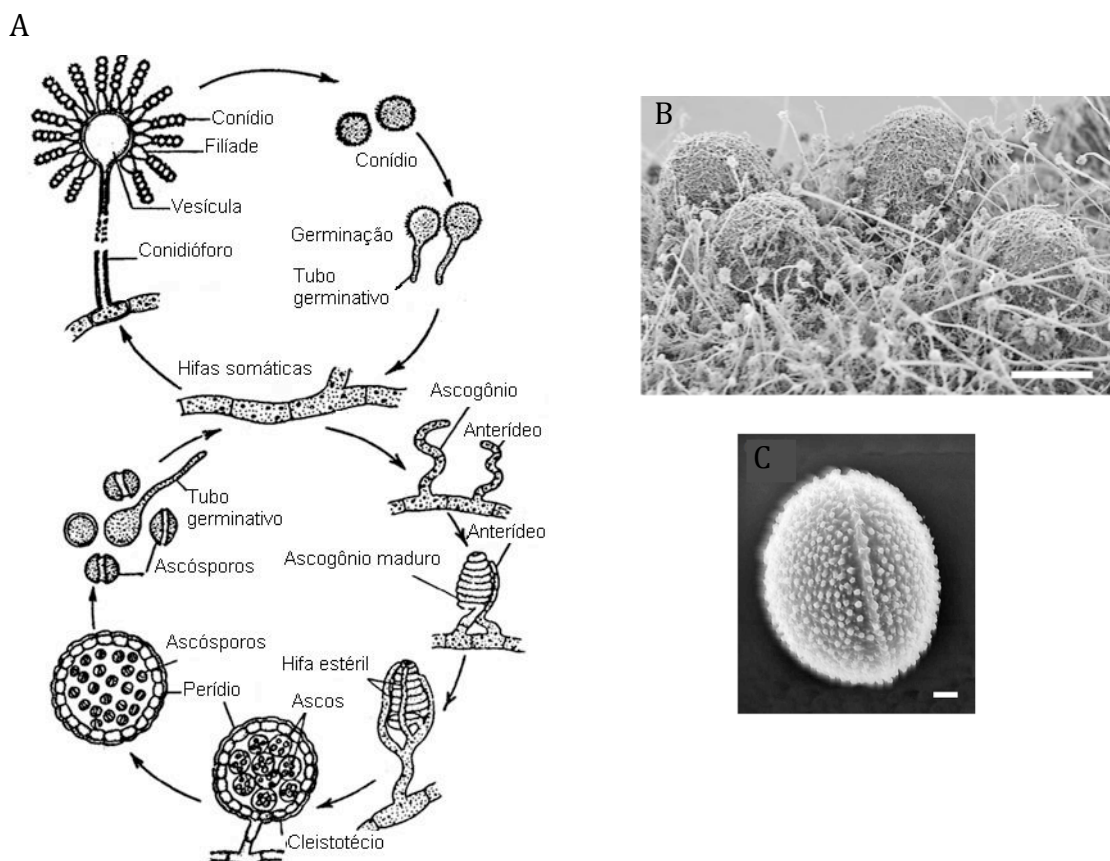


Figura 1: A: Ciclo de vida de *Aspergillus* spp. (Adaptado de Dube, 1990 in FAO, Barley Post-Harvest Operation: Chapter 4 (http://www.fao.org/inpho/content/compend/text/ch31/ch31_04.htm)); B: Esclerócio de *Petromyces flavus* formado em cultura (adaptado de Horn et al., 2009); C: Ascósporo de *Petromyces flavus* mostrando a divisão equatorial e característica das espículas (adaptado de Horn et al., 2009).

1.5 Métodos de diagnose de micotoxinas: Limitações e estratégias inovadoras

1.5.1 Controle e monitoramento do sistema alimentar

Embora reconhecida como importantes fontes alimentares, e o Brasil ser grande produtor da castanha do Brasil, castanha de caju e amendoim, tem sofrido com questionamentos quanto a qualidade desses produtos exportadas, principalmente pelos Estados Unidos e Europa. Uma vez que as amêndoas são consumidas *in natura* e a contaminação por aflatoxina pode ser transmitida ao consumidor final. Nesse contexto, a cadeia produtiva da castanha do Brasil têm sido ameaçada pelas dificuldades de adequação aos padrões tecnológicos exigidos pelos mercados importadores.

Visando uma melhoria na qualidade do produto extrativista, a comissão do *Codex Alimentarius*, estabelecida pela organização de alimentos e agricultura (FAO) e organização mundial de saúde (WHO), desenvolveu padrões internacionais, guias e códigos de boas práticas alimentares, que asseguram a qualidade do alimento comercializado. A integração das atividades da cadeia produtiva asseguram a prevenção e o rastreamento da contaminação (<http://www.codexalimentarius.org>).

Apesar das boas práticas recomendadas pelo *Codex Alimentarius* terem aumentado a qualidade das castanhas, a contaminação por aflatoxinas ainda ocorre. Em regiões como o Norte do País, onde o extrativismo da castanha do Brasil é realizado por populações ribeirinhas e quase não há beneficiamento, são as mais afetadas pela contaminação. Etapas de secagem a armazenamento, são identificados como pontos críticos de contaminação, devido a exposição do produto a aeração natural para secagem, ou armazenamento das castanhas ainda úmidas.

Uma vez que a contaminação das amêndoas por aflatoxinas pode ocorrer desde os estágios de pré-colheita até os estágios de beneficiamento do alimento, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (<http://www.agricultura.gov.br/>), publicou uma instrução normativa para o ano/safra de 2011/2012. Nessa instrução normativa, o programa avalia 23 culturas, entre elas castanha do Brasil e amendoim. Foram inclusos às substâncias monitoradas diversos contaminantes, como as aflatoxinas, desoxivalenol, ocratoxina A e fumonisinas.

1.5.2 Identificação morfológica de fungos micotoxigênicos

A detecção de micotoxinas podem ser realizadas através de diversos métodos os quais apresentam diferentes níveis de sensibilidade e podem ser empregados em diferentes estágios. Uma delas é a identificação morfológica. Apesar de ser um método convencional, que requer apenas um laboratório de microbiologia básico, é um método lento que necessita

especialistas em morfologia e taxonomia de fungos. A diagnose morfológica identifica apenas o fungo micotoxigênico, mas não a toxina produzida por este.

A. flavus, *A. nomius* e *A. parasiticus* são as espécies de fungos micotoxigênicos mais importantes devido ao seu potencial para produção de aflatoxinas em diferentes sistemas biológicos, principalmente, em castanha do Brasil e amendoim. São fungos que produzem ramificações filamentosas em seu crescimento, denominadas hifas, as quais muitas vezes são chamadas de mofos. Uma rede de hifas conhecida como micélio secreta enzimas que quebram complexas fontes alimentares. Pequenas moléculas resultantes da hidrólise enzimática são absorvidas pelo micélio gerando energia para o desenvolvimento do fungo. À olho nu, não é possível observar as hifas individuais, mas densos tapetes de micélios e conídios (esporos assexuados) muitas vezes podem ser vistos (Cast, 2003).

A morfologia do *A. flavus* apresenta colônias com diâmetro entre 4,0-4,5cm, quando cultivadas em Czapek ágar, possuindo as colônias uma coloração amarelo-verde e tornando-se verde à medida que a colônia vai envelhecendo (figura 2). A cabeça conidial é radial, transformando-se com o tempo colunar, a vesícula é oval possuindo toda a superfície fértil. O conidióforo é longo, incolor e rugoso, e as métulas são pequenas (figura 4). As filíades são pequenas e ampuliformes, os conídios são globulosos a subglobulosos, normalmente áspero e amarelo-verde, variando em tamanho de 3,0-6,0 μ m (figura 3).

Já a morfologia do *A. nomius* apresenta colônias, quando cultivadas em Czapek ágar, atingindo 4,0 – 7,0cm de diâmetro em 7 dias à 25°C possuindo coloração entre amarelo esverdeado à verde a medida que a colônia vai envelhecendo. A cabeça conidial pode ser bisseriada ou unisseriada, radial. O conidióforo é incolor e rugoso. A vesícula é globosa a subglobosa. Os conídios também são globosos a subglobosos, rugoso, variando em 3,7-8,1 μ m à 4,5-6,5 μ m (Kurtzman et al., 1987).

Enquanto que a morfologia do *A. parasiticus* possui colônias entre 3,2 – 3,5cm de diâmetro, quando cultivadas em Czapek ágar, variando entre amarelo-verde e verde escuro à medida que vai envelhecendo. A cabeça é radial, com hastes longas e ásperas, e vesícula globulosa sendo fértil em toda a sua superfície. Quase não se observa a presença de métulas. As filíades são ampuliformes com longas e amplas terminações. Os conídios são globulosos, bastante ásperos, quase sempre mostram tecido de conectividade, variando em tamanho de 4,0-6,0 μ m (Singh et al., 1991).

A cabeça conidial de *A. nomius* é semelhante a de *A. flavus*, porém são predominantemente unisseriadas, enquanto que em *A. flavus* são predominantemente bisseriados. Os conídios de *A. nomius* são mais rugosos do que os conídios de *A. flavus*, mas não como os conídios de *A. parasiticus* (Klich and Pitt, 1988).

Isolados aflatoxigênicos de *A. flavus*, produzem aflatoxinas B1 e B2, e frequentemente ácido ciclopiazonico, não relacionado a micotoxinas, enquanto *A. parasiticus*, tipicamente produz aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, mas não produz o ácido ciclopiazonico (Horn et al. 1996). *A. nomius* possui um perfil de produção de micotoxinas similar ao *A. parasiticus*, entretanto, morfológicamente, é similar ao *A. flavus* (Peterson et al.

2001). Entretanto, Hesseltine et al. (1970), em uma pesquisa de produção de aflatoxinas por espécies de *Aspergillus*, relatada pela primeira vez a produção atípica de ambas aflatoxinas, B e G, por isolados de *A. flavus*.

Por ser uma metodologia lenta e que não estipula a presença de aflatoxinas, a diagnose morfológica atualmente está em desuso para análises laboratoriais de produtos para exportação.

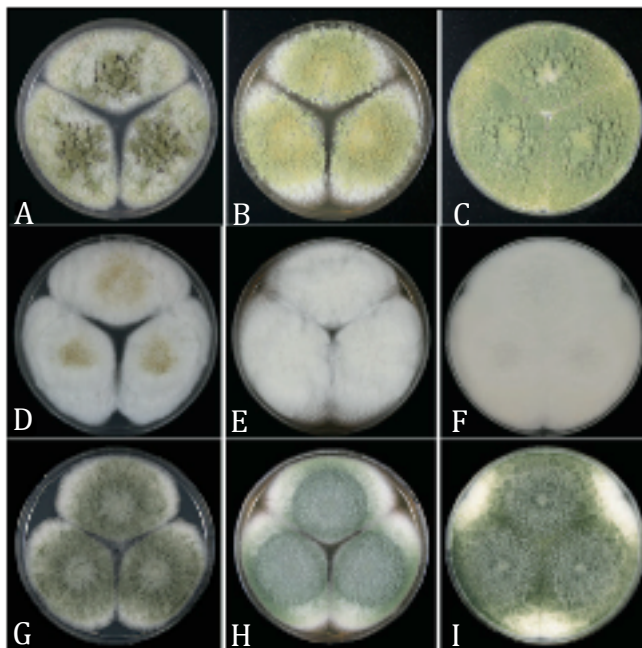


Figura 2: Colônia das espécies membro da seção *Flavi* em meio de cultura semi-sólido CYA (A, D e G), MEA (B, E e H) e YES (C, F e I) cultivadas por 7 dias a 25°C. A – C: Colônia de *Aspergillus flavus*. D – F: Colônia de *Aspergillus nomius*. G – I: Colônia de *Aspergillus parasiticus* (modificada de Varga et al., 2011).

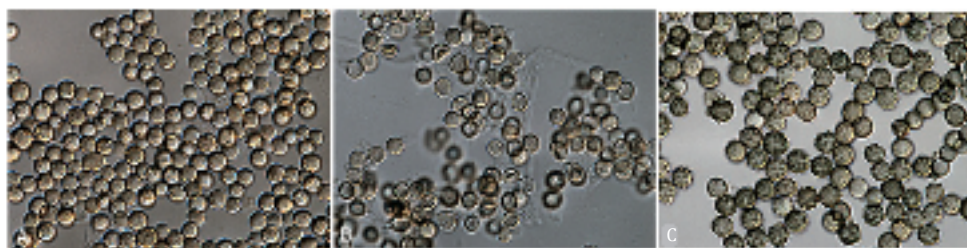


Figura 3: Conídio de espécies membro da seção *Flavi*. A: Conídio de *A. flavus*; B: Conídio de *A. nomius*; C: Conídio de *A. parasiticus* (modificada de Varga et al., 2011).

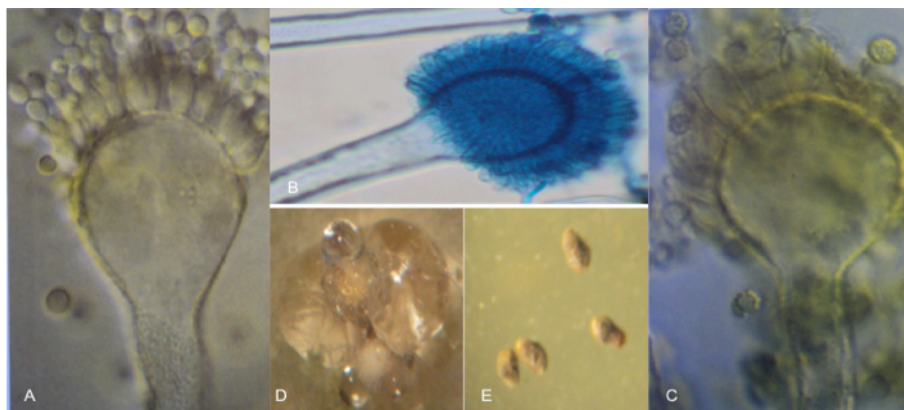


Figura 4: Conidióforo de espécies membro da seção *Flavi*. A: Conidióforo de *A. flavus*; B: Conidióforo de *A. nomius*; C: Conidióforo de *A. parasiticus*; D e E: Esclerótia de *A. nomius* (modificada Singh et al., 1991).

1.5.3 Detecção cromatográfica de micotoxinas

A detecção cromatográfica de micotoxinas é a atual metodologia adotada por laboratórios credenciados pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), Ministério da Saúde, Inmetro, ANVISA, entre outros órgãos responsáveis pela fiscalização de grãos para análise de produtos agrícolas. As análises cromatográficas CCD (Cromatografia de Camada Delgada) e CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), são usadas na identificação da toxina presente no lote analisado, onde a análise CLAE é mais precisa que a análise CCD.

A CCD é uma metodologia de cromatografia utilizada para separar componentes químicos por polaridade, avaliação da pureza e identificação de aflatoxinas. A identificação das toxinas específicas e suas concentrações é feita por comparação visual da intensidade dos pontos de interesse do padrão da análise. A técnica normalmente utiliza uma placa de sílica gel que consiste de uma fase estacionária imobilizada em uma cuba de vidro e um solvente atuando como fase móvel. A amostra é dissolvida em um solvente volátil e aplicada na forma de um ponto na fase estacionária. A placa de sílica gel é então colocada verticalmente em um reservatório e o solvente move-se em direção ao topo da placa por capilaridade. O CCD é uma metodologia que tem uma grande versatilidade para o uso de solventes. Aflatoxinas são fortemente fluorescentes quando sob a luz ultravioleta, com excitação a 365nm e emissão a 430nm. As diferentes aflatoxinas movem-se a taxas diferentes devido a diferenças no seu comportamento de partição entre a fase móvel líquida e a fase estacionária. O CCD é o método padrão da AOAC para análise de aflatoxinas desde 1971 (AOAC Official Method 971.24, 2000). As análises realizadas por essa técnica são demoradas, dificultando a análise de grandes amostragens. Utiliza um grande volume de solventes, entre eles o clorofórmio, encarecendo a análise e podendo causar danos a saúde dos analistas. Além das análises serem lentas, a CCD não detecta concentrações de aflatoxinas menores do que 5 ppb, tornando a técnica menos precisa (Lin, et al., 1998).

Entretanto, pode ser uma escolha de método de detecção de aflatoxinas onde técnicas de equipamentos avançados não estão disponíveis.

Na década de 1980 laboratórios analíticos que realizavam análises por meio de CCD, mudaram para CLAE por ser mais precisa e por ser uma técnica de quantificação altamente automatizada com alta seletividade e sensibilidade em análises de aflatoxinas. Atualmente métodos CLAE são amplamente usados devido a sua superior performance e confiança quando comparado com CCD. Laboratórios credenciados pelo MAPA que realizam análises de alimentos no Brasil, usam a metodologia CLAE. No CLAE, a fase móvel líquida ou solvente é usado para mover a amostra através da coluna. Nessa coluna contem uma matriz que irá separar componentes e contaminantes diferentes estruturalmente de acordo com a especificidade da matriz, que é a fase estacionária imobilizada. O analito é então dividido em duas fases a medida em que passa pela coluna e conduzindo à separação de compostos, devido à diferença de coeficientes de partição. Normalmente, para aflatoxinas, são usados detectores de fluorescência com emissão de luz a 435nm e absorção a 365nm (Hussain, 2011). CLAE mostra ser mais eficiente e rápida, por sua eficiência em separar e quantificar as toxinas em baixas concentrações, variando entre 0 a 320ppb (Chu, 1992). A metodologia de CLAE utilizada para a detecção de aflatoxinas é específica. Esta consiste na utilização de clunas de imunoafinidade específicas para aflatoxinas na extração e purificação do extrato em análise.

Outro método analítico de toxinas é a cromatografia líquida de ultraperformance com detecção fluorescente acoplado com espectrometria de massa em tandem (UPLC-MS/MS), um método promissor devido a sua alta especificidade e por ser um método de detecção com ampla aplicabilidade que disponibiliza dados qualitativos e quantitativos. Considerando que a contaminação de alimentos por diversas espécies de fungos produtores de micotoxinas e diferentes tipos de toxinas produzidos por uma espécie de fungo, métodos de determinação de múltiplas micotoxinas em uma única análise deverão ser usados (Diana Di Mavungu et al., 2009). Análises simultaneas usando a metodologia de UPLC-MS/MS para a determinação simultânea de micotoxinas já foram descritas. Ventura et al. (2006) detectou AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e ocratoxinas A em amostras de cevada. E Soleimany & Khatib, (2012) detectou aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, deoxinivalenol, fumonisinas, toxinas T-2 e HT-2 em 80 amostras de cereais coletados em mercados da Malásia. Um total de 60 amostras apresentaram pelo menos uma dessas toxinas acima do limite de detecção.

No Brasil, as análises de alimentos são realizadas por laboratórios credenciados pelo MAPA, Ministério da Saúde, Inmetro, ANVISA, entre outros órgãos responsáveis pela fiscalização de grãos (Figura 5). Entretanto, uma parte dos produtos agrícolas consumidos produzidos no Brasil não passam por análises de qualidade, devido ao grande volume de produtos amostrados. Métodos rápidos e preventivos de detecção de fungos micotoxigênicos são importantes para a análise de qualidade eficiente dos produtos agrícolas brasileiro.

Apesar de ser amplamente utilizada para a análise de qualidade de grãos, a cromatografia não identifica fungos potencialmente produtores de aflatoxinas, somente a

toxina. Resultados negativos quanto à presença de aflatoxinas devem ser considerados, pois podem apresentar resultados positivos no seu destino final. Isto ocorre porque durante o transporte, normalmente por via marítima, as condições podem se tornar favoráveis ao desenvolvimento de fungos micotoxigênicos e a síntese de toxinas, que passam despercebidos durante as análises (Freire *et al.*, 1996).



Figura 5: Localizações de laboratórios credenciados pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), ANVISA, e outros (Midorikawa, 2009).

1.5.4 Detecção Imunológica de micotoxinas

Devido a biotecnologia avançada, testes baseados em anticorpos altamente específicos estão disponibilizados comercialmente para medição de aflatoxinas em alimentos em menos de dez minutos.

Métodos imunológicos para a detecção de AFB₁ pode ser Radio imunoensaio de fase sólida (RIA), coluna de imunoafinidade ou ELISA (*Enzyme linked immune-sorbent assay*).

Radio imunoenaios para aflatoxinas tem sido relatado, onde apos marcada a AFB₁ com isótopo¹²⁵, o ensaio detectou AFB₁ variando entre 0,2 à 5ng/mL (Korde et al., 2003). A coluna de imunoafinidade de aflatoxinas, é normalmente usada, para a purificação no preparo de amostras para a analise cromatográfica final. Métodos imunológicos como, ELISA (*Enzyme linked immune-sorbent assay*), são os testes amplamente usados para detecção de aflatoxinas devido a sua simplicidade, sensibilidade e adaptabilidade. Existem dois tipos de ELISA, por competitividade direta ou indireta. No método ELISA por competitividade direta, anticorpos específicos revestem uma fase sólida, como a microplaca, enquanto no método por competitividade indireta o conjugado de proteína-toxina é que revestem a microplaca (Zheng et al., 2006).

A grande vantagem dos métodos ELISA e coluna de imunoafinidade, implicam na velocidade e simplicidade no preparo das amostras, no manuseio e diminuição nos custos por analise. As desvantagens é que os métodos requerem diferentes especificidades dos anticorpos. Podem ocorrer reações cruzadas com outras aflatoxinas, os procedimentos qualitativos e quantitativos são temperatura e foto sensíveis, baixa sensibilidade. Entretanto, sendo testes de detecção rápido e simples, podem ser usados em situações onde não há a disponibilidade de equipamentos ou técnicas de analise mais sensíveis à detecção de aflatoxinas. Estudos descrevem a utilização de ELISA para uma detecção previa da aflatoxina, seguida por analises cromatográficas para confirmação dos resultados (Zheng et al., 2005; Chun et al., 2007; Ozaslan et al., 2011).

Uma outra metodologia descrita para a detecção de fungos micotoxigenicos é a PCR-ELISA. Nessa metodologia amplicons resultantes da reação de PCR são hibridizados por uma sonda fluorescente, semelhante à ELISA. Semelhante à RT-qPCR, a PCR-ELISA quantifica produtos de PCR especificos às sondas, entretanto, apesar de ser mais econômica, é menos especifica que a RT-qPCR. Em comparação com métodos imunológicos, a PCR-ELISA é vantajosa, pois identifica o fungo produtor da toxina e não somente a toxina. A detecção do fungo produtor da toxina é importante, pois, a condição da produção de toxinas está relacionada à condições de temperatura e umidade. A presença de fungos micotoxigênicos nos produtos agrícolas, indica uma contaminação por micotoxinas em potencial .

Nesse contexto, estudos usando PCR-ELISA, têm focado na distinção entre fungos produtores e não produtores de micotoxinas. Grimm & Geisen (1998) usaram a PCR-ELISA, amplificando a região rDNA ITS, na detecção de fumonisinas entre espécies de *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. poae* e *F. solani*. Estudo semelhante foi realizado com isolados de *F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti*, *F. langsethiae* e *F. tricinctum* na distinção de espécies produtoras de tricotecenos, por meio da região rDNA ITS (Nicolaisen et al., 2005). PCR-ELISA também tem sido descrita no uso de detecção especifica da região rDNA ITS de espécies de *Aspergillus* para diagnose de aspergillose pulmonar invasiva (Golbang & Matthews, 1999; Aguirre et al., 2004; Hinrikson et al., 2005).

Apesar da PCR-ELISA ser promissora para detecção de fungos micotoxigenicos, a metodologia ainda possui baixa reprodutibilidade e apresenta resultados falso negativo (Zheng et al., 2006).

1.5.5 Diagnose molecular de fungos micotoxigênicos

Nas ultimas décadas, técnicas morfológicas têm sido influenciadas por procedimentos modernos que permitem aos estudos fenotípicos de fungos maior confiabilidade. A taxonomia de fungos é dinâmica, sempre estando sob constantes mudanças. Uma vez que a distinção de características morfológicas de fungos filamentosos é pouco diferenciada, os métodos são laboriosos, exigem tempo, são variáveis e muitas vezes não possuem resolução taxonômica, técnicas moleculares são universalmente aplicáveis. A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permite análise com poucas células ou esporos de fungos, material de herbário. Além de possibilitar análise de fungos a partir de pouco material biológico, a técnica de PCR permite a análise comparativa de segmentos do DNA, onde mudanças que nem sempre estão presentes nas características fenotípicas, podem ser identificadas por meio do genótipo.

Além de ser uma diagnose relativamente rápida, o método de PCR também é muito sensível para a detecção da presença do fungo produtor de micotoxinas, detectando a presença do DNA do organismo a uma concentração entre picogramas (pg) e femtogramas (fg) por microlitro (μ l) de reação, como descrito por Midorikawa et al. (2008). Neste trabalho um conjunto de *primers* desenvolvidos especificamente para a região ITS do DNA ribossomal de *A. flavus*, mostrou especificidade até o limite de 10fg. Com intuito do uso de uma diagnose molecular rápida e específica de *Schistosoma japonicum*, um parasita endêmico da China, *primers* específicos para a região do DNA mitocondrial dessa espécie foram desenhados e otimizados. A sensibilidade da reação foi de até 0,05ng de DNA (Zhao et al., 2012).

Estudos utilizando microarranjos obtidos a partir de seqüências do gene da calmodulina mostrou especificidade para *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus ibericus* em um limite de especificidade de até 3,2pg de DNA (Bufflier et al., 2007). Semelhante foi realizado por Spiess et al. (2007), que estabeleceram microarranjos de DNA para a identificação do DNA de 14 espécies de fungos entre eles, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida lusitaniae*, *Candida tropicalis*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus microsporus*, *Scedosporium prolificans* e *Trichosporon asahii*, específicas para a região gênica do rRNA 18S, 5,8S e ITS1. Estudos usando microarranjos de DNA também têm sido feitos para diagnose específica de *Fusarium* spp. (Pavlátová et al., 2011).

Apesar das técnicas convencionais de PCR serem específicas e sensíveis, mais rápidas do que técnicas microbiológicas para a diagnose de fungos micotoxigênicos (Niessen

et al, 2005; Niessen, 2007), a PCR em tempo real (qRT-PCR) é uma técnica ainda mais sensível e elimina o tempo de análise do produto da reação como Southern blot e eletroforese por gel de agarose. Diversos autores descrevem esse método para a diagnose de fungos como, Bluhm et al. (2004) que utilizaram um sistema de PCR em tempo real, para a detecção de isolados de *Fusarium* spp. produtores de tricotecenos e fumonisinas, e identificação de *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* coletados em amostras de milho. Os *primers* e sondas foram desenvolvidos a partir de seqüências dos genes TRI6 e FUM1 envolvidos na biossíntese de micotoxina, e de seqüências da região do DNA ribossomal de *Fusarium*, como controle positivo interno para o gênero. O sistema de PCR em tempo real mostrou ser específico a um limite de detecção entre 50ng até 5pg do DNA genômico por reação testada em 21 amostras de *Fusarium* spp, onde foram detectados produtos de PCR para os genes TRI6 e FUM1. Estudos usando a PCR em tempo real têm sido realizados também com intuito da diagnose clínica, onde sondas espécie específicas são desenvolvidas para identificação de espécies de fungos como, os dos gênero *Aspergillus* e *Candida* (Hsu et al., 2003; Schabereiter–Gurtner et al., 2007; Johnson et al., 2012). Suanthie et al. (2009) desenvolveram um sistema de qRT-PCR múltiplo para a identificação de *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* gênero-específico a partir de regiões do DNA ribossomal ITS (*Internal Transcribed Spacer*). O limite de detecção mostrou ser bastante sensível, detectando até 1 pg de DNA.

1.5.5.1 DNA ribossomal nuclear

Um dos grupos de genes alvo que são frequentemente usados em estudos filogenéticos, é o que codifica o RNA ribossomal. A razão para tal, é que o rDNA é um gene que possui multplas copias, não protéico, cujas as copias repetidas em tandem contém informações dos eventos evolutivos. Adicionalmente, os ribossomos estão presentes em todos os organismos. O rDNA possui regiões conservadas que servem como pontos de referência em análises de divergência evolutiva. As regiões conservadas alternam com regiões altamente variáveis, conhecidas como ITS (*Internal Transcribed Spacers*) (Hibbett, 1992).

Comparações de sequencias do rDNA 18S tem sido feitas em estudos onde os organismos são distintamente relacionados, por ser a região mais conservada do rDNA. Entretanto, o rDNA 28S é o menos conservado entre os genes do rDNA, possibilitando comparações entre gêneros. O rDNA 5,8S é o menor gene e o menos variável. Regiões ITS1 e ITS2, estão localizadas entre o rDNA 5,8S. Análises moleculares taxonômicas ou filogenéticas, geralmente usam regiões parciais do rDNA 18S e 28S, e regiões completas do gene 5,8S, ITS1 e ITS2 (White et al., 1990) (figura 6).

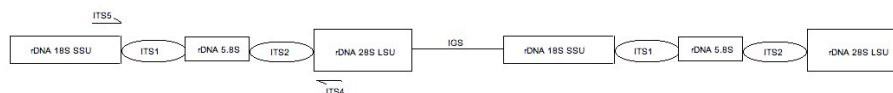


Figura 6: Disposição dos genes 18S, 5,8S e 28S, e espaçadores não transcritos ITS1 e ITS2 do rDNA. As repetições em tandem do grupo de genes rDNA são separadas por um espaçador intergênico (IGS). Identificação da posição de hibridização dos primers ITS universais, ITS5 e ITS4.

Nos últimos anos, os métodos que têm sido amplamente usados para a taxonomia de espécies, são os métodos eletroforéticos e seqüenciamento. Muitos autores têm seqüenciado espécies que possuem uma relação próxima para investigar a relação filogenética do taxa (Mishra et al., 2003; Kulik et al., 2004; Siddiquee et al., 2007) . Dentro do grupo *Aspergillus*, diversos relatos têm sido feitos na busca por diferenciação de espécies por meio da região rDNA ITS (Kumeda & Asao, 1996; Paterson, 2000; Ito et al., 2001; Rigo et al., 2002; Frisvad et al., 2005; Godet & Munaut, 2010; Varga et al., 2011; Taniwaki et al., 2012; Hubka, et al., 2013). Recente estudo sobre a diversidade de *Aspergillus* da seção *Flavi* isolados a partir de castanha do Brasil coletado na floresta Amazônica usou ferramentas de morfologia macro e microscópicas, quantificação de micotoxinas, e seqüenciamento parcial das regiões rDNA ITS, β -tubulina e calmodulina. No estudo foram identificadas as espécies de *A. flavus*, *A. nomius* e *A. parasiticus*, onde *A. flavus* representou mais de 75% de contaminante de castanha do Brasil (Baquião et al., 2013).

1.5.5.2 DNA mitocondrial

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares para a diferenciação genética de fungos na década de 80, considerações substanciais relacionadas a taxonomia morfológica têm surgido. Regiões como, o rDNA nuclear ITS (Olsen et al. 1986; White et al., 1990; Zhao, 2001; Sugita, 2004; Kulik et al., 2004; Nicolaisen et al., 2005; Midorikawa et al., 2008; Zhao et al., 2012) e mtDNA rDNA (Hegedus et al., 1998; Moncalvo et al., 2000; Gonzalez & Labarere, 2000; Hofstetter et al., 2002) são bem elucidadas e comumente usadas para a diagnose molecular de fungos por possuem regiões codantes conservadas e não codantes variáveis, e alta taxa evolutiva. Genes mitocondriais do rRNA possuem maior taxa de mutação do que regiões nucleares, características essas, que proporcionam grande variabilidade genética mesmo entre as espécies de fungos proximamente relacionadas. Por esse motivo, são freqüentemente utilizados em estudos filogenéticos para um grau taxonômico intermediário como gênero (Bruns et al., 1991).

O mtDNA de fungos possui forma circular e está localizado nas mitocôndrias, organelas que possuem DNA e ribossomos próprios para síntese de proteínas. O mtDNA produz número limitado de RNAs (RNA mensageiro, RNA transportador e RNA ribossomal), proteínas e enzimas essenciais para a formação de uma mitocôndria funcional envolvidas em processos de transferência de energia como citocromo b, citocromo oxidase e subunidades de ATPase (Sederoff, 1984). O sistema de tradução organelar pelo qual

mRNAs mitocondriais são traduzidos, é também composto por rRNAs componentes-específicos, pequenas subunidades (SSU) e grandes subunidades (LSU), e raramente 5S rRNA (Gray et al., 1999) (Figura 7). O mtDNA de *A. flavus* possui aproximadamente 36,8Mb (<http://www.aspergillusflavus.org>).

Devido ao seu alto nível de variabilidade, possuir um grande número de cópias e ser facilmente purificado, o mtDNA é um atrativo para o uso do RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) em análise taxonômica entre espécies de fungos (Kozłowski & Stepień, 1982; Suzuki et al., 1989; Smith & Anderson, 1989; Bruns et al., 1988; Gardes et al., 1991; Hamari et al., 2003; Juhász et al., 2007). Varga et al. (1994), baseado na digestão *HaeIII-BglII* do mtDNA, dividiu os padrões de RFLP três grupos principais correspondentes às três diferentes espécies, *A. niger*, *Aspergillus tubingensis* e *Aspergillus brasiliensis*. Wang et al., 2001, primeiro relataram o uso do gene do citocromo b mitocondrial para análise filogenética na identificação taxonômica de *Aspergillus* da seção *Flavi*. O mtDNA e rDNA também tem sido usados como regiões alvo de PCR em tempo real para a diagnose de Aspergilose invasiva (Millon et al., 2011).

Autores têm usado regiões do mtDNA para o desenvolvimento de *primers* específicos para espécies de fungos, afim de distinguir espécies em um sistema de diagnose molecular por PCR convencional. *Primers* específicos para *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger* foram capazes de distinguir essas espécies de outros fungos e leveduras (Bretagne et al., 1995). Zeng et al. (2003), desenvolveram 23 *primers* específicos a partir da região universal do mtDNA SSU rDNA, verificando especificidade com 15 espécies de fungos, entre eles, os dos Gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium*. A amplificação de genes do mtDNA com *primers* universais seguido de seqüenciamento podem proporcionar a detecção de variabilidade tanto inter-específica como intra-específicas e ser de grande valia no desenvolvimento de *primers* específicos para *A. flavus*.

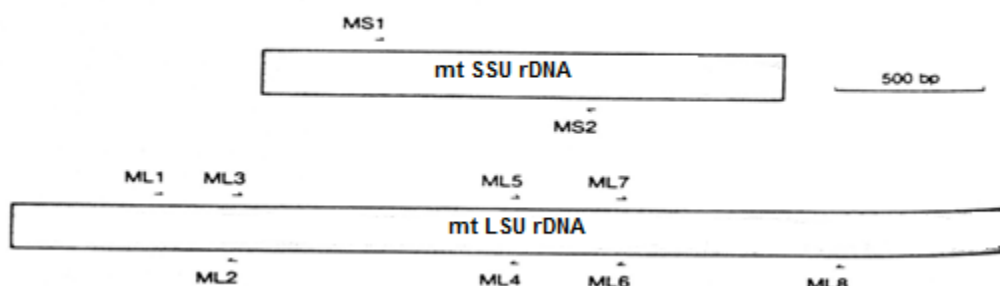


Figura 7: Pequena subunidade do DNA mitocondrial ribossomal com local de anelamento de *primers* universais MS1 e MS2; e grande subunidade do DNA mitocondrial ribossomal com local de anelamento de *primers* universais ML1 e ML2, ML3 e ML4, ML5 e ML6, ML7 e ML8

1.5.5.3 Metabólitos secundários de *A. flavus*

Os metabólitos secundários são produzidos por diversos organismos, inclusive fungos. São pequenas moléculas bioativas que podem possuir propriedades que causam malefícios como, as toxinas das micotoxinas, ou benefícios farmacêuticos como antibióticos (penicilina e cefalosporina), antifúngicos (griseofulvina) e drogas anti-tumorais (terrequinone A) para a humanidade (Hoffmeister & Keller, 2007). Os metabólitos secundários raramente afetam ao crescimento ou reprodução do fungo sob condições laboratoriais, porém possuem papel importante na ecologia do fungo como fatores de adaptação como, proteção aos raios U.V., repelentes contra predadores, entre outros (Ehrlich et al., 2010; Reverberi et al., 2010).

Os genes envolvidos na síntese dos metabólitos secundários, normalmente, estão agrupados no genoma onde cada grupo de genes contém genes enzimáticos e, frequentemente, fatores de transcrição para compor a síntese do metabólito (Turner, 2010). No genoma de *A. flavus* já foram verificados 55 grupos de genes sob 28 condições diferentes, incluindo, patogenicidade na planta hospedeira, fatores ambientais, perda ou superexpressão de reguladores globais do metabolismo secundário como, *LaeA* e o grupo de genes que sintetizam a aflatoxina (Georgianna et al., 2010).

A diagnose molecular específica de fungos produtores de aflatoxinas, envolve a identificação de regiões alvo da via biossintética de aflatoxinas. Nos últimos anos o uso da genética vem proporcionando um maior conhecimento sobre o mecanismo regulatório, mostrando que a via biossintética de aflatoxinas é regulada por diversos mecanismos (Georgianna, 2008). A biossintese da aflatoxina B1 envolve 23 reações enzimáticas, iniciando pela síntese do acetil-CoA. Um total de 15 precursores intermediários são descritos na via, envolvendo 25 genes agrupados em uma região de 75 Kb de DNA (Bhatnagar et al., 2006). Esses genes que estão envolvidos na síntese da aflatoxina aparentam ser altamente conservados entre as espécies de *A. flavus* e *A. parasiticus*. O genoma completo de *A. flavus* possui 37Mb e 8 cromossomos. A partir de seqüências completas do genoma de *A. flavus*, pode-se falar que o grupo de genes responsáveis pela produção de aflatoxinas está localizado perto de uma região telomérica do cromossomo 3 (Payne et al., 2007) (figura 8).

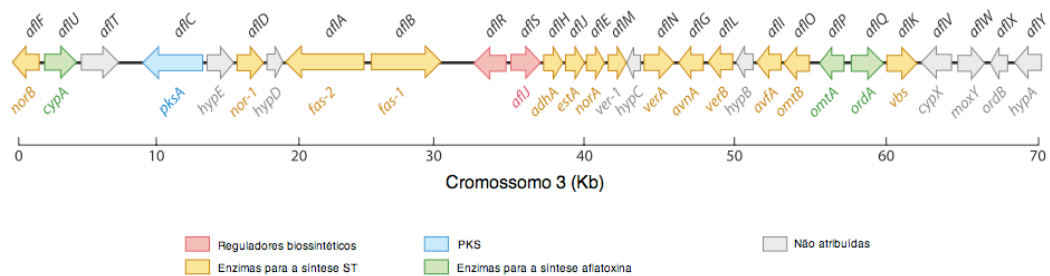


Figura 8: Grupo de genes responsáveis pela síntese de aflatoxina de *A. flavus*. As setas indicam a direção de transcrição de cada gene. As diferentes cores usadas nas setas indicam a função de cada gene na via. *afIA*, *afIB* participam da síntese de ácidos graxos, e *afIC* (gene em azul) sintetiza o ácido norsolorinicico (*NOR*). O *NOR*, mais a frente, é sintetizado para esterigmatocistina (genes em amarelo) e em seguida para aflatoxina (genes em verde). Os genes regulatórios, *afIR* e *afIS*, são mostrados em

vermelho. Nomenclatura atual dos genes é mostrada acima das setas, e a nomenclatura antiga dos genes, é mostrada abaixo. Os genes em cinza não têm a sua função atribuída (modificado de Amaike & Keller, 2011).

A via biossintética de aflatoxinas é uma das vias de metabólitos secundários de fungos micotoxigênicos mais estudada, onde a maioria dos genes têm suas funções determinadas. O cluster da aflatoxina é conservada em vários graus em diversas espécies de fungos incluindo, *A. parasiticus*, *Aspergillus ochraceoroseus*, *Emericella astellata*, *A. flavus* var. *parvisclerotigenus*, *Aspergillus toxicarius*, *A. nomius*, *Aspergillus pseudotamarii*, *Aspergillus zhaoqingensis*, *A. bombycis*, *Emericella venezuelensis*, *A. rambellii*, *A. nidulans* e seu anamorfo *Emericella nidulans*, *A. oryzae*, *A. sojae*, e mesmo fungos distantes como *Dothistroma*. Entretanto, somente os *Aspergilli* produzem aflatoxinas ou a esterigmatocistina (Amaike & Keller, 2011).

A via biossintética possui dois genes reguladores independentes. O gene *afIR* codifica um fator de transcrição *zinc-finger* com ligação DNA ($Zn(II)_2Cys_6$), que regula a expressão de genes biossintéticos da aflatoxina e esterigmatocistina. Uma superexpressão do *afIR*, aumenta a produção de aflatoxinas e regula positivamente outros genes da via biossintética da aflatoxina (Price et al., 2006). O *afIR* é capaz de ligar-se a região consenso do motif 5'-TCGN₅CGR-3' encontrada nas regiões promotoras de diversos genes da aflatoxina e esterigmatocistina (Woloshuk et al., 1994). Um segundo sitio de ligação, 5'-TTAGGCCTAA é descrito como importante na autoregulação de transcritos de *afIR* em *A. flavus* e *A. parasiticus* (Chang et al., 1995). Outro gene também envolvido na regulação da via biossintética de aflatoxinas é o *afIS* ou *afIJ*. *afIR* e *afIS* são transcritos divergentemente por promotores diferentes, onde o seu produto regula a produção de aflatoxinas através da ligação e ativação do *afIR*. Apesar de o *afIR* iniciar a transcrição gênica independentemente, Georgianna & Payne (2009) sugerem que a proteína sintetizada pelo gene *afIS* aumenta a transcrição gênica da via quando ligado ao ativador *afIR*.

Diferente dos genes *afIR* e *afIJ* que estão presentes na via biossintética de aflatoxinas, genes como *laeA* e *veA*, localizados fora dessa via, são reguladores globais do metabolismo secundário de aflatoxinas (Bok & Keller, 2004; Calvo et al., 2004; Cary et al., 2007). Ambos os genes regulam o desenvolvimento do fungo e afetam a produção de sterigmatocistina e aflatoxina.

A via de conversão da aflatoxina segue a conversão do acetato em policetídeo, sendo convertido em antraquinonas, em seguida é convertido em xantonas e finalmente em aflatoxinas. O genes envolvidos nos principais passos de conversão da aflatoxina e suas funções compreendem os genes *afIA* (*fas-2*), *afIB* (*fas-1*) e *afIC* (*pksA*) envolvidos na conversão do acetato em ácido norsolorínico (NOR), conhecido como o primeiro precursor estável da via da aflatoxina. Estudos envolvendo a deleção do gene *afIC*, relataram a falta da produção da aflatoxina e seus intermediários, demonstrando que esse gene é importante para a biossíntese da aflatoxina (Feng & Leonard, 1995; Trail et al., 1005). Os genes *afID* (*nor-1*), *afIE* (*norA*) e *afIF* (*norB*) estão envolvidos na conversão do NOR em averantina (AVN). NOR é convertido em AVN por redutase/ enzima dehidrogenase, e essa reação é

reversível dependendo de NADP(H) ou NAD(H) (Yabe et al., 1991). A deleção do gene *aflE* envolvido na conversão de NOR para AVN não prejudicou a habilidade dessa conversão, podendo ser devido a presença dos genes *aflD*, *aflF* e outros genes NOR redutase presentes no genoma (Cary et al., 1999). O gene *aflG* (*avnA*) codifica o citocromo P450 monooxigenase que converte o AVN em hidroxiaveratina (HAVN), e o gene *aflH* (*adhA*), codificador de um álcool desidrogenase, está envolvido na conversão da HAVN em averufina (AVF). O gene *aflI* (*avfA*) que codifica uma oxidase, converte o AVF em um acetato versiconal hemiacetal (VHA), e para a conversão do VHA em VAL está relacionada ao gene *aflJ* (*estA*). A VAL é convertida em versicolorina B (VERB) pelo produto do gene *aflK* (*vbs*). Esse é um passo chave na formação da aflatoxina, uma vez que há a formação do anel bisfurano. Esse anel é necessário para a ligação ao DNA, dando a aflatoxina característica de mutagênica (McGuire et al., 1996). O gene *aflL* (*verB*) que codifica o citocromo P450 monooxigenase/desaturase, está envolvido na conversão de VERB em versicolorina A (VERA). Estudos têm demonstram que a formação do VERA pelo VERB é um ponto de ramificação para a síntese do AFB1 e AFG1 do AFB2 e AFG2 (Bhatnagar et al., 1991; Yabe & Hamasaki. 1993). Os genes *aflM* (*ver-1*) e *aflN* (*verA*) estão envolvidos na conversão de VERA em demetilesterigmatocistina (DMST). O gene *aflO* (*omtB*, *dmtA*) está envolvido na conversão do DMST em esterigmatocistina (ST), e em DMDHST em DHST. Nos estágios finais da síntese da aflatoxina B1 (AFB1) são conduzidos por duas enzimas, a metiltransferase codificada pelo gene *aflP* (*omtA*) que converte a esterigmatocistina em O-metilesterigmatocistina, e uma oxidoredutase codificada pelo gene *aflQ* (*ordA*) que converte a O-metilesterigmatocistina em AFB1 (Yu et al., 2004) (figura 9, tabela 1).

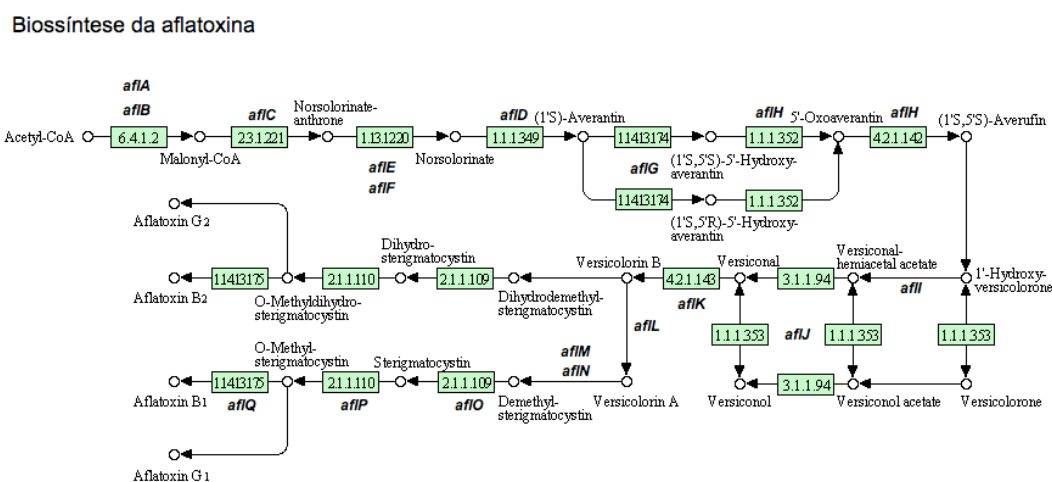


Figura 9: Biossíntese da aflatoxina por *A. flavus*. Setas indicam a direção de síntese da via. Círculos sem preenchimento indicam produto enzimático. Quadrados indicam identificação da enzima (*Enzyme Commission number – E.C. number*). Genes codificadores de enzimas são descritos ao longo da via (modificado KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) - <http://www.genome.jp/kegg/>).

Tabela 1: Genes envolvidos na via biossintética da aflatoxinas de *A. flavus*. Nomenclatura atual dos genes envolvidos na síntese da aflatoxina, outras denominações usadas para cada gene correspondente, produtos enzimáticos e suas funções são descritas nessa tabela. Siglas usadas na tabela indicam: FAS (ácidos graxos sintases), PKS (poliketideo), NOR (ácido norsolorinico), AVN (averatina), HAVN (5'-hidroxiaveratina), AVF (averufina), VHA (acetato versiconal hemiacetal), VAL (versiconal), VERB (versicolorina B), VERA (versicolorina A), ST (esterigmatocistina), DMST (demetilesterigmatocistina), DMDHST (demetildihidroesterigmatocistina), OMST (O-metilesterigmatocistina), DHOMST (dihidro-O-metilesterigmatocistina).

Gene	Outros nomes usados	Produto enzimático	Função na via biossintética
<i>aflA</i>	<i>fas-2 (hexA)</i>	Subunidade alfa FAS	Acetato em policetideo
<i>aflB</i>	<i>fas-1 (hexB)</i>	Subunidade beta FAS	Acetato em policetideo
<i>aflC</i>	<i>pkcA</i>	PKS	Acetato em policetideo
<i>aflD</i>	<i>nor-1</i>	Redutase	NOR em AVN
<i>aflE</i>	<i>norA (adh-2)</i>	NOR redutase/desidrogenase	NOR em AVN
<i>aflF</i>	<i>norB</i>	Desidrogenase	NOR em AVN
<i>aflG</i>	<i>avnA (ord-1)</i>	P450 monooxigenase	AVN em HAVN
<i>aflH</i>	<i>adhA</i>	Álcool desidrogenase	HAVN em AVF ou AVNN
<i>aflI</i>	<i>avfA (ord-2)</i>	Oxidase	AVF em VHA
<i>aflJ</i>	<i>estA</i>	Esterase	VHA em VAL
<i>aflK</i>	<i>vbs</i>	VERB sintase	VAL em VERB
<i>aflL</i>	<i>verB</i>	Dessaturase	VERB em VERA
<i>aflM</i>	<i>ver-1</i>	Desidrogenase/Cetorreductase	VERA em DMST
<i>aflN</i>	<i>verA</i>	Monooxigenase	VERA em DMST
<i>aflO</i>	<i>omtB</i>	O-Metiltransferase I ou O-metiltransferase B	DMST em ST, DMDHST em DHST
<i>aflP</i>	<i>omtA</i>	O-Metiltransferase A ou O-metiltransferase II	ST em OMST, DHST em DHOMST
<i>aflQ</i>	<i>ordA (ord-1)</i>	Oxidoreductase/P450 monooxigenase	OMST em AFB1 e AFG1, DHOMST em AFB2 e AFG2
<i>aflR</i>	<i>aflR</i>	Ativador de transcrição	Regulador da via
<i>aflS</i>	<i>aflJ</i>	Potenciador (enhancer) de transcrição	Regulador da via
<i>aflT</i>	<i>aflT</i>	Proteína transmembrana	Não atribuídos
<i>aflU</i>	<i>cypA</i>	P450 monooxigenase	Não atribuídos
<i>aflV</i>	<i>cypX</i>	P450 monooxigenase	Não atribuídos
<i>aflW</i>	<i>moxY</i>	Monooxigenase	Não atribuídos
<i>aflX</i>	<i>ordB</i>	Monooxigenase/oxidase	Não atribuídos
<i>aflY</i>	<i>hypA</i>	Proteína hipotética	Não atribuídos

Trabalhos caracterizando genes da via biossintética da aflatoxina quanto a sua síntese são descritos. Liu & Chu (1998) em análise com isolados que não produzem aflatoxinas de *A. flavus*, *A. sojae* e *A. oryzae* cultivados em meio propício para a produção de AFB1, mostrou que mesmo na presença do mRNA do gene *aflR* e o seu produto AFLR, a produção do mRNA do gene *aflP* não foi detectada. Ehrlich et al. (2004) descreve que um defeito no gene *aflU* (*cypA*) de *A. flavus* é o responsável pela perda da síntese das aflatoxinas G1 e G2. Abdel-Hadi et al. (2011) em estudo deletando o gene *aflD* (*nor-1*) concluiu que há diminuição da produção de AFB1 por *A. flavus* e AFG1 por *A. parasiticus*.

Sistemas de PCR múltipla usando mais de um par de *primers* para a identificação de fungos aflatoxigênicos têm sido desenvolvidos. Os genes alvo usados nessa identificação por PCR convencional e RT-PCR são os genes *aflD*, *aflI*, *aflM*, *aflO*, *aflP*, *aflQ*, *aflR* e *aflS* (Chang et al., 1992; Yu et al., 2000; Skory et al., 1992; Bhatnagar et al., 1991; Payne et al., 1993; Meyers et al., 1998). Levin (2012) cita três sistemas diferentes de diagnose de fungos aflatoxigênicos. Os sistemas são baseados em reações de PCR individual e múltipla envolvendo genes alvo da via biossintética da aflatoxina *aflD*, *aflR*, *aflS*, *aflJ*, *aflM*, *aflO* e *aflP* (Shapira et al., 1996; Färber et al., 1997; Rahimi et al., 2008). Nakamura et al. (2011), Em análise de sequências multilocus (MLSA) baseado no genes *aflR*, *aflS*, *aflE* e *aflK*,

desenvolveu um sistema de PCR que diferencia *A. oryzae* e *A. sojae* de amostras produtoras de aflatoxinas, *A. flavus*, *A. toxicarius* e *A. parasiticus*.

Vários estudos vêm sendo feitos na tentativa de correlacionar genes da via biossintética a fungos produtores e não produtores de micotoxinas, onde o gene *aflR* é principal alvo por ser um regulador positivo da via metabólica (Yu et al. 2004; Somashekar, 2004). Entretanto, Paterson (2006) sugere que o gene *aflR* não seja confiável para o uso de diferenciação de aflatoxinas por também estar envolvido na regulação de produção de esterigmatocistina, o penúltimo precursor da produção de aflatoxinas, o qual pode apresentar um resultado falso positivo. Genes como *aflP* ou *aflQ*, aparentemente, são os melhores candidatos para estudos de distinção entre fungos produtores e não produtores de micotoxinas por não serem relevantes para a biossíntese de esterigmatocistina, uma opção válida para *primers* diferenciadores de aflatoxinas em alimentos. Rodrigues et al. (2008), testaram os genes *aflD* e *aflQ* da via biossintética de *A. flavus* por meio de PCR e RT-PCR, para verificar a presença de expressão, onde a presença de ambos os genes não mostraram correlação com a aflatoxigenicidade do fungo. A expressão de *aflD* não foi considerada como um bom marcador para o diferenciamento de isolados aflatoxigênicos e não aflatoxigênicos, mas *aflQ* mostrou boa correlação entre a expressão e habilidade de produção de aflatoxinas.

Diversos estudos têm sido realizados com intuito do desenvolvimento de um sistema específico de PCR para espécies aflatoxigênicas. Entretanto, devido a diversidade nucleotídica entre indivíduos das quatro espécies produtoras de aflatoxinas, ainda não há um sistema robusto para essa identificação.

1.5.5.4 Genes da via biossintética de aflatoxinas: polimorfismos e expressão diferencial

Um dos desafios para desenvolver um sistema de detecção molecular de fungos produtores de micotoxinas, é a similaridade dos marcadores genéticos entre taxas que são proximamente relacionados. Análises parcial da sequência da região rDNA ITS (ITS1-5,8S-ITS2) diferencia *A. sojae* /*A. parasiticus* de *A. oryzae*/*A. flavus*, entretanto, não diferencia as espécies individualmente, *A. sojae* de *A. parasiticus*, e *A. oryzae* de *A. flavus* (Kumeda & Asao, 2001). Semelhante é observado na análise de sequências do marcador TEF-1 α entre *Fusarium cerealis* e *Fusarium culmorum*, onde a distinção entre as duas espécies por meio desse marcador, é difícil de ser alcançada (Kristensen et al., 2005).

Uma abordagem alternativa na distinção de espécies ou mesmo de isolados de fungos produtores de micotoxinas, é a identificação de pequenas variações na sequência de DNA provocadas por mutações pontuais presentes nos marcadores genéticos, chamadas de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Os SNPs, quando presentes em regiões gênicas codificantes, podem alterar as taxas de transcrição, resultando em diferenças na síntese protéica do gene (Kim, 2007).

Estudos revelam que o alto nível de variação polimórfica nas sequências dos genes da β -tubulina e calmodulina de três isolados coletados da castanha do Brasil em comparação com sequências depositadas em bancos de dados públicos de *A. tamaritii* e *A. caelatus*. O alto nível de variação polimórfica sugere que esses três isolados representam uma espécie nova ainda não descrita na literatura (Gonçalves et al., 2012).

Genes localizados na região distal da via biossintética não são tão conservados quanto os genes da região proximal, sugerindo que esses genes possam estar sob fraca pressão seletiva. A perda de genes como *aflF* e *aflU* resultaram na perda de produção da aflatoxina G por *A. flavus*. A falta de produção de aflatoxinas em muitos casos é devido a grandes deleções na posição distal da via biossintética (Cary & Ehrlich, 2006). Estudo realizado por Chang et al. (2005) entre isolados de *A. flavus* não aflatoxigênicos mostraram oito padrões (A - H) de deleção diferentes posicionados preferencialmente na posição distal da via biossintética, mostrando que indivíduos do mesmo grupo vegetativo possuem padrões de deleção idênticos. Os padrões A a D correspondem a deleções tipo I e II nas regiões dos genes *aflF* e *aflU*, respectivamente. O padrão B possui deleções nucleotídicas acima da região *aflF* e *aflU* no gene de síntese de policetídeos não ribossomais e híbridos que são necessários para a biossíntese do ácido ciclopiazônico (Chang et al., 2009; Chang et al., 2012). O padrão E, possui dois breakpoints na região 5' UTR (Untranslated Region) do gene *aflM*. Já o padrão H compreende a deleção da via biossintética da aflatoxina completa. Em análise dos padrões de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) do gene *aflP* pelos mesmos autores, revelaram dois subgrupos dos padrões de deleção, porém apresentaram nenhuma correlação com os VCGs. Os padrões de deleção podem ter formado antes da divergência entre diferentes VCGs ou deleções idênticas nas sequências poderiam ter ocorrido independentemente por um mecanismo preciso depois da divergência do progenitor de *A. flavus* em diferentes VCGs.

A troca genética por fungos filamentosos assexuados é presumida que seja limitada entre isolados do mesmo VCGs. Entretanto, o alto grau de variabilidade entre isolados de *A. flavus* relacionados a morfologia como, tamanho de produção da esclerócio, habilidade de produção da aflatoxina e outros metabólitos secundários, e virulência e habilidade de decompor plantas, podem refletir na diversidade fenotípica entre os VCGs (Cotty et al., 1994; Mehl & Cotty, 2010). Pensando nessa diversidade, Ehrlich et al. (2007), avaliou a extensão de recombinação entre VCGs de isolados *A. flavus* (L). Foram analisadas as porções dos genes que codificam catálase, *xynF3* e *taa* que codificam uma xilanase e Takaamilase A, respectivamente, e regiões intergênicas dos genes *aflJ-aflR* de seis VCGs. Os resultados mostraram que em uma região de aproximadamente 250 pb das regiões dos genes *xynF3* e *taa*, possuem 4 e 6 SNPs, respectivamente. E na região intergênica *aflJ-aflR* de 500 pb, possui 5 SNPs. Duas populações de haplótipos foram encontrados para cada gene examinado. Isolados pertencentes ao mesmo VCGs possuem mesmo conjunto de SNPs independentemente da origem do isolado. Um levantamento de isolados de *A. flavus* de regiões do oeste da África revelou diferenças entre os grupos de compatibilidade vegetativa

na habilidade de produzir aflatoxina, incluindo isolados que não produzem aflatoxinas (Donner et al., 2010).

Estratégias de controle biológico usando isolado de *A. flavus* não aflatoxigênico com a intenção da exclusão competitiva de espécies de *Aspergillus* aflatoxigênicos, têm sido realizada em campo. O isolado de *A. flavus* K49 não produtor de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico (CPA) é um agente promissor, onde a falta de produção dessas toxinas são resultados de uma mutação nucleotídica no gene de síntese de policetideo e no gene híbrido de policetideo-não ribossomal peptídeo sintase, respectivamente (Chang et al., 2012). Assim como o *A. flavus* K49 usado como agente do controle biológico, o *A. flavus* AF36 também tem sido usado como agente biológico nas culturas de algodão do Arizona, EUA. A base da falta de produção da aflatoxina pelo AF36 é um único SNP que insere um códon de terminação perto do começo da sequência codante de *aflC* (*pksA*) (Ehrlich et al., 2005). Usando ensaio de pirosequenciamento desenvolvido para monitorar a incidência de isolados atoxigênicos, as frequências das características de SNP nos genes *afIR* e *afIC* foram quantificadas. Apesar do SNP no gene *afIC* ser responsável pela interrupção da produção de aflatoxina e não ocorrer em fungos produtores de aflatoxinas, muitos isolados não produtores de aflatoxinas possuem diferentes mecanismos genéticos para inabilidade de produção da toxina. SNP do gene *afIR* usado no estudo, ocorreu em cinco dos 53 isolados de *A. flavus* não produtores de aflatoxinas examinados (Das et al., 2008).

Estudo baseado na análise genômica comparativa de mutantes hipercelulósicos, Nitta et al. (2012), identificou um novo fator de transcrição (TF), *BglR* que é um regulador de genes β -glicosidade de *Trichoderma reesei*. Além do novo TF, a análise revelou um total de 19 SNPs, incluindo um SNP associado com o gene da celulase *cel1a* (*bgl2*), nove estão localizados em regiões codantes. Os outros 10 SNPs estão localizados em regiões não codantes como, regiões promotoras e regiões terminadoras. Dentre os nove SNPs encontrados em regiões codantes, um foi encontrado no fator de transcrição específico de fungo, *bglR*, na região do domínio $Zn(II)_2Cys_6$. Um mutante de *T. reesei* sem o gene *bglR*, exibiu produção elevada de celulase durante cultivo em celobiose, enquanto o tipo selvagem, onde a mutação SNP no gene *bglR* foi revertida, resultou na produção de celulase reduzida. A expressão de genes que codificam β -glucosidases foi reduzida, com o mutante apresentando pouca habilidade em hidrolizar a celobiose durante a fase log inicial. O gene *bglR* possui uma fraca homologia com o gene *amyR* de *A. oryzae*, considerado um dos principais reguladores da degradação do amido.

Em uma tentativa de identificar espécies de *Fusarium* micotoxigênicas, SNPs foram identificados baseado em sequências TEF-1 α e um sistema de PCR contendo *primers* homólogos aos SNPs foi desenvolvido. Foram detectadas 16 espécies de *Fusarium* produtores de tricotecenos e moniliformina (Kristensen et al., 2007). Análise do gene *TRI101* de 36 isolados de *F. graminearum* revelou pelo menos 25 SNPs e 17 alelos, tendo sido proposto como meio de subdivisão da espécie em pelo menos nove isolados (Leslie et al., 2007). Genes expressos especificamente durante a infecção de *F. graminearum* estão todos

representados em regiões com alta densidade de SNP. Essas regiões permitem rápida adaptação do fungo à mudanças ambientais ou do hospedeiro (Cuomo et al., 2007).

Autores têm buscado caracterizar a diversidade nucleotídica de genes envolvidos na biossíntese da aflatoxina como um caminho para sistemas de diagnose molecular de fenótipos toxigênicos e atoxigênicos. Sistemas de PCR de transcriptase reversa (RT-PCR), microarranjos tendo como alvo genes chave para a síntese da aflatoxina por *Aspergillus* aflatoxigênico têm sido elucidados pela literatura (Sweeney et al., 2000; Mayer et al., 2003; Sherm et al., 2005; Yu et al., 2007; Degola et al., 2008; Cai, et al., 2008). Entretanto, esse sistema é baseado na amplificação do RNA mensageiro do(s) gene(s) analisado, podendo esse estar ativo ou inativo transcricionalmente de acordo com as condições ambientais e nutricionais.

2 JUSTIFICATIVA

Alimentos consumidos *in natura* como a castanha do Brasil, castanha de caju e amendoim, são produtos agrícolas que possuem grande susceptibilidade a contaminação por fungos produtores de aflatoxinas. Apesar da grande produção desses produtos, o Brasil ainda apresenta elevados números de casos de contaminação por aflatoxinas. Em grande parte essa contaminação se dá devido às formas inadequadas de manejo e baixo valor agregado ao produto, impossibilitando a melhoria de técnicas de manejo aplicada pelo agricultor.

A contaminação por fungos produtores de aflatoxinas é responsável por perdas de até 50% em cultivares de amendoim não resistentes em todo o mundo (Meena *et al.*, 2002). O amendoim brasileiro apresenta altos níveis de contaminação por aflatoxinas. Análises nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, apresentaram 27% e 49%, respectivamente, de suas amostras contaminadas por mais de 30µg/kg (ppb) de aflatoxinas totais (IAPAR, 2009). Em 2003 a União Européia estabeleceu condições especiais para a importação da castanha do Brasil com casca procedente do Brasil, resultando em uma queda de 91,78% nas exportações brasileiras (Bittencourt, *et al.*, 2012). Além de perdas na agricultura, alguns casos de doenças associados à micotoxinas têm atraído a atenção mundial devido a perdas significativas associadas com o seu impacto na saúde humana e animal, e conseqüente implicações econômicas.

Atualmente, o Brasil, possui laboratórios credenciados pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para análises detecção de contaminantes por micotoxinas. Os métodos oficiais para tal análise, incluem os métodos cromatográficos como, o CCD e HPLC. Apesar das análises cromatográficas serem sensíveis à baixas concentrações de detecção de aflatoxinas, não há a detecção do potencial fungo produtor da aflatoxina. Uma vez que o fungo possui o mecanismo gênico para a síntese de aflatoxina, o início dessa síntese pode ser ou não ativada por condições ambientais como, temperatura e umidade.

Esse trabalho visa o desenvolvimento de um método de diagnóstico molecular para espécies aflatoxigênicas membro do grupo *Aspergillus* da seção *Flavi* a partir da região mtDNA SSU rDNA, a serem usados como alternativas eficientes e sensíveis em sistemas de APPCC. Em conjunto, a investigação da diversidade nucleotídica de genes da via biossintética da aflatoxina de isolados de *A. flavus* em relação à produção de aflatoxina, visando um melhor entendimento da regulação da produção de aflatoxinas por isolados de *A. flavus*. A contribuição para a redução de produtos livres de contaminações por aflatoxinas, vai além da comercialização de um produto mais saudável, visa a melhoria socioeconômica do País.

3 HIPÓTESES A SEREM TESTADAS

- A análise de marcadores moleculares específicos para a região do DNA mitocondrial SSU rDNA de espécies aflatoxigênicas, membro do Gênero *Aspergillus* seção *Flavi* possibilitam a detecção de isolados aflatoxigênicos e o uso em sistemas de diagnose molecular baseada em PCR de alimentos.
- A análise da diversidade nucleotídica de genes que codificam fatores de transcrição e enzimas precursoras da via biossintética da aflatoxina de *A. flavus* possibilitam o entendimento dos mecanismos regulatórios para a produção de aflatoxinas em *A. flavus*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O presente projeto tem como objetivo geral a caracterização da diversidade nucleotídica de genes chave da via biossintética para a produção da aflatoxina de *A. flavus* e o desenvolvimento de um sistema de diagnose molecular para a identificação das espécies membro *Aspergillus* da seção *Flavi* aflatoxigênicas.

4.2 Objetivos Específicos

1. Identificar espécies membro do grupo *Aspergillus* da seção *Flavi* contaminantes de castanha do Brasil vindas da região Norte do Brasil por meio da identificação molecular da região rDNA ITS, e dos genes β -tubulina e calmodulina.
2. Desenvolver e otimizar um sistema de diagnose molecular para a identificação das espécies membro *Aspergillus* da seção *Flavi* aflatoxigênicas frequentemente encontradas em produtos agrícolas, principalmente como a castanha do Brasil, castanha de caju e amendoim, a partir da região mtDNA SSU rDNA.
3. Caracterizar isolados de *A. flavus* de castanha do Brasil, castanha de caju e amendoim das regiões Norte e Nordeste do País quanto a sua aflatoxigenicidade por meio de UPLC-FLD
4. Analisar a diversidade nucleotídica, quanto aos polimorfismos, dos genes *aflR*, *aflP* e *aflQ* da via biossintética de aflatoxinas de isolados de *A. flavus* produtores e isolados não produtores de aflatoxinas para um melhor entendimento dos mecanismos genéticos que regulam a produção de aflatoxinas por esses isolados de *A. flavus*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleção e manutenção de isolados do gênero *Aspergillus*

Um total de 123 fungos isolados por meio de mapeamento de áreas com ocorrência de aflatoxinas em castanha do Brasil, castanha de caju e amendoim em campo e em locais de armazenamento foi realizado pela Embrapa Agroindústria (CNPAT). As amêndoas foram coletadas a partir de feiras de Fortaleza-CE (origem Amazonas), Belém (origem Amazonas), Beribe County-CE, São Raimundo Nonato-Piauí, no ano de 2002, e de cooperativas da região Amazônica, entre elas estão as regiões, Manicoré, Itacoatiara, Caroebe e Humaitá e regiões do Acre e do Pará, no ano de 2010.

O isolamento dos fungos coletados a partir de amêndoas de castanha do Brasil, castanha de caju e amendoim, foi realizado de forma direta. As amêndoas foram limpas a partir de uma solução de etanol 70% e hipoclorito 1%, e lavadas com água destilada estéril. Após a limpeza, as amêndoas foram dispostas em câmaras (Gerbox's) com papel toalha umedecido por sete dias a temperatura ambiente. As culturas monospóricas foram transferidas para meio semi-sólido BDA (em 1L, caldo de 200g da batata cozida, 2% de agar, 1,5% de dextrose) a partir de observações das colônias e estruturas morfológicas em microscópio de luz. Os isolados foram incubados com fotoperíodo de 12 em 12 horas e temperatura entre 23 à 28°C. (Freire et al., 1999). A partir de colônias puras, cinco discos de micélio de aproximadamente 0,7cm de diâmetro foram preservados em solução salina (NaCl 0,9%) com glicerol 50% e mantidos à -80°C. Uma segunda metodologia de preservação, em sílica gel, também foi feita a partir das colônias puras. Cinco discos de micélio foram misturados a 1mL de solução salina (NaCl 0,9%), onde 200µl da solução de esporos foi misturada à 1g de sílica gel, 1-4mm, (Vetec) estéril e mantida à temperatura de 4°C.

5.2 Identificação morfológica de fungos contaminantes da castanha do Brasil da região Amazônica, Acre e Amapá

A partir das colônias puras, um quadrado de aproximadamente 1 x 1cm da colônia foi cortado com o auxílio de um bisturi e lavado em solução de etanol 50% para a remoção do excesso de conídios. As estruturas morfológicas foram raspadas em uma lâmina, e à lamina, foi adicionado azul de algodão. As estruturas morfológicas foram observadas em microscópio ótico e a identificação taxonomica morfológica foi feita por meio de taxonomia clássica (Lawrence, 1998).

5.3 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico dos isolados de *Aspergillus* spp. foi conduzida a partir de um pré-inóculo em meio Czapek (em 100 ml de água destilada, 30 g de NaNO₃, 5 g de KCl, 5 g de MgSO₄, 0,1 g de FeSO₄) com extrato de levedura (CYA) (Pitt & Hocking, 1985) semi-sólido (ágar 15%) por sete dias à 25°C. Após formada colônia, um disco de micélio, com aproximadamente 0,7cm de diâmetro, foi transferido para cultivo líquido em meio CYA, e incubados a 25°C à rotação de 120rpm, durante 3 dias. A massa micelial de cada isolado foi recuperada por filtragem manual, e lavada com água destilada estéril, para remoção de todo resíduo do meio de cultura. Após a recuperação, cada isolado teve a sua massa micelial liofilizada, e macerada em cadinho de porcelana.

Após a maceração, o DNA genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (Raeder & Broda, 1985). Aproximadamente 50mg de micélio macerado foram homogeneizados com 500µl de tampão de extração (Tris HCl 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM e SDS 0,5% pH 7,0). Foram adicionados 350µl de fenol e 150µl de clorofórmio e o conteúdo foi misturado por inversão até a uma aparência leitosa, iniciando-se nesta fase, a degradação do material protéico. A suspensão foi centrifugada a 13.000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa superior foi transferida para um tubo *ependorf* e adicionados 10 µl de RNase (1 U/µl), e incubado à 37°C por 10 minutos para remoção do RNA. Foi acrescentado igual volume de clorofórmio e misturado por inversão. Nessa etapa, são eliminadas as proteínas residuais. O material foi centrifugado por 10 minutos à rotação de 13.000 rpm. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo *ependorf* e o DNA precipitado com isopropanol à temperatura de -20°C na proporção de 54% do volume total da solução. Nessa etapa, para uma maior precipitação do DNA genômico, pode-se incubar a solução com isopropanol a -20°C por *overnight*. A solução foi centrifugada por 1 minuto a rotação de 13.000 rpm e o sobrenadante descartado. Ao material precipitado foram adicionados 200 µl de etanol 70% a 4°C, para a remoção de sais. O material foi centrifugado por 1 minuto a 13.000 rpm e o sobrenadante foi novamente descartado.

O etanol residual presente no material genético foi secado em *speed-vacuum* (Eppendorf Concentrator 5301) por 10 a 15 minutos. O DNA genômico foi ressuscitado em 50 µl de tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0 e 1 mM EDTA). O DNA genômico de cada isolado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (5 V/cm) na presença de brometo de etídio (1 µg/ml) e quantificado visualmente por comparação com o marcador padrão *Low DNA Mass Ladder (Invitrogen)*. Para finalizar, as amostras de DNA genômico foram diluídas em água Milli-Q estéril a uma concentração final de 5 ng/µl para serem utilizados nas análises moleculares.

5.4 Identificação molecular de fungos contaminantes da castanha do Brasil da região Amazônica, Acre e Amapá

A partir do DNA genômico extraído de cada isolado de fungo contaminante de castanha do Brasil da região Amazônica, Acre e Amapá foram amplificadas as regiões parciais do rDNA ITS1-5,8S-ITS2, e genes da beta-tubulina e calmodulina, usando os *primers* universais ITS5 e ITS4 (White et al., 1990), T1 e T22 (Glass & Donaldson, 1995), *cmd5* e *cmd6* (Hong et al., 2006), respectivamente.

A amplificação da região rDNA ITS1-5,8S-ITS2, foi conduzida utilizando *primers* universais ITS5 e ITS4 em uma reação contendo Tampão da *Taq platinum*® (Invitrogen) 1X, MgCl₂ 4 mmol, dNTPs 1 mmol⁻¹, *primer forward* ITS5 e *reverse* ITS4 2,5 mmol⁻¹, *Taq polimerase platinum*® (Invitrogen) 1U e DNA genômico a 20 ng. A reação de PCR foi conduzida em termociclador (ESCO Swift MaxPro) seguindo temperatura de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

O mesmo foi realizado para amplificação da região da beta-tubulina usando os *primers* universais T1 e T22. Diferentemente da temperatura de anelamento usada para a região rDNA ITS, temperatura de anelamento usada para a região da beta-tubulina foi de 62°C.

Para a amplificação parcial do gene da calmodulina, a reação de PCR foi conduzida com Tampão da *Taq platinum*® (Invitrogen) 1X, MgCl₂ 2 mmol, dNTPs 1 mmol⁻¹, *primer forward cmd5* e *reverse cmd6* 5 mmol⁻¹, *Taq polimerase platinum*® (Invitrogen) 1U e DNA genômico a 20 ng. Temperaturas e número de ciclos seguem como descrito para a reação da região rDNA ITS, entretanto, para o gene da calmodulina, a temperatura de anelamento usada foi de 64,5°C. Os produtos da reação de PCR foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (5V cm⁻¹) na presença de brometo de etídio (1 µg mL⁻¹), U.V. a 254 nm e marcador molecular padrão *Low DNA Mass Ladder*® (Invitrogen).

Amplicons das regiões rDNA ITS1-5,8S-ITS2, beta-tubulina e calmodulina, foram purificados com exoSAP (USB) a proporção de diluição de 1:9. Para cada 5µl de cada reação de PCR, foi adicionado 1µl de exoSAP. O programa de purificação foi de 37°C por 90 minutos e 80°C por 20 minutos. O sequenciamento dos produtos de PCR, foi conduzido usando Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Os produtos foram sequenciados em sequenciador de DNA ABI 3700 (Applied Biosystems).

Para a identificação molecular dos fungos contaminantes de castanha do Brasil, as sequências dessas três regiões foram editadas, alinhadas com o auxílio do programa Sequencher v4.8 (Gene Codes Corporation). Um BLASTn das sequências foi realizado por meio do banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e a partir de um banco de dados local de sequências de amostras tipo de *Aspergillus*, para a identificação por espécie do fungo contaminante de castanha do Brasil. Sequências nucleotídicas de haplótipos únicos foram depositados no banco de dados NCBI.

5.5 Caracterização de isolados do gênero *Aspergillus* quanto a produção de aflatoxinas.

A caracterização dos isolados do gênero *Aspergillus* da seção Flavi quanto a sua capacidade de produção de aflatoxinas foi realizada de acordo com Schmidt-Heydt et al. (2009). As amostras foram cultivadas em meio semi-sólido indutor para a produção de aflatoxinas *Yeast Extract Sucrose* (YES) (20g/L de extrato de levedura; 0,5g/L de MgSO₄ 5H₂O; 150g/L de sacarose; 0,1g de ZnSO₄; 0,05g CuSO₄; 15g/L de agar, pH 7,0. A atividade da água (Wa) do meio de cultura foi ajustada com glicerol usando uma mistura de glicerol/ água (glicerol/ Wa 10,8 ml/ 0,99 Wa). Os isolados de *A. flavus* foram cultivados por 7 dias à 25°C. Após o tempo de cultivo, todo o conteúdo micotoxigênico foi extraído de cada placa colonizada sob agitação constante em 10 mL de metanol à temperatura ambiente durante 60 minutos.

Seguida a agitação, 0,5 mL do sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman No. 1. À essa alíquota filtrada, foram adicionados 0,5 mL de água purificada tipo I e uma nova filtragem em membrana de teflon 0,22 µm foi realizada. Um total de 10 mL do filtrado foi diluído em 990 µL de acetonitrila: água (20:80, v/v). A diluição do filtrado foi submetida a análise UPLC/MS/MS (Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada com espectrometria de massa tandem). Padrões das aflatoxinas e ácido ciclopiazônico foram obtidas da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), e os solventes líquidos para cromatografia da Merck (Darmstadt, Germany). As curvas de calibração foram preparadas para cada padrão de micotoxina usando seis concentrações: AFB1 0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 7.5 e 10.0 ng/mL; AFB2 0.06, 0.125, 0.25, 1.25, 1.875, 2.50; AFG1 0.25, 0.50, 1.0, 5.0, 7.6, 10.0 ng/mL; AFG2 0.06, 0.125, 0.25, 1.25, 1.875, 2.50; ACP 5, 10, 20, 100, 150, 200 ng/mL). O R² variou entre 0,94 e 0,994, dependendo da toxina. Os limites de quantificação foram 0,1 ng/mL para AFB1, 0,04 para AFB2, 0,10 para AFG1, 0,02 para AFG2 e 0,2 para CPA.

As análises em UPLC-MS/MS foram realizadas em um sistema ACQUITY UPLC™ com sistema de separação acoplado ao espectrômetro de massas de quadrupolo sequencial Quattro Premier™ XE (Waters, Manchester, UK). O software MassLynx 4.1 equipado com software QuanLynx (Waters) foi usado para controle dos instrumentos e a análise de dados. A separação cromatográfica foi feita em uma coluna ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 µm, 2.1 × 100 mm; Waters). A eluição foi realizada utilizando o gradiente: fase móvel A (água + 0,2% de ácido fórmico) e fase móvel B (acetonitrila + ácido fórmico 0,2%) : 0–1 minuto (10% B); 10 min (50% B), : 10,5 minutos (85% B); 11 minutos (10% B), e 12 minutos (10% B). O fluxo foi de 0,4mL/min, temperatura de 40°C e o tempo total de corrida de 12 minutos. Foi usado uma programação para o loop total da injeção, com um volume de injeção de 10 µL.

O Espectrômetro de massas foi operado em modo positivo com fonte de ionização por eletrospray (ESI). Os parâmetros de operação foram otimizados para as condições de voltagem do capilar 3,5 kV (mode positivo), com temperatura da fonte de íons 120°C e temperatura de desolvatação de 450°C. Fluxo do gás no cone foi de 50 L/h, com fluxo do gás

desolvatação de 700 L/h. Em ambos os gases usados foi o nitrogênio. O fluxo do gás de colisão, foi de 0.15 mL/min e o gás usado foi o argônio.

5.6 Caracterização da região mtDNA SSU rDNA e desenho de primer para o Gênero *Aspergillus*

A partir de sequências nucleotídicas disponíveis no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) da região mtDNA SSU rDNA de espécies representativas de *Aspergillus*, foi realizado um alinhamento usando *ClustalW* (Thompson et al., 1994). *Primers* específicos para o Gênero *Aspergillus*, ASP_GEN_MTSSU_F₁ e ASP_GEN_MTSSU_R₁, foram desenhados usando o *software Primer3* (Rozen & Skaletsky, 2000), e otimizados quanto a sua especificidade e sensibilidade. Um controle interno de amplificação competitivo também foi construído para os *primers* selecionados (Midorikawa, 2009).

Com intuito de verificar a especificidade *in silico* do par de *primers* selecionados, uma PCR eletrônica foi realizada usando o programa *primersearch* disponível por *The European Molecular Biology Open Software Suite* (EMBOSS). Um banco de dados local de sequências nucleotídicas da região mtDNA SSU rDNA de fungos ocorrentes em castanha do Brasil (Freire et al., 2000; Costa et al., 2009), contendo membros do Gênero *Aspergillus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Graphium*, *Hypocrea*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phialophora*, *Phoma*, *Rhizopus* e *Trichoderma*. Uma busca *Primer-BLAST* contra o banco de dados de nucleotídeo do NCBI também foi realizado para testar a especificidade do par de *primers* escolhido.

A especificidade do par de *primers* foi validada por meio de reações de PCR usando o DNA de espécies de *Aspergillus* e outros Gêneros de fungos ocorrentes em castanha do Brasil como, *A. flavus*, *A. nomius*, *A. tamaritii*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Fusarium solani*, *Penicillium citrinum*, *Trichoderma harzianum*, e *Cladosporium cladosporioides*, obtidos do Departamento de Fitopatologia, da Universidade de Brasília (CMUnB).

A reação de PCR foi conduzida usando 15ng de DNA genômico; 0,2 µM do *primer* ASP_GEN_MTSSU_F1 *forward* e 0,2 µM do *primer* ASP_GEN_MTSSU_R1 *reverse*; 0,2 µg/µL de *bovine serum albumin* (BSA); 0,1 µM de dNTPs; 1U de Taq DNA polimerase (*Phonetrria*); e 1X do tampão da Taq polimerase (*Phonetrria*). A reação de PCR foi conduzida em termociclador (*ESCO Swift MaxPro*) seguindo temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da reação de PCR foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (5V cm⁻¹) na presença de brometo de etídio (1µg/mL⁻¹) e marcador molecular padrão *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). A validação também conduzida usando amostras de DNA total extraídas de castanhas do Brasil naturalmente contaminadas, com limite de detecção testado usando DNA diluído.

Uma nova validação do par de *primers* específicos foi conduzida usando o DNA total extraído de amostras de castanha do Brasil com a presença de aflatoxina confirmada

coletados da região Norte do Brasil. Reações de PCR foram conduzidas como descrito anteriormente. Testes quanto a otimização da concentração de DNA total da amostra usado na reação foram realizados.

5.7 Análise PCR RFLP da região mtDNA SSU rDNA de espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi*

Com intuito de tornar esse sistema de PCR para *Aspergillus* específico para espécies do grupo *Aspergillus* da seção *Flavi* aflatoxigênico, foi realizado um alinhamento com sequências nucleotídicas da região mtDNA SSU rDNA disponíveis no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) das espécies de *Aspergillus*, incluindo sequências do genoma mitocondrial completo de seis espécies de *Aspergillus* como, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. oryzae*, *A. flavus*, *Neosartorya fischeri* (*A. fischerianus*) e *A. terreus* (Joardar et al., 2012). A partir da região obtida pelos pares de *primers* ASP_GEN_MTSSU_F1, ASP_GEN_MTSSU_R1, um mapa de restrição foi gerado para cada espécie de *Aspergillus* usando o programa Sequence Manipulation Suite (http://www.bioinformatics.org/sms2/rest_map.html).

Seguida a identificação de possíveis sítios de restrição *in silico* para a diferenciação de espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi*, foi realizada uma digestão RFLP dos amplicons (~480pb) específicos da região mtDNA SSU rDNA de espécies da seção *Flavi* e espécies de *Aspergillus* isoladas da castanha do Brasil. A reação de digestão foi conduzida usando um volume final de 30 µl contendo 1mg do produto da PCR; Tampão da digestão React 1 1X (*Invitrogen*); 1U da enzima de restrição DraI (*Invitrogen*). A incubação foi a 37°C por 1 a 2 horas. Visualização dos produtos da digestão foi feita em eletroforese em gel de agarose 1% (5V cm⁻¹) na presença de brometo de etídio (1µg mL⁻¹), e visualização em U.V. a 254nm. O marcador molecular *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen*) foi usado nos géis para estimativa do tamanho dos fragmentos digeridos.

5.8 Análise da diversidade nucleotídica dos genes *aflR*, *aflP* e *aflQ* da via biossintética de isolados de *A. flavus* contrastando em produção de aflatoxinas

Visando a análise da diversidade nucleotídica de genes precursores da via biossintética da aflatoxina de *A. flavus*, os genes *aflR*, *aflP* e *aflQ*, foram selecionados. A partir de sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), foram identificadas regiões codantes usando o programa *Inter Pro* (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) e anotações das posições de introns e exons usando o programa Artemis (Rutherford, et al., 2000) (Midorikawa, 2009). Um total de treze pares de *primers* específicos para os genes *aflR*, *aflP* e *aflQ* de *A. flavus* foram desenhados sobrepondo as sequências gênicas usando o programa *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

Sequência de cada *primer*, tamanho do amplicon e temperatura de anelamento estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Combinações entre *primers* dos genes *aflR*, *aflP* e *aflQ* de *A. flavus*, com sequências dos *primers Forward* e *Reverse*, respectivamente, tamanhos dos amplicons esperados e temperatura de anelamento utilizada (adaptada de Midorikawa, 2009).

Primers Forward	Primers Reverse	Sequência dos Primers	Tamanho do fragmento	Temperatura de anelamento
aflR_F1	aflR_R1	TGTCGATATCATTCCAATTT GCTGGCATGGTATGCT	480pb	50°C
aflR_F2	aflR_R2	GTGCAGCACGCGCTCTT CCGATTTCTTGGCCGAGTC	482pb	60°C
aflR_F3	aflR_R3	TGCTAGCGAAAAGCAGCA ACTCGGCGACCATCAGAG	486pb	60°C
aflR_F4	aflR_R4	GATTGTGGATGCGGTTGC GTGCGAGGCAACGAAAAG	474pb	60°C
aflP_F1	aflP_R1	CGAATTAGGGCAAAGGTGT GCGCCGACGTCTATCTTC	481pb	60°C
aflP_F2	aflP_R2	GATGTTAGAGAGGATTTCCA CTAGATAGGAACGGAGCTG	482pb	50°C
aflP_F3	aflP_R3	AACCTCGTCCACAGTGCT CATCACTCGACACAATCGTC	500pb	60°C
aflP_F4	aflP_R4	GCCTTTCAGTGGATGACCT AAATAGGCACACCCGACA	482pb	60 C
aflQ_F1	aflQ_R1	GATACGGCAGACGCGAAA GTGCAAAGGGGCATCTG	480pb	60°C
aflQ_F2	aflQ_R2	GAGGTTATGGGACAGACCA ACAACCTCATTTTTCCATGC	495pb	60°C
aflQ_F3	aflQ_R3	CGACATACTGAACATGGGTA TACCGTGTCCGATCCTC	481pb	60°C
aflQ_F4	aflQ_R4	TCTGGATCACATCAAGAGCA CTGGGATCATGGGTAACG	482pb	60°C
aflQ_F5	aflQ_R5	TTGTTTCACACCCGTCCA GCACCAGTCGCAATACAGC	495pb	60°C

16 isolados *A. flavus* produtor de aflatoxina B e 12 isolados de *A. flavus* não produtor de aflatoxinas tiveram os seus genes *aflR*, *aflP* e *aflQ* amplificados. A reação de PCR foi conduzida com Tampão da *Taq platinum*® (*Invitrogen*) 1X, MgCl₂ 4 mmol, dNTPs 1 mmol⁻¹, *primer forward* 2,5 mmol⁻¹ e *primer reverse* 2,5 mmol⁻¹, *Taq* polimerase platinum® (*Invitrogen*) 1U e DNA genômico 20 ng. A reação de PCR foi conduzida em termociclador (*ESCO Swift MaxPro*) seguindo temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 50 ou 60°C de acordo com os pares de *primer*, por 1 minuto, extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da reação de PCR foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (5V cm⁻¹) na presença de brometo de etídio (1µg mL⁻¹) e visualização em U.V. a 254nm. O marcador molecular *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen*) foi usado para estimativa da concentração e do tamanho dos amplicons.

Seguida a reação de PCR, os amplicons foram purificados usando 1U de Exo e SAP (*USB*). A purificação foi incubada em termociclador (*ESCO Swift MaxPro*) à 37°C por 90 minutos seguidos de 80°C por 20 minutos. O sequenciamento dos produtos de PCR purificados, foi conduzido usando Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (*Applied*

Biosystems). Os produtos foram sequenciados em equipamento de sequenciamento *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*.

A análise bioinformática da diversidade nucleotídica dos genes *aflR*, *aflP* e *aflQ* da via biossintética em *A. flavus*, foi realizada usando o programa Geneious 6.1.6 (*Biomatters Ltd*) para análise de qualidade e edição comparativa das sequências. Sequências alinhadas foram analisadas para polimorfismos como inserções e deleções, e polimorfismos sinônimos ou não sinônimos presentes entre os isolados de *A. flavus* aflatoxigênicos e não aflatoxigênicos pertencentes a hospedeiros da castanha do Brasil, castanha de caju e amendoim.

O estudo da diversidade nucleotídica foi estimado usando θ , estimador de Watterson de $4N_e\mu$ por par de base, onde N_e é o tamanho efetivo da população e μ a taxa de mutação (Watterson, 1975), e π , é a media do numero de diferenças par a par por nucleotídeo entre as sequencias, diversidade nucleotidica (Tajima, 1983). O teste D de Tajima (Tajima, 1989) foi usado para veriicar se há desvio no equilíbrio mutação deriva e análises de haplótipos e desequilíbrio de ligação pelo programa DnaSP 4.10 (Rozas et al., 2003; Figueiredo et al., 2008).

6 RESULTADOS

6.1 Identificação morfológica e molecular da região rDNA ITS, e dos genes β -tubulina e calmodulina dos fungos presentes em castanha do Brasil da região Amazônica, Acre e Amapá

A identificação taxonômica clássica morfológica dos fungos isolados a partir da castanha do Brasil, coletadas em cooperativas da região Amazônica, das regiões Manicoré, Itacoatiara, Caroebe e Humaitá, e Amapá, contrastam com a análise molecular. Entretanto, a identificação taxonômica morfológica das amostras coletadas da região do Acre, corroboram com os resultados BLASTn (tabela 3).

A análise BLASTn das sequências das regiões rDNA ITS, β -tubulina e calmodulina contra amostras tipo (*ex-type*) de espécies de *Aspergillus* depositadas no Genbank, revelaram similaridade entre 99 e 100% com quatro espécies de *Aspergillus*. As espécies identificadas foram *A. flavus*, *A. nomius*, *A. tamarii* e *A. fumigatus*. Na região Amazônica, foram identificados 17 isolados de *A. nomius* e três isolados de *A. tamarii*. No Acre foram identificados 18 isolados de *A. flavus* e um isolado de *A. nomius*. No Amapá foram identificados 20 isolados de *A. nomius* e um isolado de *A. fumigatus*. Resultados da análise BLASTn indicam que a contaminação por aflatoxinas das castanhas do Brasil, na região Norte do Brasil, é predominantemente por isolados de *A. flavus* e *A. nomius* (tabela 3). Apesar do número total de isolados identificados de *A. flavus* e *A. nomius* ser similar, esses números variaram consideravelmente entre as regiões de coleta. *A. flavus* comumente encontrado no Estado do Acre, e *A. nomius* com maior frequência nos Estados do Amapá e Amazonas.

C4/184																	
MAK1-C4/196	Amapá	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nomius</i>	90%	0	100%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	EF661531.1
I3C1PL1K7	Amapá	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nomius</i>	96%	0	100%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	AY017544.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	EF661531.1
I2C4PL4K7	Amapá	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	97%	0	100%	EF669931.1						<i>A. fumigatus</i>	100%	0.0	100%	KC701201.1
I1A6PL6	Amapá	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nomius</i>	93%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	99%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	EF661531.1
I2C5PL5NAT35	Amapá	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nomius</i>	95%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	97%	0.0	89%	AY017553.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	EF661529.1
I1C1PL1	Amapá	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nomius</i>	99%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	97%	0.0	96%	AY017553.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	EF661529.1
I4C1PL1	Amapá	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nomius</i>	97%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	97%	0.0	90%	AY017553.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	EF661529.1
I3A5PL5	Amapá	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nomius</i>	96%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	97%	AY017553.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	EF661529.1
I2C2PL2	Amapá	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nomius</i>	99%	0	100%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	AY017544.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	EF661531.1
16C	Coari	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	100%	0	100%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	97%	0.0	95%	AY017544.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	EF661531.1
44C	Coari	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	100%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	99%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	99%	EF661531.1
90H	Humaitá	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	99%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	99%	EF661531.1
121H	Humaitá	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	92%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	AY017544.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	EF661531.1
127H	Humaitá	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	100%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	AY017544.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	99%	EF661531.1
142H	Humaitá	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	100%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	97%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	99%	0.0	100%	EF661531.1
161H	Humaitá	<i>A. flavus</i>	<i>A. tamarii</i>	100%	0	100%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	99%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	99%	EF661531.1
25I	Itacoatiara	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	100%	0	100%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	98%	0.0	97%	AY017544.1	<i>A. nomius</i>	99%	0.0	100%	EF661531.1
34I	Itacoatiara	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	100%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	98%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	EF661531.1
41I	Itacoatiara	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	100%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	99%	0.0	97%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	99%	EF661531.1
64I	Itacoatiara	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	100%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	99%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	99%	EF661531.1
65I	Itacoatiara	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	100%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	98%	0.0	96%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	EF661531.1
70I	Itacoatiara	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	100%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	97%	0.0	90%	AY017561.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	99%	GQ221263.1
75I	Itacoatiara	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	92%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	99%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	EF661531.1
17M	Manicoré	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	100%	0	100%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	96%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	99%	0.0	100%	EF661531.1
25M	Manicoré	<i>A. flavus</i>	<i>A. tamarii</i>	100%	0	100%	AF004929.1	<i>A. tamarii</i>	76%	0.0	98%	HE577819.1	<i>A. tamarii</i>	100%	0.0	99%	EU021686.1
26M	Manicoré	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	100%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	97%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	99%	0.0	100%	EF661531.1
27M	Manicoré	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	100%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	99%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	99%	EF661531.1
29M	Manicoré	<i>A. flavus</i>	<i>A. tamarii</i>	100%	0	100%	AF004929.1										
32M	Manicoré	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	100%	0	99%	AF027860.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	98%	AY017551.1	<i>A. nomius</i>	100%	0.0	100%	EF661531.1

6.2 Caracterização de isolados do Gênero *Aspergillus* quanto a produção de aflatoxinas.

Análise de caracterização de isolados de *Aspergillus* seção *Flavi* contrastando com a produção de micotoxinas, realizada por meio de UPLC/MS/MS, foi feita em parceria com a Embrapa CTAA, RJ. A partir da análise qualitativa do potencial micotoxigênico das amostras de *A. flavus* e *A. nomius* isolados da castanha do Brasil coletadas das regiões do Acre e Amapá, os resultados confirmam a posição taxonômica de acordo com a análise BLASTn. Isolados de *A. flavus* tiveram detectados as micotoxinas AFB1, AFB2 e ACP em 12 amostras avaliadas, e a detecção de AFB1 e ACP em outras cinco amostras. Dentre as 17 amostras de *A. flavus* analisadas, cinco tiveram a detecção de somente AFB e 12 tiveram a detecção de AFB e AFG. Os isolados de *A. nomius* avaliados, tiveram as micotoxinas AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 detectadas em cinco amostras. Uma amostra teve a detecção de AFB1 e AFG1, e uma amostra teve a detecção de AFB1, AFG1 e AFG2. Para todas as amostras de *A. nomius* analisada, a micotoxina ACP não foi detectada (tabela 4).

Resultados da análise de caracterização, quanto a produção de aflatoxinas, de 70 amostras de *A. flavus* isolados de castanha do Brasil e amendoim, coletados da região Norte e Nordeste do Brasil foram comparados. A análise UPLC/MS/MS quantificou a produção de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 de quatro amostras, onde duas tiveram a produção de ACP. As AFB1, AFB2 e ACP foram detectadas em 24 amostras, e AFB1 e ACP em 30 amostras. Oito amostras tiveram somente o ACP detectado, e em quatro amostras não foram detectadas nenhuma micotoxina. 94% das amostras de *A. flavus* analisadas produziram ACP e AK em grandes quantidades (tabela 5). A partir da análise CCD prévia (Midorikawa, 2009), somente AFB1 e AFG1 foram detectadas. Comparações entre as duas metodologias confirmam que a sensibilidade e confiabilidade do método de UPLC/MS/MS em relação ao CCD para análise de produção de aflatoxinas.

Tabela 4: Caracterização, por meio de UPLC/MS/MS, de *Aspergillus* da seção *Flavi* aflatoxigênico. Informações quanto a identificação do isolado, origem geográfica da coleta das amêndoas, hospedeiro de origem e micotoxinas detectadas, estão descritas. aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1), aflatoxina G2 (AFG2), aflatoxina M1 (AFM1), Acido Kojico (AK) e ácido ciclopiazônico (ACP). Micotoxinas não detectadas são representadas por ND. Os sinais + e ++ correspondem à produção de aflatoxina dentro do limite de quantificação da curva de calibração e produção acima do limite da curva de calibração, respectivamente. Os limites de quantificação correspondente à AFB1 0,13 µg/kg, AFB2 0,12 µg/kg, AFG1 0,08 µg/kg, e AFG2 0,11 µg/kg e ACP 0,2 µg/kg.

Identificação do Isolado	Origem Geográfica	Hospedeiro	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	ACP
CMEA_1	Acre	<i>Bertholletia excelsa</i>	+	+	+	ND	+
CMEA_2	Acre	<i>B. excelsa</i>	+	ND	ND	ND	++
CMEA_3	Acre	<i>B. excelsa</i>	+	+	ND	ND	++
CMEA_5	Acre	<i>B. excelsa</i>	+	+	++	ND	++
CMEA_6	Acre	<i>B. excelsa</i>	+	+	ND	+	++
CMEA_8	Acre	<i>B. excelsa</i>	++	++	++	+	++
CMEA_9	Acre	<i>B. excelsa</i>	+	+	ND	ND	++
CMEA_10	Acre	<i>B. excelsa</i>	+	ND	++	+	++
CMEA_11	Acre	<i>B. excelsa</i>	+	ND	+	ND	++
CMEA_12	Acre	<i>B. excelsa</i>	+	ND	+	ND	++
CMEA_13	Acre	<i>B. excelsa</i>	+	ND	ND	ND	++
CMEA_18	Acre	<i>B. excelsa</i>	+	+	ND	+	++
CMEA_19	Acre	<i>B. excelsa</i>	+	++	ND	ND	++
CMEA22	Acre	<i>B. excelsa</i>	+	+	++	+	++
CMEA_25	Acre	<i>B. excelsa</i>	++	++	+++	++	+
CMEA_29	Acre	<i>B. excelsa</i>	++	++	+	ND	++
CMEA_30	Acre	<i>B. excelsa</i>	++	++	+	ND	++
I3C1PI1	Amapá	<i>B. excelsa</i>	+	+	+	+	ND
I1A6PI6	Amapá	<i>B. excelsa</i>	+	+	+	+	ND
I2C5PI5*	Amapá	<i>B. excelsa</i>	+	++	+	+	ND
I1C1PI1	Amapá	<i>B. excelsa</i>	+	ND	+	ND	ND
I4C1PI1	Amapá	<i>B. excelsa</i>	+	ND	+	+	ND
I3 A5PI5	Amapá	<i>B. excelsa</i>	++	++	++	++	ND
I2C2PI2	Amapá	<i>B. excelsa</i>	+	+	++	+	ND

Tabela 5: Caracterização CCD e UPLC-FLD de *A. flavus*. A tabela mostra informações quanto a identificação do isolado, origem geográfica da coleta das amêndoas, hospedeiro de origem e toxinas produzidas, aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1), aflatoxina G2 (AFG2), aflatoxina M1 (AFM1), Acido Kojico (AK) e ácido ciclopiazônico (ACP). Micotoxinas não detectadas são representadas por ND.

Número do isolado	Localidade (Brasil)	Hospedeiro	Análise CCD								Análise UPLC-FLD						
			Cultivos em meio semi-sólido Yeast Extract Sucrose (YES)				Cultivos em meio semi-sólido Czapek Yeast Autolysate (CYA)				Cultivo em meio semi-sólido Yeast Extract Sucrose (YES) Wa 0,99						
			AFB1 (PPB)	AFB2 (PPB)	AFG1 (PPB)	AFG2 (PPB)	AFB1 (PPB)	AFB2 (PPB)	AFG1 (PPB)	AFG2 (PPB)	AFB1 (mg/L)	AFB2 (mg/L)	AFG1 (mg/L)	AFG2 (mg/L)	AFM1 (mg/L)	ACP (mg/L)	AK* (mg/L)
UCB001	Fortaleza (Feira) (origem Amazonas)	<i>Bertholletia excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	48.665	688
UCB002	Fortaleza (Feira) (origem Amazonas)	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UCB003	Belém (origem Amazonas)	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	450	ND	ND	ND	ND	37.790	682
UCB004	Belém (origem Amazonas)	<i>B. excelsa</i>	20	ND	ND	ND	50	ND	ND	ND	1.849	43	ND	ND	41	35.912	716
UCB005	Belém (origem Amazonas)	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	62	ND	ND	ND	ND	10.462	814
UCB006	Belém (origem Amazonas)	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	6.487	176	ND	ND	298	9.976	1.772
UCB007	Belém (origem Amazonas)	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	516	ND	ND	ND	ND	36.065	1.372
UCB008	Belém (origem Amazonas)	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	199	ND	ND	ND	ND	29.732	799
UCB009	Beribe County, CE	<i>Anarcardium occidentale</i>	10	ND	100	ND	10	ND	50	ND	6.846	359	ND	ND	422	76.494	2.723
UCB010	Beribe County, CE	<i>A. occidentale</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.586	138	ND	ND	103	44.343	1.600
UCB011	Beribe County, CE	<i>A. occidentale</i>	50	ND	ND	ND	10	10	ND	ND							
UCB012	Beribe County, CE	<i>A. occidentale</i>	10	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND	719	ND	ND	ND	16	17.887	1.263
UCB013	Beribe County, CE	<i>A. occidentale</i>	20	ND	ND	ND	50	ND	ND	ND	7	ND	ND	ND	ND	31.145	2.569
UCB014	Beribe County, CE	<i>A. occidentale</i>	20	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	267	ND	ND	ND	ND	43.885	223
UCB015	Beribe County, CE	<i>A. occidentale</i>	50	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	224	ND	ND	ND	ND	45.804	963
UCB016	Beribe County, CE	<i>A. occidentale</i>	50	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND							
UCB017	Beribe County, CE	<i>A. occidentale</i>	50	10	ND	ND	50	ND	ND	ND							
UCB018	São Raimundo Nonato, Piauí	<i>A. occidentale</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UCB019	São Raimundo Nonato, Piauí	<i>A. occidentale</i>	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	41	ND	ND	ND	ND	51.615	3.084
UCB020	São Raimundo Nonato, Piauí	<i>A. occidentale</i>	B1	ND	ND	ND	10	ND	100	ND	211	ND	ND	ND	ND	1.735	1.023

UCB021	São Raimundo Nonato, Piauí	<i>A. occidentale</i>	50	ND	ND	ND	20	ND	ND	ND							
UCB022	São Raimundo Nonato, Piauí	<i>A. occidentale</i>	50	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	4.694	199	ND	ND	127	50.119	2.369
UCB023	São Raimundo Nonato, Piauí	<i>A. occidentale</i>	20	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	1.815	52	ND	ND	56	46.216	1.298
UCB024	São Raimundo Nonato, Piauí	<i>A. occidentale</i>	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	780	22	ND	ND	26	12.831	645
UCB025	São Raimundo Nonato, Piauí	<i>A. occidentale</i>	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	36.535	3.326
UCB026	São Raimundo Nonato, Piauí	<i>A. occidentale</i>	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	24	ND	ND	ND	ND	37.659	3.434
UCB027	São Raimundo Nonato, Piauí	<i>A. occidentale</i>	10	ND	ND	ND	50	ND	ND	ND	459	ND	ND	ND	ND	27.198	1.090
UCB028	São Raimundo Nonato, Piauí	<i>A. occidentale</i>	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	221	ND	ND	ND	ND	2.338	1.317
UCB029	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	20	ND	50	ND	10	ND	50	ND	15	ND	ND	ND	ND	35.743	2.849
UCB030	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.002
UCB031	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	143	ND	ND	ND	ND	19.931	406
UCB032	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	2	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND	70	ND	ND	ND	ND	4.174	760
UCB033	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	2.556	58	8.135	285	1.028	ND	219
UCB034	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	B1	ND	ND	ND	50	ND	50	ND							
UCB035	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	10	ND	ND	ND	50	ND	ND	ND	226	ND	ND	ND	ND	4.753	344
UCB036	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21.145	1.292
UCB037	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	50	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	1.403	47	ND	ND	32	16.375	463
UCB038	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	373	ND	ND	ND	ND	8.229	595
UCB039	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.932	135	ND	ND	87	22.676	679
UCB040	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	50	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	400	ND	ND	ND	ND	16.210	657
UCB041	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND							
UCB042	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	10	ND	ND	ND	50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5.373	820
UCB043	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	518	ND	ND	ND	ND	1.656	791
UCB044	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	28.391	1.028
UCB045	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5.669	119	12.141	341	2.175	1.116	324
UCB046	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	50	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND	38.778	1.861
UCB047	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	50	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	4.998	203	ND	ND	203	50.316	1.257
UCB048	Amazonas	<i>B. excelsa</i>	10	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	452	ND	ND	ND	ND	51.751	1.670
UCB049	Acre	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND	46.779	2.389
UCB050	Acre	<i>B. excelsa</i>	10	ND	ND	ND	50	ND	100	ND	9.047	167	17.624	593	3778	1.186	571
UCB051	Acre	<i>B. excelsa</i>	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND							
UCB052	Acre	<i>B. excelsa</i>	50	ND	100	ND	10	ND	30	ND	5.983	110	16.002	572	3048	ND	520
UCB053	Acre	<i>B. excelsa</i>	50	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND							

UCB054	Acre	<i>B. excelsa</i>	10	ND	2	ND	ND	ND	ND	ND	493	ND	ND	ND	ND	54.755	1.558
UCB055	Para	<i>B. excelsa</i>	10	ND	ND	ND	50	ND	ND	ND	846	16	ND	ND	ND	2.582	1.187
UCB056	Para	<i>B. excelsa</i>	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	339	ND	ND	ND	ND	1.802	1.158
UCB057	Para	<i>B. excelsa</i>	10	ND	50	ND	ND	ND	ND	ND							
UCB058	Para	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	1	ND	1	ND							
UCB059	Para	<i>B. excelsa</i>	10	ND	ND	ND	20	ND	30	ND	592	ND	ND	ND	ND	50.392	1.772
UCB060	Para	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9	ND	ND	ND	ND	44.469	2.116
UCB061	Para	<i>B. excelsa</i>	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND							
UCB062	Para	<i>B. excelsa</i>	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND							
UCB063	Para	<i>B. excelsa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND							
UCB 64	Fortaleza	<i>Arachis hypogaea</i>	20	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	18.453	4.165
UCB 65	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	100	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	6.861	409	ND	ND	323	36.273	2.135
UCB 66	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	10	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	1.707	102	ND	ND	78	7.743	203
UCB 67	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	901	45	ND	ND	68	8.183	1.200
UCB 68	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	10	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	1.079	60	ND	ND	73	10.003	1.498
UCB 69	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	100	ND	ND	ND	50	ND	ND	ND	2.906	146	ND	ND	195	17.700	2.411
UCB 70	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	23	ND	ND	ND	ND	3.171	989
UCB 71	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	20	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	8	ND	ND	ND	ND	15.503	2.021
UCB 72	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.548	66	ND	ND	61	2.818	451
UCB 74	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19	ND	ND	ND	ND	2.871	792
UCB 75	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	50	ND	ND	ND	50	ND	ND	ND	2.047	101	ND	ND	89	19.489	1.062
UCB 76	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	930	48	ND	ND	77	7.294	792
UCB 77	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	50	ND	ND	ND	50	ND	ND	ND	874	22	ND	ND	27	4.708	1.394
UCB 78	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	10	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	1.070	58	ND	ND	49	8.701	1.304
UCB 80	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.933	130	ND	ND	88	3.358	100
UCB 81	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	ND	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	43
UCB 82	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.405	417
UCB 84	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	70	ND	ND	ND	50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.657	398
UCB 85	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	100	ND	ND	ND	50	ND	ND	ND	677	33	ND	ND	26	12.425	1.122
UCB 86	Fortaleza	<i>A. hypogaea</i>	100	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	652	40	ND	ND	15	2952	93

6.3 Caracterização da região mtDNA SSU rDNA das espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* aflatoxigênicos

A partir do alinhamento de sequências disponíveis no Genbank da região gênica do mtDNA SSU rDNA de diversas espécies de *Aspergillus*, *primers* específicos para o Gênero, ASP_GEN_MTSSU_F1 e ASP_GEN_MTSSU_R1, foram desenhados para gerar um amplicon de 480pb (Midorikawa, 2009). Análises *in silico* foram realizadas para garantir a especificidade do par de *primers*. Por meio de PCR eletrônica, sequências da região mtDNA SSU rDNA disponíveis no Genbank das espécies pertencentes ao Gênero *Aspergillus* e de fungos previamente descritos em castanha do Brasil (Costa et al., 2009), foram testadas quanto a especificidade dos *primers*. Análise BLASTn dos *primers* específicos, obteve resultado positivo para todas as regiões alvo do mtDNA SSU rDNA de espécies de *Aspergillus* disponíveis, assim como, os seus teleomorfos do Gênero *Chaetosartorya*, *Emericella*, *Eurotium* e *Petromyces*. Todas as outras espécies de fungos descritas em castanha do Brasil, não foram encontrados sítios de anelamento para os *primers* ASP_GEN_MTSSU_F1 e ASP_GEN_MTSSU_R1.

O sistema foi validado por meio de reação de PCR usando DNA genômico dos isolados UCB36, UCB40 e UCB44 de *A. flavus*, e de isolados representantes das espécies de *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium citrinum*, *Trichoderma harzianum* e *Cladosporium cladosporioides*. Um controle interno de amplificação (IAC) foi usado em cada reação para evitar resultados falso negativos (Radstrom et al., 2003). Amplicons com tamanhos esperados para espécies do Gênero *Aspergillus* foram obtidos, revelando que o sistema de PCR específica é robusto (figura 10) (Midorikawa, 2009).

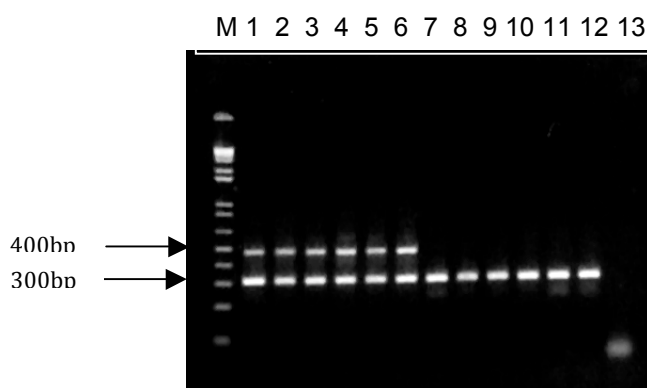


Figura 10: Amplificação por PCR específica de uma região mtDNA SSU rDNA exclusivamente em membros do genero *Aspergillus*, com co-amplificação de um IAC. M: marcador 1 Kb ladder Plus; 1 ao 3: isolados UCB036, UCB040 e UCB044 de *A. flavus*; 4: isolado 1 de *A. awamori*; 5: isolado 1 de *A. fumigatus*; 6: isolado 1 de *A. niger*; 7 e 8: isolados CMUnB 1824 e 1848 de *F. solani* f. sp. *glycines*; 9: isolado CMUnB 1974 de *F. solani*; 10: isolado 1 de *Penicillium citrinum*; 11: isolado 1 de *Trichoderma harzianum*; 12: isolado 1 de *Cladosporium cladosporioides*; 13: controle negativo (adaptado de Midorikawa, 2009).

Uma nova validação da especificidade dos *primers* ASP_GEN_MTSSU_F1 e ASP_GEN_MTSSU_R1, usando amostras de castanha do Brasil naturalmente contaminadas

por *Aspergillus*, mostrou que a amplificação do amplicon específico é possível usando até no mínimo de 10 ng de DNA total extraído de castanha do Brasil (figura 11).

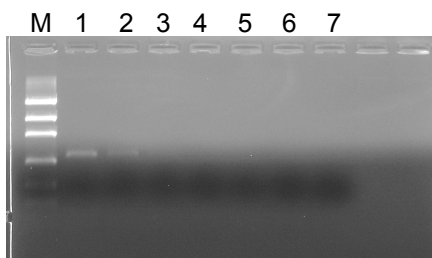


Figura 11: Amplificação por PCR específica de uma região mtDNA SSU rDNA de *Aspergillus*. M: marcador Low DNA MASS ladder (Invitrogen); 1-7: Gradiente de concentração do DNA total de castanha do Brasil contaminada por *Aspergillus* variando em 20 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg e 1 pg.

6.4 Análise PCR RFLP da região mtDNA SSU rDNA de espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi*

Mapas de restrição foram realizados para a região mtDNA SSU rDNA específica das espécies de *Aspergillus* com ocorrência em castanha do Brasil. Pequenas diferenças nas sequências nucleotídicas entre as espécies foi detectada. A endonuclease de restrição *DraI* foi selecionada por apresentar dois sítios, nas posições 170 e 407 pb, que diferenciam as espécies da seção *Flavi* aflatoxigênicas *A. flavus*, *A. nomius*, *A. parasiticus* e *A. tamarii*, gerando fragmentos de 30, 170 e 237pb. Espécies como, *A. terreus*, *A. ochraceus*, *A. niger* e *A. fumigatus*, possuem somente um sítio de restrição na posição 170, gerando fragmentos de 189 e 286pb (anexo 1). Padrões de digestão semelhante foram encontrados para sequências da região mtDNA SSU rDNA disponíveis no Genbank para as espécies da seção *Flavi* *A. oryzae* e *A. sojae*, assim como, os sinônimos de *A. flavus*: *A. kambarensis*, *A. subolivaceus* e *A. thomii*, e para o sinônimo de *A. tamarii*: *A. terricola* (Varga et al., 2011).

A validação da PCR RFLP para identificação e diferenciação de espécies membro do grupo *Aspergillus* seção *Flavi* foi conduzida com isolados representantes de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. tamarii*, *A. fumigatus*, *A. nomius*, *A. versicolor*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *Emericella* spp., teleomorfo de *Aspergillus*. Um amplicon de 480 pb foi amplificado em isolados de *Aspergillus* com primers ASP_GEN_MTSSU_F1 e ASP_GEN_MTSSU_R1 (figura 12). O amplicon de cada amostra foi usado para digestão por meio da enzima *DraI* (Invitrogen). Os padrões de digestão visualizados foram de acordo com o esperado a partir dos mapas de restrição, diferenciando as espécies da seção *Flavi* aflatoxigênicas. Enquanto um fragmento comum de 170pb foi observado em todas as espécies de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. tamarii*, *A. fumigatus*, *A. nomius*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. ochraceus*, fragmentos de 237pb e 30pb foram observados exclusivamente para espécies do grupo *Aspergillus* da seção *Flavi* aflatoxigênicos (figura 13). Resultados de validação desse sistema de PCR RFLP, em conjunto com padrões de digestão visualizados, estão de acordo com a análise *in silico*.

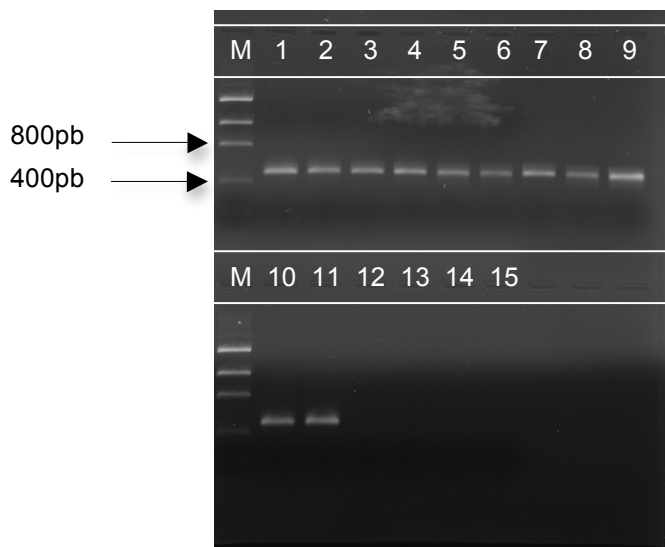


Figura 12: Amplificação por PCR da região mtDNA SSU rDNA por meio de *primers* específicos de *Aspergillus*, ASP_GEN_MTSSU_F₁ e ASP_GEN_MTSSU_R₁. M: Marcador molecular Low DNA MASS Ladder (Invitrogen); 1: *A. flavus* UBC 30; 2: *A. parasiticus*; 3: *A. tamarii*; 4: *A. fumigatus*; 5: *A. nomius*; 6: *A. versicolor*; 7: *A. terreus*; 8: *A. niger*; 9: *A. ochraceus*; 10 e 11: *Emericella* ssp.; 12: *Penicillium citrinum*; 13: *Trichoderma brevicompactum*; 14 e 15: *Fusarium solani*.

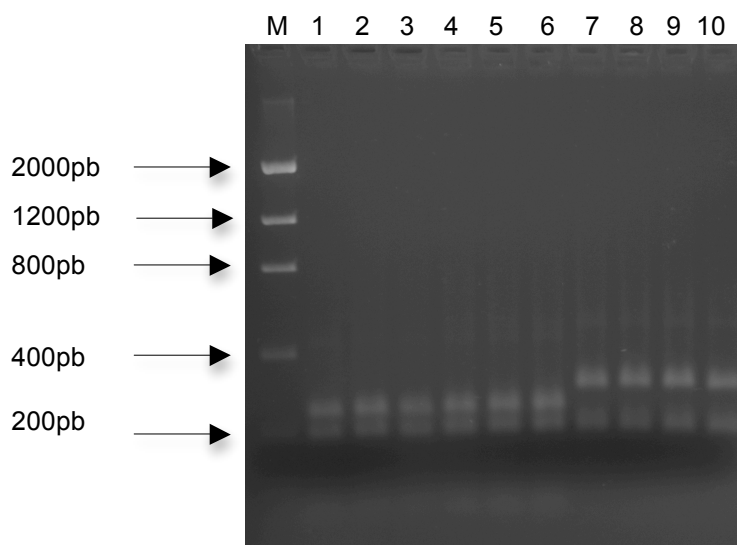


Figura 13: Digestão pela enzima *DnaI* (Invitrogen) do produto de PCR da região mtDNA SSU rDNA amplificado pelo par de *primers* específicos de *Aspergillus*, ASP_GEN_MTSSU_F₁ e ASP_GEN_MTSSU_R₁. 1-3: *A. flavus* UBC 13, UCB 30 e UCB 27; 4: *A. parasiticus*; 5: *A. nomius*; 6: *A. tamarii*; 7: *A. fumigatus*; 8: *A. terreus*; 9: *A. niger*; 10: *A. ochraceus*; M: Marcador molecular Low DNA MASS Ladder (Invitrogen).

6.5 Caracterização da diversidade nucleotídica dos genes *aflR*, *aflP* e *aflQ* da via biossintética de *A. flavus* aflatoxigênico e não aflatoxigênico.

Em busca da caracterização da diversidade nucleotídica dos genes, *aflP*, *aflQ* e *aflR* da via biossintética entre isolados de *A. flavus* contrastando na produção de aflatoxinas, um conjunto de 13 pares de *primers* flaqueadores desses três genes foram desenvolvidos e

otimizados em estudo prévio (Midorikawa, 2009). A partir de um conjunto de 28 isolados de *A. flavus* contendo, produtor de AFB1: UCB3, UCB5, UCB7, UCB8, UCB15, UCB26, UCB28, UCB40, UCB43, UCB49; produtor de AFB1 e AFB2: UCB4, UCB6, UCB9, UCB10, UCB22, UCB47; e não produtor de AF: UCB1, UCB2, UCB18, UCB25, UCB36, UCB42, UCB44, UCB64, UCB81, UCB82, UCB84 (tabela 5), 364 amplicons, variando entre 470 – 500pb, foram gerados.

Análise da diversidade nucleotídica dos três genes estudados, foram identificados um total de 96 polimorfismos em 4.643pb. A região do gene *afIP*, abrangendo 1178pb, 49 sítios polimórficos foram identificados nas posições: 11, 30, 31, 50, 108, 109, 123, 145, 158, 218, 257, 415, 432, 437, 571, 580, 589, 592, 614, 615, 696, 755, 859, 873, 927, 979, 985, 993, 1009, 1024, 1042, 1045, 1057, 1082, 1083, 1089, 1110, 1116, 1118, 1123, 1125, 1132, 1133, 1134, 1135, 1153, 1156, 1165, 1170. 15 sítios polimórficos foram identificados em regiões não codantes e 32 em regiões codantes, resultando em 12 mutações *nonsense*. A diversidade nucleotídica calculada para π foi de 0,01769 e para θ foi de 0,01069. Teste D Tajima foi de 2,43802 com significância de $P < 0,05$. Um total de 18 haplótipos foram identificados, sendo os haplótipos 14 e 17 mais frequentes, presentes nos isolados UCB30, UCB 43, UCB44 e UCB47, e UCB42, UCB81, UCB82, UCB84, respectivamente (tabela 6). O padrão entre a correlação do coeficiente ($0,58 < r^2 < 0,50$) com a distância em pares de base do gene *afIP*, ilustrou um desequilíbrio de ligação em decaimento na população de *A. flavus* (figura 14). A porção final do gene *afIP*, abrangendo as regiões homólogas aos *primers afIP4* não pode ser amplificada e foi excluída da análise.

A análise do contig de 2.021pb do gene *afIQ*, identificou 39 polimorfismos nas posições: 6, 30, 54, 141, 189, 198, 261, 295, 380, 390, 439, 445, 503, 560, 693, 769, 926, 927, 960, 1092, 1115, 1130, 1184, 1199, 1249, 1256, 1293, 1545, 1556, 1573, 1593, 1597, 1628, 1681, 1739, 1962 e 2002. 18 sítios polimórficos foram identificados em regiões não codantes e 21 em regiões codantes, onde 5 apresentaram mutações *nonsense*. A diversidade nucleotídica π foi de 0,00687 e θ foi de 0,00484. Teste D Tajima não foi significativo com $D = 1,56386$ e $P > 0,10$. 16 haplótipos foram identificados. O haplótipo 14 foi o mais frequente, identificado nos isolados UCB22, UCB30, UCB36, UCB43, UCB44 e UCB47. Os isolados UCB42, UCB81, UCB82 e UCB84 foram agrupados em um mesmo haplótipo como na análise do contig *afIP* (tabela 6). O desequilíbrio de ligação do gene *afIQ*, em comparação com o gene *afIP*, foi mais baixo ($0,28 > r^2 > 0,04$) (figura 15).

Já no contig do gene *afIR*, foram identificados dez sítios polimórficos em 1.444pb nas posições: 140, 153, 211, 273, 640, 767, 927, 1030 e 1326. Os nove sítios polimórficos foram identificados na região codante e um sítio na região não codante. Duas mutações *nonsense* foram identificadas. A diversidade nucleotídica π foi de 0,00238 e θ foi de 0,00160. Teste D Tajima não foi significativo com $D = 1,53415$ e $P > 0,10$. Os valores não significativos para o teste D de Tajima dos genes *afIQ* e *afIR*, indicam a presença de alelos divergentes e seleção balanceada nos isolados de *A. flavus*. O contig formado pelos 28 isolados foi agrupado em 11 haplótipos. O haplótipo observado com maior frequência foi agrupou os isolados UCB9,

UCB30, UCB43, UCB44, UCB47 e UCB49. Novamente os isolados UCB81, UCB82 e UCB84 foram agrupados em um mesmo haplótipo (tabela 6). Já para o gene *aflR*, o desequilíbrio de ligação ($0,12 > r^2 > 0,13$) foi o mais baixo dos três genes analisados, mostrando que a população de *A. flavus* está próxima ao equilíbrio (figura 16).

Tabela 6: Identificação das amostras analisadas, haplótipos identificados nos genes *aflP*, *aflQ* e *aflR*, concentração de aflatoxina B produzida por cada isolado, e concentração de ácido ciclopiazônico produzido por cada isolado. Os haplótipos são definidos individualmente por cada gene. As concentrações de toxinas são definidas em µg/L. Concentrações de toxinas não detectadas são apresentadas por ND.

Isolado UCB	Haplótipos			AF (µg/L)	ACP (µg/L)
	<i>aflP</i>	<i>aflQ</i>	<i>aflR</i>		
1	H1	H1	H1	AFB (ND)	ACP (48.665)
2	H1	H1	H1	AFB (ND)	ACP (ND)
18	H10	H4	H4	AFB (ND)	ACP (ND)
25	H12	H5	H1	AFB (ND)	ACP (36.535)
30	H14	H14	H9	AFB (ND)	ACP (ND)
36	H15	H14	H7	AFB (ND)	ACP (21.145)
42	H17	H7	H8	AFB (ND)	ACP (5.373)
44	H14	H14	H9	AFB (ND)	ACP (28.391)
64	H12	H6	H1	AFB (ND)	ACP (18.453)
81	H17	H7	H10	AFB (ND)	ACP (ND)
82	H17	H7	H10	AFB (ND)	ACP (1.405)
84	H17	H7	H10	AFB (ND)	ACP (1.657)
3	H2	H8	H8	AFB1 (450)	ACP (37.790)
5	H4	H10	H2	AFB1 (62)	ACP (10.462)
7	H6	H12	H4	AFB1 (516)	ACP (36.065)
8	H4	H10	H4	AFB1 (199)	ACP (29.732)
15	H9	H13	H4	AFB1 (224)	ACP (45.804)
26	H12	H3	H1	AFB1 (24)	ACP (37.659)
28	H13	H2	H3	AFB1 (221)	ACP (2.338)
40	H16	H15	H6	AFB1 (400)	ACP (16.210)
43	H14	H14	H9	AFB1 (518)	ACP (1.656)
49	H18	H16	H9	AFB1 (10)	ACP (46.779)
4	H3	H11	H3	AFB1 (1.849) AFB2 (43)	ACP (35.912)
6	H5	H13	H11	AFB1 (6.487) AFB2 (176)	ACP (9.976)
9	H7	H9	H9	AFB1 (6.846) AFB2 (359)	ACP (76.494)
10	H8	H9	H5	AFB1 (3.586) AFB2 (138)	ACP (44.343)
22	H11	H14	H5	AFB1 (4.694) AFB2 (199)	ACP (50.119)
47	H14	H14	H9	AFB1 (4.998) AFB2 (203)	ACP (50.316)

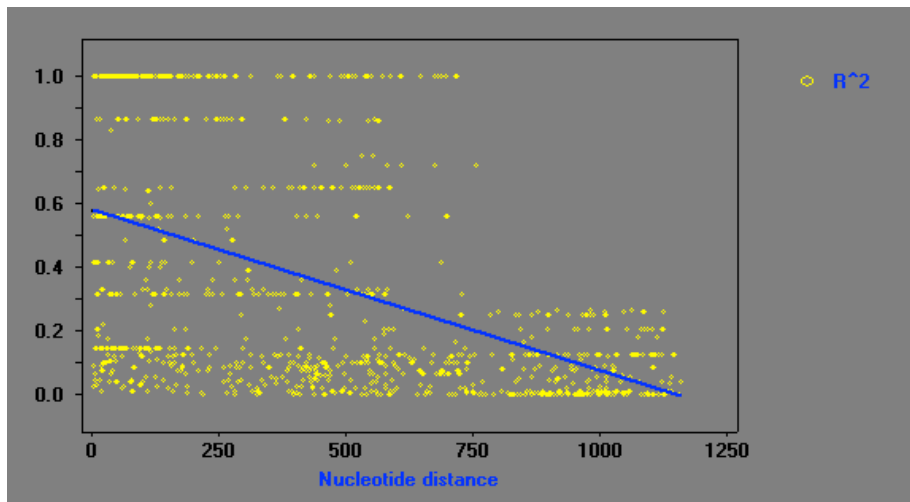


Figura 14: Desequilíbrio de ligação do gene *aflP*. Correlação par-a-par entre SNPs são plotadas contra a distância física entre os SNPs em pares de bases. A linha reta é referente ao valor de r^2 .

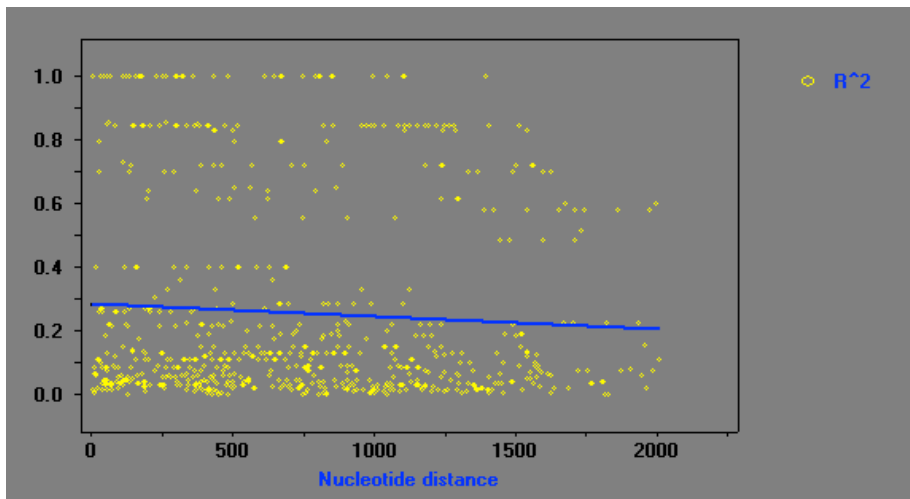


Figura 15: Desequilíbrio de ligação do gene *aflQ*. Correlação par-a-par entre SNPs são plotadas contra a distância física entre os SNPs em pares de bases. A linha reta é referente ao valor de r^2 .

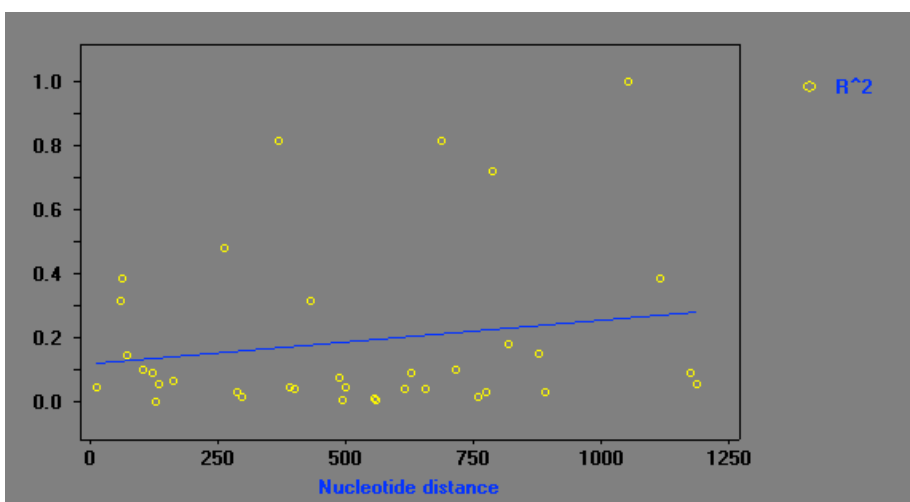


Figura 16: Desequilíbrio de ligação do gene *aflR*. Correlação par-a-par entre SNPs são plotadas contra a distância física entre os SNPs em pares de bases. A linha reta é referente ao valor de r^2 .

7 DISCUSSÃO

7.1 Identificação morfológica e molecular da região rDNA ITS, e dos genes β -tubulina e calmodulina dos fungos presentes em castanha do Brasil da região Amazônica, Acre e Amapá

Fungos pertencentes ao Gênero *Aspergillus*, compreendem mais de 180 espécies anamórficas (Pitt et al., 2000), divididos em subgêneros, os quais são divididos em seções (Klich, 2002). Assim como fungos em geral, a taxonomia do Gênero *Aspergillus* é complexa e sempre está evoluindo. Características morfológicas são facilmente aplicadas na identificação do Gênero. Entretanto, para a identificação de espécies classificadas numa mesma seção, como a seção *Flavi*, a diferenciação é complexa onde algumas espécies podem não ser diferenciadas baseada somente nas características morfológicas (Frisvad et al. 2005; Pildain et al. 2008; Rodrigues et al., 2007).

Análise BLASTn das regiões rDNA ITS, β -tubulina e calmodulina contra sequências de amostras tipo disponíveis no banco de dados NCBI, confirmaram que as espécies de *Aspergillus* seção *Flavi* aflatoxigênicas, presentes com maior abundância nas castanhas do Brasil da região Norte do País são *A. flavus* e *A. nomius*. Essas duas espécies representaram mais de 85% de todas as espécies de *Aspergillus* isolada. Diversos estudos sobre a microbiota da castanha-do-Brasil foram realizados, onde as espécies de *Aspergillus* comumente encontradas foram *A. flavus*, *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. niger* e *A. tamarii* (Freire et al., 2000; Olsen et al., 2008; Gonçalves et al., 2012).

Análises qualitativas para produção de micotoxinas de espécies representativas de diferentes Estados coletados, corroboram com a análise BLASTn, com *A. flavus* produzindo AFB e ACP, e *A. nomius* produzindo AFB e AFG (Olsen et al., 2008; Dorner et al., 1984; Rodrigues et al., 2007). Apesar de *A. flavus* ser descrito como o fungo aflatoxigênico dominante em castanha do Brasil (Freire et al. 2000, Arrus et al. 2005), *A. nomius* também é um potencial produtor de aflatoxinas contaminante da castanha do Brasil.

Análises quantitativas de aflatoxinas (AF) e ácido ciclopiazônico (ACP) de *A. flavus*, mostram que a produção de AF está associada à produção de ACP. Estudos mostram que a produção de AF/ACP não só está associada com a esterigmatocistina (ST), mas também como a morfogênese (Kato et al., 2003; Duran et al., 2007), onde sinalizações conservadas de vias metabólicas podem controlar o desenvolvimento do esclerócio de *A. flavus*. Estudos de variabilidade genética de *A. flavus* indicam a formação de um grupo parafilético, com isolados que podem produzir AFB ou AFG, e possuem esclerócio pequeno (S) ou grande (L) (Geiser et al., 2000). É sugerido que isolados S são capazes de produzir AFB e AFG, e isolados produtores somente de AFB, podem apresentar esclerócio S ou L (Geiser et al., 2000; Varga et al., 2011).

A produção em concentrações elevadas de ACP por *A. flavus*, representa uma ameaça para alimentos contaminados. O ACP, tóxico a animais e humanos, é um inibidor

específico da ATPase dependente de cálcio, incluindo alterações no transporte de íons pelas membranas celulares, e, resultando no aumento de contrações musculares (Riley and Goeger 1992). Podendo causar lesões no fígado, rim, pâncreas, tem a sua ação potencializada pela AF, com ação mutagênica e carcinogênica nesses órgãos.

Diante da grande ocorrência de *A. flavus*, *A. nomius* e *A. tamarii* em castanha do Brasil, e da capacidade dessas espécies para a produção de micotoxinas como, AFB, AFG e ACP (Pitt & Hocking, 2009), representam uma ameaça para a segurança na produção da castanha do Brasil proveniente da região Norte do País. Cuidados quanto a prevenção de ocorrência, no manejo e armazenamento, e métodos confiáveis para a identificação de fungos micotoxigênicos, são necessários.

7.2 Caracterização da região mtDNA SSU rDNA

Métodos convencionais de análise para identificação de espécies de fungos baseiam-se em análises morfológicas da colônia e estruturas do micro-organismo. A identificação morfológica de uma espécie de fungo é demorada, trabalhosa e requer conhecimento considerável do gênero do fungo analisado. Entretanto, técnicas moleculares possuem um grande potencial para a identificação rápida e precisa de fungos. A diagnose molecular de fungos baseada em PCR, oferece a especificidade e sensibilidade apropriada à detecção inicial recomendada pelo HACCP (FAO, 2003), e a identificação de pontos críticos da cadeia produtiva. A castanha do Brasil é um produto extrativista de grande importância para o Brasil, onde espécies de fungos aflatoxigênicos ocorrem em toda cadeia produtiva (Lima et al., 2012; Calderari et al., 2013). Métodos de detecção nos pontos críticos da cadeia produtiva são necessários para garantir um produto livre de micotoxinas.

O genoma de fungos possui diversas regiões comumente usadas para a identificação de espécies. A região do rDNA ITS, β -tubulina e calmodulina são usadas com grande frequência na identificação de *Aspergillus* (White et al., 1990; Midorikawa et al., 2008; Levin, 2012; Rodrigues et al., 2007; Varga et al., 2011; Gonçalves et al., 2012). O genoma mitocondrial também é atrativa para a aplicação da taxonomia de fungos. O DNA mitocondrial (mtDNA) possui grande número de cópias por célula, com alta taxa de mutação, propícias para diferenciação de espécies (Ferns et al., 2002; Wang et al., 2001; Hamari, et al., 2003; Zeng et al., 2003; Millon et al., 2011).

Um método baseado em PCR RFLP da região gênica mtDNA SSU rDNA específica para *Aspergillus* da seção *Flavi* foi desenvolvido. A partir da PCR do DNA extraído de culturas pura, assim como, de castanha do Brasil naturalmente contaminadas, um amplicon de 480 pb foi visualizado. A digestão desse amplicon pela endonuclease *DraI*, gerou um perfil de digestão específico para espécies da seção *Flavi* com ocorrência em castanha do Brasil.

Entretanto, a diferenciação entre espécies proximamente relacionadas de uma mesma seção não apresentou resolução suficiente para pequenas diferenças genômicas. A.

flavus e *A. oryzae*, por exemplo, são espécies com parentesco evolutivo muito próximo, onde o nível de diferenciação intraespecífico não foi suficiente. Semelhante ocorreu com *A. parasiticus* e *A. sojae*. Classificação taxonômica de *A. oryzae* e *A. sojae* entre *A. flavus* e *A. parasiticus* é a incapacidade da produção de aflatoxina (Varga et al., 2011). Além da falta de relatos da ocorrência de *A. oryzae* e *A. sojae* nas regiões de extrativismo e no hospedeiro, a castanha do Brasil (Freire et al., 2009). Análise *in silico* de PCR eletrônica e sítios de restrição, a partir de sequências do mtDNA SSU rDNA para todas as espécies de *Aspergillus*, comprovam que o polimorfismo observado diferencia espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* das espécies de *Aspergillus* classificadas em outras seções.

7.3 Caracterização dos genes *aflP*, *aflQ* e *aflR* da via biossintética de *A. flavus*

A identificação de isolados de *A. flavus* aflatoxigênicos por diagnose molecular tem sido abordada por meio de estudos de caracterização da via biossintética da aflatoxina (Yu et al., 1995; Bhatnagar et al., 2003; Yu et al., 2004; Chang et al., 2005; Chang & Ehelich, 2006; Chao-Zong et al., 2006; Tominaga et al., 2006). Sistemas de PCR com intuito de identificação de *Aspergillus* aflatoxigênico, usando genes importantes para a síntese da aflatoxina também tem sido realizados. Entretanto, ainda não foi estabelecida uma correlação entre os genes, e isolados que produzem ou não produzem aflatoxinas. Métodos baseados em RT-PCR aplicados na detecção e quantificação de genes da via biossintética de aflatoxinas de *A. flavus* e *A. parasiticus* como, *aflD*, *aflG*, *aflH*, *aflI*, *aflK*, *aflM*, *aflO*, *aflP* e *aflQ*, e os reguladores da transcrição *aflS* e *aflR*, têm mostrado uma boa correlação entre a expressão e a habilidade de produção da aflatoxina (Rodrigues et al., 2008; Passone et al., 2010; Scherm et al., 2005), onde genes como, *aflD*, *aflO* e *aflP* consistem com a relação do meio de cultivo e habilidade de produção de aflatoxina. Genes envolvidos na regulação da via biossintética da aflatoxina também têm sido alvos na diferenciação entre *Aspergillus* aflatoxigênicos e não aflatoxigênicos (Manonmani et al., 2005). Uma abordagem a partir de um sistema de PCR, combinando um conjunto de *primers* específicos para os genes *aflR*, *aflD*, *aflM* e *aflQ* de *A. flavus* foi realizada por Criseo et al. (2001). Resultados envolvendo *A. flavus* não produtor de aflatoxinas, apresentou um padrão com uma, duas, três e quatro bandas.

Os genes *aflP* (*omtA*) e *aflQ* (*ordA*) componentes da via biossintética da aflatoxina de *A. flavus*, foram selecionados nesse estudo pela sua função de conversão da esterigmatocistina em aflatoxina. A enzima produzida pelo gene *aflP* é responsável pela conversão de esterigmatocistina em O-metilesterigmatocistina, e dihidroesterigmatocistina em dihidro-O-metilesterigmatocistina. Sequências homólogas ao gene *aflP*, podem ser detectadas em espécies membro do grupo *Aspergillus* seção *Flavi* aflatoxigênicos e não aflatoxigênicos, onde a falta desse gene em, *A. nidulans*, é a razão para essa espécie produzir somente a esterigmatocistina como produto final (Yu et al., 1995; Klich et al., 1995).

Baseado em estudos de *Aspergillus* produtores de AFB e AFG, o gene *aflQ* tem mostrado ser necessário para a formação de AFB e AFG (Prieto et al., 1997). O produto do gene *aflQ* é uma P-450 monooxigenase, e tem sido demonstrado que está envolvido na conversão da O-metilesterigmatocistina em AFB1/AFG1, e dihidro-O-metilesterigmatocistina em AFB2/AFG2 (Yu, et al., 1998). Entretanto, para a formação de AFG, somente os genes *cypA*, *nadA* e *norB*, estão envolvidos (Ehrlich et al., 2004; Ehrlich et al., 2008).

O gene *aflR* também foi selecionado para esse estudo de diversidade nucleotídica, por ser um fator de transcrição conhecido. O *aflR* tem a função de ativar positivamente o genes *aflM* (*ver1*), *aflE* (*norA*), *aflK* (*vbs*), *aflQ* (*ordA*), *aflP* (*omtA*), *aflC* (*pksA*), *aflH* (*adhA*), *aflG* (*avnA*), *ord1*, *stcS*, *stcT*, *stcU* e *stcV*, presentes na biossíntese da aflatoxina (Ehrlich et al., 1999; Cary et al., 2000) por meio da ligação com o DNA alvo 5'-TTAGGCCTAA-3' em *A. flavus* (Sidhu, 2002).

Análise da diversidade nucleotídica dos genes *aflP*, *aflQ* e *aflR*, revelou maior diversidade no gene *aflP* (0,01769/0,01069). quando comparado com os genes *aflQ* (0,00687/0,00484) e *aflR* (0,00238/0,00160). A desproporcionalidade de polimorfismos na região do *aflP*, pode ser explicada pelo fato dessa região estar localizada em um *hotspot* de recombinação. A grande diversidade nucleotídica no gene *aflP*, assim como o grande número de sítios informativos filogeneticamente, em relação a outros genes da via biossintética, suportam o uso desse gene em análises de identificação de *Aspergillus* aflatoxigêncos (Geiser et al., 1998; Chang et al. 2006; Moore et al., 2009). O gene *aflP* apresentou um forte desequilíbrio de ligação ($0,58 < r^2 < 0,50$) em comparação com os genes *aflQ* ($0,28 > r^2 > 0,04$) e *aflR* ($0,12 > r^2 > 0,13$), induzido pelo número de haplótipos formados e, sugerindo uma maior taxa de recombinação para o gene *aflP* (Moore et al., 2009).

A análise comparativa entre isolados de *A. flavus* produtores de aflatoxinas e isolados não produtores, não mostrou correlação entre a produção de AFB e os sítios polimórficos dos genes *aflP*, *aflQ* e *aflR*. A incapacidade do isolado de produção da aflatoxina pode ser devido a perda de genes iniciais da via como, *aflC* ou *aflD*. Criseo et al. (2008) observou que 20% dos seus isolados não aflatoxigêncos de *A. flavus* tiveram a perda do gene *aflD* e variação nucleotídica. Similar foi visto por Moore et al. (2009), onde somente 25% dos isolados de *A. flavus* não aflatoxigêncos apresentaram mutações *nonsense* no gene *aflC*. Das 19 mutações *nonsense* identificadas nos três genes analisados, nenhuma mutação foi relacionada com a aflatoxigenicidade dos isolados de *A. flavus*. Entretanto, o haplótipo contendo os isolados UCB42, UCB81, UCB82, UCB84, exclusivamente não aflatoxigêncos, foi presente na análise dos genes *aflP* e *aflQ*, e no gene *aflR* foram agrupados somente os isolados UCB81, UCB82, UCB84. A análise indica que as amostras UCB81, UCB82, UCB84, isoladas de castanha de caju, coletadas no Estado do Ceará, são semelhantes genotipicamente.

8 CONCLUSÃO

A caracterização da diversidade de *Aspergillus* contaminantes de castanha do Brasil, identificou quatro espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi*. *A. flavus* e *A. nomius*, espécies aflatoxigênicas, foram as mais encontradas na região Norte do Brasil, refletindo na urgência de metodologias e legislações para o controle de produtos livre de micotoxinas. Um método de diagnose molecular específico para a região mtDNA SSU rDNA de *Aspergillus* foi desenvolvido e, em conjunto com polimorfismos baseado em RFLP, as espécies *A. flavus*, *A. nomius* e *A. tamarii*, podem ser diferenciadas das outras espécies do Gênero. A diversidade nucleotídica dos genes *aflP*, *aflQ* e *aflR* de *A. flavus* aflatoxigênico e não aflatoxigênico, não foi caracterizada pela relação entre os sítios polimórficos e a produção de aflatoxina. Porém, o gene *aflP* apresentou alta diversidade nucleotídica, indicando que em conjunto com outros genes da via biossintética da aflatoxina, o *aflP* pode ser usado em um sistema de diagnose baseado em PCR para *A. flavus* aflatoxigênico. O desenvolvimento de metodologias de identificação baseado em PCR para espécies aflatoxigênicas de *Aspergillus* podem ser usados em sistemas de controle e prevenção de produtos agrícolas baseado no APPCC.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-HADI, A. M.; CALEY, D. P.; CARTER, D. R. F.; MAGAN, N. 2011. Control of Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* Using RNA Silencing Technology by Targeting aflD (nor-1) Gene. *Toxins*, 3(6), 647-59.
2. AGUIRRE, L. DE, HURST, S. F., CHOI, J. S., SHIN, J. H., PETER, H., MORRISON, C. J., AGUIRRE, L. De, et al. 2004. Opportunistic Molds and Yeasts by PCR-Enzyme Immunoassay Rapid Differentiation of *Aspergillus* Species from Other Medically Important Opportunistic Molds and Yeasts by PCR-Enzyme Immunoassay. 8: 3495-3504.
3. ALEMU, T.; BIRHANU, G.; AZEREFEGNE, F.; SKINNES, H. 2008. Evidence for mycotoxin contamination of maize in Southern Ethiopia: the need for further multidisciplinary research. *Cereal Research Communications*, 36 Number supplement B
4. AMAIKE, S.; KELLER, N. P. 2011. *Aspergillus Flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, (April). doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095221
5. Animal and Human Systems. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology;
6. AOAC Official Method 971.24. 2000. AOAC Official Method 971.24: Aflatoxins in coconut, copra, and copra meal. *Natural Toxins*-chapter 49 (pp. 14-15). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th edition, volume I, AOAC International, Gaithersburg, Maryland 20877-2417, USA
7. ARRUS, K.; BLANK, G.; CLEAR, R.; HOLLEY, R.A.; ABRAMSON, D. 2005. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. *Journal of food protection*. 68:1060–1065
8. BAQUIAO, A. C., DE OLIVEIRA, M. M. M., REIS, T. A., ZORZETE, P., DINIZ ATAYDE, D., CORREA, B. 2013. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food chemistry*. 139(1): 1127-1132.
9. BAYMAN, P.; COTTY, P.J. 1991. Vegetative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of a single field. *Can. J. Bot.* 69:1797–11
10. BENNETT, J. W. 1987. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathology. *Mycopathologia* 100:3–5.
11. BHAT, R.V.; MILLER, J.D. 2010. Mycotoxins and food supply. *FAO Corporate Document Repository*. Sourced: <http://www.fao.org/docrep/u3550t/u3550t0e.htm> 1/25/2010
12. BHATNAGAR, D., CARY, J. W., EHRLICH, K., YU, J., CLEVELAND, T. E. 2006. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia*. 162(3): 155-166.
13. BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T., KINGSTON, D., 1991. Enzymological evidence for separate pathways for aflatoxin B1 and B2 biosynthesis. *Biochemistry* 30, 4343–4350.
14. BHATNAGAR, D., K. C. EHRLICH, AND T. E. CLEVELAND. 2003. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61:83–93.
15. BHATNAGAR, D., T. E. CLEVELAND, AND D. G. I. KINGSTON. 1991. Enzymological evidence for separate pathways for aflatoxin B1 and B2 biosynthesis. *Biochemistry* 30:4343–4350.
16. BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K.C.; CLEVELAND, T.E. 2003. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63: 83-93.
17. BITTENCOURT, D., DIAS, J. A., ALVARES, V. S. 2012. Micotoxinas em amêndoas da castanha-do-brasil. 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia – Manaus. *Tropical Plant Pathology* 37 (Suplemento). 37: 2006–2008.
18. BLOUT, W. P. 1961. Turkey “X” disease. *Turkeys* 9:52, 55–58, 61, 77.
19. BLUHM, B.H., FLAHERTY, J.E., COUSIN, M.A., WOLOSHUK, C.P. 2004. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *Journal of Food Protection*. 65: 1955–1961.
20. BRESSAC, B.; KEW, M.; WANDS, J.; OZTURK, M. 1991. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 350, 429–431.
21. BRUNS, T. D., PALMER, J. D., SHUMARD, D. S., GROSSMAN, L. I., HUDSPETH, M. E. S. 1988. Mitochondrial DNAs of *Suillus*: three fold size change in molecules that share a common gene order. *Current genetics*. 13:49-56.

22. BRUNS, T. D., VILGALYS, R., BARNES, S. M., GONZALEZ, D., HIBBETT, D. S., LANE, D. J., SIMON, L., STICKEL, S., SZARO, T. M., WEISBURG, W. G., SOGIN, M. L. 1991. Evolutionary relationships within the fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1: 231-241.
23. BUFFLIER, E., SUSCA, A., BAUD, A., MULE, G., BRENGLE, K., LOGRIECO, A. 2007. Detection of *Aspergillus carbonarius* and other black aspergilla from grapes by DNA OLISATM microarray. *Food Additives and Contaminantes*. 24:1138–1147.
24. CALDERARI, T.O., LAMANAKA, B.T., FRISVAD, J.C., PITT, J.I., SARTORI, D., PEREIRA, J.L., FUNGARO, M.H., TANIWAKI, M.H. 2013. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: from rainforest to consumer. *International journal of food microbiology*. 160:267–272.
25. CALDERARI, T.O.; LAMANAKA, B.T.; FRISVAD, J.C.; PITT, J.I.; SARTORI, D.; PEREIRA, J.L.; FUNGARO, M.H.; TANIWAKI, M.H. 2013. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: from rainforest to consumer. *International journal of food microbiology*, 160: 267-272.
26. CALVO, A.M., BOK, J., BROOKS, W., KELLER, N.P. 2004. veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and environmental microbiology*. 70: 4733–4739.
27. CARY J.W., MONTALBANO B.G. AND EHRLICH K.C. 2000. Promoter elements involved in the expression of the *Aspergillus parasiticus* aflatoxin biosynthesis pathway gene *avnA*”, *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 1491: 7-12.
28. CARY, J. W., EHRLICH, K. C. 2006. Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia*. 162(3): 167-177.
29. CARY, J. W., N. BARNABY, K. C. EHRLICH, AND D. BHATNAGAR. 1999. Isolation and characterization of experimentally induced, aflatoxin biosynthetic pathway deletion mutants of *Aspergillus parasiticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51:808–812.
30. CARY, J. W., OBRIAN, G. R., NIELSEN, D. M., NIERMAN, W., HARRIS-COWARD, P., YU, J., ... CALVO, A. M. 2007. Elucidation of veA-dependent genes associated with aflatoxin and sclerotial production in *Aspergillus flavus* by functional genomics. *Applied microbiology and biotechnology*. 76(5): 1107-1118.
31. CHANG PK, BHATNAGAR D, CLEVELAND TE, BENNETT JW. 1995. Sequence variability in homologs of the aflatoxin pathway gene *aflR* distinguishes species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and environmental microbiology*. 61:40–43.
32. CHANG PK, EHRLICH KC. 2010. What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*? *International journal of food microbiology*. 138:189–99.
33. CHANG, P.-K.; HORN, B.W.; DORNER, J.W. 2005. Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 914–923.
34. CHANG, P.-K., ABBAS, H. K., WEAVER, M. A, EHRLICH, K. C., SCHARFENSTEIN, L. L., COTTY, P. J. 2012. Identification of genetic defects in the atoxigenic biocontrol strain *Aspergillus flavus* K49 reveals the presence of a competitive recombinant group in field populations. *International journal of food microbiology*, 154(3), 192-6.
35. CHANG, P.-K., HORN, B. W., DORNER, J. W. 2005. Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal genetics and biology*. 42(11): 914-23.
36. CHANG, P., SKORY, D., LINZ, J., 1992. Cloning of a gene associated with aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Current Genetics* 21, 231–233.
37. CHANG, P.K.; CARY, J.W.; YU, J. 1995. Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E. The *Aspergillus parasiticus* polyketide synthase gene *pkSA*, a homolog of *Aspergillus nidulans* *wA*, is required for aflatoxina B1 biosynthesis. *Molecular & general genetics*. 248, 270–277.
38. CHUN, H. S., KIM, H. J., OK, H. E., HWANG, J.-B., CHUNG, D.H. 2007. Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chemistry*. 102(1): 385–391.
39. CHURCHWELL, M. I.; TWADDLE, N. C.; MEEKER, L. R.; DOERGE, D. R. 2005. Improving LC-MS Sensitivity Through Increases in Chromatographic Performance: Comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 825: 134–143.
40. CODNER, R.C., SARGEANT, K., YEO, R. 1963. Production of aflatoxin by the culture of

- strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. *Biotechnology and bioengineering*. 5:185–192.
41. COSTA, A.K.F.; FREIRE, F.C.O.; ICARO, G.P.V.; ANDRADE, J.A.; MENDES, F.N.P. 2009. Fungos associados a Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e o amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceara). *Revista Ciência Agronômica*. 40: 455-460.
 42. COTTY, P. J., P. BAYMAN, D. S. EGEL, K. S. ELIAS. 1994. Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*, p. 1–27. In K. A. Powell, A. Renwick, and J. F. Peberdy (ed.), *The genus Aspergillus*. Plenum Press, New York, N.Y.
 43. COTTY, P.J. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79: 808–814.
 44. Council For Agriculture Science And Technology (Cast: Mycotoxins: Risks in Plant,
 45. CRISEO, G.; RACCO, C.; ROMEO, O. 2008. High genetic variability in non-aflatoxigenic *A. flavus* strains by using Quadruplex PCRbased assay. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 341–343.
 46. CULLEN, J. M., NEWBERNE, P. N. 1994. Acute hepatotoxicity of aflatoxins, p. 3–26. In D. L. Eaton and J. J. Groopman (ed.), *The toxicity of aflatoxins. Human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press, San Diego.
 47. CUOMO, C.A.; GÜLDENER, U.; XU, J.R.; TRAIL, F.; TURGEON, B.G.; PIETRO, A.D.; WALTON, J.D.; MA, L.J.; BAKER, S.E.; REP, M.; et al. 2007. The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science*. 317:1400–1402.
 48. DAS, M. K., EHRlich, K. C., COTTY, P. J. 2007. Use of Pyrosequencing to Quantify Incidence of a Specific *Aspergillus flavus* Strain Within Complex Fungal Communities Associated with Commercial Cotton Crops. 282–288.
 49. DIANA DI MAVUNGU J, MONBALIU S, SCIPPO ML, MAGHUIN-ROGISTER G, SCHNEIDER YJ, LARONDELLE Y, CALLEBAUT A, ROBBENS J, VAN PETEGHEM C, DE SAEGER S. 2009. LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*.6:885-95.
 50. DONNER M, ATEHNKENG J, SIKORA RA, BANDYOPADHYAY R, COTTY PJ. 2010. Molecular characterization of atoxigenic strains for biological control of aflatoxins in Nigeria. *Food additives and contaminants*. 27:576–90.
 51. DORNER, J.W.; COLE, R.J.; DIENER, U.L. 1984. The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *Mycopathologia*. 87: 13–15.
 52. DURAN, R. M.; CARY, J. W.; CALVO, A. M. (2007). Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA*, a gene necessary for sclerotial formation. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(5), 1158–68.
 53. EATON, D. L., AND H. S. RAMSDEL. 1992. Species and diet related differences in aflatoxin biotransformation, p. 157–182. In D. Bhatnagar, E. B. Lillehoj, and D.K. Arora (ed.), *Handbook of applied mycology, vol. 5, mycotoxins in ecological systems*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
 54. EATON, D. L., AND J. D. GROOPMAN (ed.). 1994. *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press, San Diego, Calif.
 55. EATON, D.; GALLAGHER, E. 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 34:135–172.
 56. EHRlich K.C., CARY J.W. AND MONTALBANO B.G. 1999. Characterization of the promoter for the gene encoding the aflatoxin biosynthetic pathway regulatory protein AFLR. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1444:412-417.
 57. EHRlich KC, CHANG PK, SCHARFENSTEIN LL, CARY JW, CRAWFORD JW. 2010. Absence of the aflatoxin biosynthesis gene, *norA*, allows accumulation of deoxyaflatoxin B1 in *Aspergillus flavus* cultures. *FEMS microbiology letters*. 305:65–70.
 58. EHRlich, K. C., MONTALBANO, B. G., & COTTY, P. J. 2007. Analysis of single nucleotide polymorphisms in three genes shows evidence for genetic isolation of certain *Aspergillus flavus* vegetative compatibility groups. 268:231-236.
 59. EHRlich, K. C., YU, J., AND COTTY, P. J. 2005. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of applied microbiology*. 99:518-527.

60. EHRlich, K.C.; CHANG, P.K.; YU, J.; COTTY, P.J. 2004. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. *Applied and environmental microbiology*. 70, 6518–6524.
61. EHRlich, K.C.; SCHARFENSTEIN, J.S.L.; MONTALBANO, B.G.; CHANG, P.-K. 2008. Are the genes *nadA* and *norB* involved in formation of aflatoxin G1. *International journal of molecular sciences*. 9:1717–1729.
62. FAO. 2003. Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. FAO Food and Nutrition Paper 73. <http://www.fao.org/docrep/005/y1390e/y1390e00.htm> [18/12/13].
63. FÄRBER, P., GEISEN, R., HOLZAPFEL, W., 1997. Detection of aflatoxigenic fungi in figs by a PCR reaction. *International Journal of Food Microbiology*. 36:215–220.
64. FENG, G. H., AND T. J. LEONARD. 1995. Characterization of the polyketide synthase gene (*pksL1*) required for aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of bacteriology*. 177:6246–6254.
65. FORGACS, J. 1962. Mycotoxicoses the neglected diseases. *Feedstuffs* 34:124–134.
66. FREIRE, F. das C. O.; KOZAKIEWICZ, Z. 2005. Filamentous fungi , bacteria and yeasts associated Fungos , bactérias e leveduras associados a amêndoas. 36: 249–254.
67. FREIRE, F.C.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R.R.M. 2000. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*. 149: 13-19.
68. FREIRE, F.das C.O.; CAVALCANTE, M.J.B.; BEZERRA, J.L. 1996. Deterioração fúngica de amêndoas de cajueiro no Nordeste brasileiro. *Agrotrópica, Itabuna*. 8:61-64.
69. FREIRE, F.das C.O.; CAVALCANTE, M.J.B.; BEZERRA, J.L. 1996. Deterioração fúngica de amêndoas de cajueiro no Nordeste brasileiro. *Agrotrópica, Itabuna*. 8:61-64.
70. FREITAS-SILVA, O., VENÂNCIO, A. 2011. Brazil nuts: Benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. *Food research international*. 44:1434–1440.
71. FRISVAD, J.C., SKOUBOE, P., SAMSON, R.A. 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiolog.* 28: 442–453.
72. FUNG, F.; CLARK, R.F. 2004. Health effects of mycotoxins: A toxicological overview. *Journal of toxicology. Clinical toxicology*. 42:217–234.
73. GARDES, M., WHITE, T. J., FORTIN, J. A., & BRUNS, T. D. TAYLOR. JW. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany*. 69(1): 180-190.
74. GEISER, D.M., PITT, J.I., TAYLOR, J.W. 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 95:388–393.
75. GEISER, D.M.; DORNER, J.W.; HORN, B.W.; TAYLOR, J.W. 2000. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* 31:169–179.
76. GEISER, D.M.; PITT, J.I.; TAYLOR, J.W. 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95, 388–393.
77. GEORGIANNA, D.R., FEDOROVAND, BURROUGHS, J.L., DOLEZAL, A.L., BOK, J.W., et al. 2010. Beyond aflatoxin: four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters. *Molecular plant pathology*. 11:213–26.
78. GEORGIANNA, D.R., PAYNE, G.A., 2009. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology* 46, 113–125.
79. GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*. 61: 1323–1330.
80. GODET, M., & MUNAUT, F. 2010. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. *FEMS microbiology letters*, 304(2), 157-68.
81. GOLBANG, N., BURNIE, J. P., MATTHEWS, R. C. 1999. A polymerase chain reaction enzyme immunoassay for diagnosing infection caused by *Aspergillus fumigatus*. 419–423.
82. GONÇALEZ, E., NOGUEIRA, J. H., FONSECA, H., FELICIO, J. D., PINO, F. A., CORRÊA, B. 2008. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanut kernels from sowing to harvest.

- International journal of food microbiology 123(3): 184-190.
83. GONÇALVES, J. S., FERRACIN, L. M., CARNEIRO VIEIRA, M. L., IAMANAKA, B. T., TANIWAKI, M. H., PELEGRINELLI FUNGARO, M. H. 2012. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *World journal of microbiology & biotechnology*. 28(4): 1817–25.
 84. GONZALEZ, P., LABARÈRE, J. 2000. Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6 and V9 domains. *Microbiology*. 146(1):209–21.
 85. GOYAL, R.K. 2003. Prevention and control of mycotoxins in food grains in India. Retrieved from <http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0036e/x0036e17.htm> on 10/17/2003.
 86. GRAY, M.W., BURGER, G., LANG, F. 1999. Mitochondrial evolution. *Science*. 283: 1476-1481.
 87. GRIMM, C., & GEISEN, R. 1998. A PCR-ELISA for the detection of potential fumonisin producing *Fusarium* species. 456–462.
 88. GROOPMAN, J.D.; WOGAN, G.N.; ROEBUCK, B.D.; KENSLER, T.W. 1994. Molecular biomarkers for aflatoxins and their application to human cancer prevention. *Cancer Research*. 54, 190–191.
 89. HAMARI, Z., TÁ3TH, B., BEER, Z., GÁĭCSER, A., KUCSERA, J., PFEIFFER, I., JUHÁĭSZ, Ā K., et al. 2003. Interpretation of intraspecific variability in mtDNAs of *Aspergillus niger* strains and rearrangement of their mtDNAs following mitochondrial transmissions. *FEMS Microbiology Letters*. 221(1): 63–71.
 90. HAYES, J.D.; JUDAH, D.J.; MCLELLAN, L.I.; NEAL, G.E. 1991. Contribution of the glutathione-S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B1. *Pharmacology & therapeutics*. 50: 443-72.
 91. HEGEDUS, D.D., PFEIFER, T.A., MULYK, D.S., KHACHATOURIANS. G.G. 1998. Characterization and structure of the mitochondrial small rRNA gene of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Genome*. 41(3): 471-476.
 92. HESSELTINE CW, SHOTWELL OL, SMITH M, ELLIS JJ, VANDEGRAFT E, SHANNON G. 1970. Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series. In: Herzberg M, ed. Proceedings of the first U.S.-Japan conference on toxic micro-organisms. Washington, DC: UJNR Joint Panels on Toxic Microorganisms and US Department of Interior. 202–210.
 93. HIBBETT, D. S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Transactions of the Mycological Society of Japan*. 33:533–556.
 94. HINRIKSON, H.P., HURST, S.F., DE AGUIRRE, L., MORRISON, C.J. 2005. Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species. *Medical Mycology*. 43:S129–S137.
 95. HOFFMEISTER, D.; KELLER, N.P. 2007 Natural products of filamentous fungi: Enzymes, genes, and their regulation. *Natural product reports*. 24:393–416.
 96. HOFSTETTER, V., CLÉMENÇON, H., VILGALYS, R., MONCALVO, J. 2002. Phylogenetic analyses of the Lyophylleae (Agaricales , Basidiomycota) based on nuclear and mitochondrial rDNA. 106(9): 1043–1059.
 97. HONG, S.B.; CHO, H.S.; SHIN, H.D.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. 2006. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 56: 477–486.
 98. HOOYKAAS, P.J.J., SCHILPEROORT, R.A., SEDEROFF, R.R., SORENSON, J.C., SPIKER, S. 1984. Molecular Genetics of Plants: structural variation in mitochondrial DNA. Academic Press. *Advances in Genetics*. 22: 2-82.
 99. HORN, B. W., MOORE, G. G., & CARBONE, I. 2009. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 101(3): 423–429.
 100. HORN, B. W., RAMIREZ-PRADO, J. H., CARBONE, I. 2009. The sexual state of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*. 101(2): 275–280.
 101. HORN, B.W., MOORE, G.G., CARBONE, I. 2009. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia* 101:423–29.
 102. HSIEH, D.P.H. 1989. Potential Human Health Hazards of Mycotoxins. In *Mycotoxins and Phycotoxins*; Natori, S., Hashimoto, H., Ueno, Y., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. 69–80.
 103. HSIEH, D.P.H.; ATKINSON, D.N. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. *Advances in experimental medicine and biology*. 283: 525-32, 1991.
 104. HSU MC, CHEN KW, LO HJ, CHEN YC, LIAO MH, LIN YH, LI SY. 2003. Species

- identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *Journal of medical microbiology*. 52(12):1071-6.
105. HSU, I.C.; METCALF, R.A.; SUN, T.; WELSH, J.A.; WANG, N.J.; HARRIS, C.C. 1991. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, 350, 427–428.
 106. HUBKA, V., PETERSON, S. W., FRISVAD, J. C., YAGUCHI, T., KUBÁTOVÁ, A., KOLAŘÍK, M. 2013. *Aspergillus waksmanii* sp. nov. and *Aspergillus marvanovae* sp. nov., two closely related species in section Fumigati. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 63(Pt 2): 783–9.
 107. HUSSAIN, I. 2011. Aflatoxins - Detection, Measurement and Control. InTech.
 108. ISO 22119:2011. Anonymous, 2011. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Detection of Food-borne Pathogens. General Requirements and Definitions.
 109. ISO 22174:2005. Anonymous, 2005. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Detection of Food-borne Pathogens. General Requirements and Definitions.
 110. ITO, Y., PETERSON, S.W., WICKLOW, D.T., GOTO, T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. *Mycological research*. 105:233–239.
 111. JAMALI, M., EBRAHIMI, M.A., KARIMIPOUR, M., SHAMS-GHAHFAROKHI, M., DINPARAST-DJADID, N., KALANTARI, S., PILEHVAR-SOLTANAHMADI, Y., et al. 2012. An insight into the distribution, genetic diversity, and mycotoxin production of *Aspergillus* section Flavi in soils of pistachio orchards. *Folia microbiologica*, 57(1), 27-36.
 112. JESTOI, M., ROKKA, M., YLI-MATTILA, T., PARIKKA, P., RIZZO, A. AND PELTONEN, K. 2004. Presence and concentrations of the *Fusarium* - related mycotoxins beauvericin, enniatins and moniliformin in Finnish grains samples. *Food Additives and Contaminants*. 21: 794-802.
 113. JOARDAR, V.; ABRAMS, N.F.; HOSTETLER, J.; PAUKSTELIS, P.J.; PAKALA, S.; PAKALA, S.B.; ZAFAR, N.; ABOLUDE, O.O.; PAYNE, G.; ANDRIANOPOULOS, A.; DENNING, D.W.; NIERMAN, W.C. 2012. Sequencing of mitochondrial genomes of nine *Aspergillus* and *Penicillium* species identifies mobile introns and accessory genes as main sources of genome size variability. *BMC Genomics*. 13: 698.
 114. JOHNSON, G.L., BIBBY, D.F., WONG, S., AGRAWAL, S.G., BUSTIN, S.A. 2012. A MIQE-compliant real-time PCR assay for *Aspergillus* detection. *PLoS One*. 7(7):e40022. Epub 2012 Jul 10.
 115. JUHÁSZ, Á., ENGI, H., PFEIFFER, I., KUCSERA, J., VÁGVOLGYI, C., HAMARI, Z. 2007. Interpretation of mtDNA RFLP variability among *Aspergillus tubingensis* isolates. *Antonie van Leeuwenhoek*. 91(3): 209-216.
 116. KATO, N.; BROOKS, W.; CALVO, A.M. 2003. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot Cell* 2:1178–1186
 117. KELLY, J.D.; EATON, D.L.; GUENGERICH, F.P.; COULOMBE, R.A., Jr. 1997. Aflatoxin B1 activation in human lung. *Toxicology and applied pharmacology*. 144:88–95.
 118. KHOT, P.D., KO, D.L., HACKMAN, R.C., FREDRICKS, D.N., 2008. Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *BMC Infectious Diseases* 8:73-89.
 119. KIM, J. H., YU, J., MAHONEY, N., CHAN, K. L., MOLYNEUX, R. J., VARGA, J., BHATNAGAR, D., et al. 2008. Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *International journal of food microbiology*. 122(1-2): 49–60.
 120. KIYOTA, T., HAMADA, R., SAKAMOTO, K., IWASHITA, K., YAMADA, O., MIKAMI, S. 2011. Aflatoxin non-productivity of *Aspergillus oryzae* caused by loss of function in the *aflJ* gene product. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(5): 512-7. The Society for Biotechnology, Japan.
 121. KLICH, M. A., PITT, J. I. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society*. 91:99–108.
 122. KLICH, M.A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.

123. KLICH, M.A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species, CBS, Netherlands.
124. KLICH, M.A.; YU, J.; CHANG, P.K.; MULLANEY, E.J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E. 1995. Hybridization of genes involved in aflatoxin biosynthesis to DNA of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic aspergilli. *Applied microbiology and biotechnology*. 44: 439–443.
125. KOZŁOWSKI, M., P. P. STEPIEN. 1982. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of members of the genus *Aspergillus* as an aid in taxonomy. *Journal of General Microbiology*. 128: 471–476.
126. KOZŁOWSKI, M., STEPIEN, P.P. 1982. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of members of the genus *Aspergillus* as an aid in taxonomy. *Journal of general microbiology*. 128: 471–476.
127. KRISHNAMACHARI, K.A.; BHAT, R.V.; NAGARAJAN, V.; TILAK, T.B. 1975. Hepatitis due to aflatoxicosis: An outbreak of hepatitis in parts of western India. *Lancet*. 1: 1061–1063.
128. KRISTENSEN, R., & BERDAL, K. G. 2007. Simultaneous detection and identification of *Fusarium* species based on multiplex SNP analysis, 102: 1071-1081.
129. KRISTENSEN, R., TORP, M., KOSIAK, B. AND HOLST-JENSEN, A. 2005. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological research*. 109: 173–186.
130. KULIK, T., FORDOŃSKI, G., PSZCZÓŁKOWSKA, A., PŁODZIEŃ, K., ŁAPIŃSKI, M. 2004. Development of PCR assay based on ITS2 rDNA polymorphism for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides*. *FEMS microbiology letters*. 239(1): 181–6.
131. KULIK, T., FORDOŃSKI, G., PSZCZÓŁKOWSKA, A., PŁODZIEŃ, K., ŁAPIŃSKI, M. 2004. Development of PCR assay based on ITS2 rDNA polymorphism for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides*. *FEMS microbiology letters*. 239(1): 181–6.
132. KUMEDA, Y., ASAO, T. 1996. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 2947–2952.
133. KURTZMAN, C.P., HORN, B.W., HESSELTINE, C.W. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53:147–158.
134. Kurtzman, C.P., Horn, B.W., Hesseltine, C.W.1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. *Antonie Leeuwenhoek*. 53:147–158.
135. KUSUMOTO, K.I., SUZUKI, S., KASHIWAGI, T. 2003. Telomeric repeat sequence of *Aspergillus oryzae* consists of dodecanucleotides. *Applied microbiology and biotechnology*. 61:247–51.
136. LEE, C.Z., LIOU, G.Y., YUAN, G.F. 2006. Comparison of the *aflR* gene sequences of strains in *Aspergillus* section *Flavi*. *Microbiology*. 152:161–170.
137. LESLIE, J. F., ANDERSON, L. L., BOWDEN, R. L., & LEE, Y. 2007. 2007. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*, 119: 25-32.
138. LEVIN, R. E. 2012. PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. *International journal of food microbiology*, 156(1): 1-6.
139. LEWIS, L.; ONSONGO, M.; NJAPAU, H.; SCHURZ-ROGERS, H.; LUBER, G.; KIESZAK, S.; NYAMONGO, J.; BACKER, L.; DAHIYE, A.M.; MISORE, A.; et al. 2005. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environmental health perspectives*. 113: 1763–1767.
140. LIMA, A.M., GONÇALVES, E.C., ANDRADE, S.S., BARBOSA, M.S.R., BARROSO, K.F.P., DE SOUSA, M.B., BORGES, L., VIEIRA, J.L.F., TEIXEIRA, F.M. 2012. Critical points of Brazil nuts: a beginning for food safety, quality control and Amazon sustainability. *Journal of the science of food and agriculture*. 93:736–740.
141. LIMA, A.M.; GONÇALVES, E.C.; ANDRADE, S.S.; BARBOSA, M.S.R.; BARROSO, K.F.P.; DE SOUSA, M.B.; BORGES, L.; VIEIRA, J.L.F.; TEIXEIRA, F.M. 2012. Critical points of Brazil nuts: a beginning for food safety, quality control and Amazon sustainability. *Journal of the science of food and agriculture*. 93: 736-740.
142. Liu, B. H., Chu, F. S. 1998. Regulation of *aflR* and its product, *AflR*, associated with aflatoxin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology*. 64(10): 3718-3723.
143. LUND, M., MADSEN, M., 2006. Strategies for the inclusion of an internal amplification control in conventional and real time PCR detection of *Campylobacter* spp. In chicken fecal samples. *Molecular and Cellular Probes* 20: 92e99.

144. MACHIDA, M., ASAI, K., SANO, M., TANAKA, T., KUMAGAI, T., TERAJ, G., KUSUMOTO, K.I., et al. 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*. 438(7071): 1157–61.
145. MAYER, Z., BAGNARA, A., FÄRBER, P., GEISEN, R. 2003. Quantification of the copy number of *nor-1*, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 82(2): 143-151.
146. MCGLYNN, K.A.; HUNTER, K.; LEVOYER, T.; ROUSH, J.; WISE, P.; MICHIELLI, R.A.; SHEN, F.M.; EVANS, A.A.; LONDON, W.T.; BUETOW, K.H. 2003. Susceptibility to aflatoxin B1-related primary hepatocellular carcinoma in mice and humans. *Cancer Research*. 63: 4594–4601.
147. MCGUIRE, S. M., SILVA, J. C., CASILLAS, E. G., TOWNSEND, C. A. 1996. Purification and characterization of versicolorin B synthase from *Aspergillus parasiticus*. Catalysis of the stereodifferentiating cyclization in aflatoxin biosynthesis essential to DNA interaction. *Biochemistry* 35:11470–11486.
148. MEHL, H.L., COTTY, P.J. 2010. Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during maize infection. *Phytopathology*. 100: 150–9.
149. MEYERS, D., OBRIAN, G., DU, W., BHATNAGAR, D., PAYNE, G. 1998. Characterization of *aflJ*, a gene required for conversion of pathway intermediates to aflatoxin. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3713–3717.
150. MIDORIKAWA, G. E. O., PINHEIRO, M. R. R., VIDIGAL, B. S., ARRUDA, M. C., COSTA, F. F., PAPPAS JR, G. J., RIBEIRO, S.G., FREIRE, F., MILLER, R. N. G. 2008. Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. *Letters in applied microbiology*. 47(1): 12-18.
151. MILLON, L., GRENOUILLET, F., LEGRAND, F., LOEWERT, S., BELLANGER, A. P., SCHERER, E., HENON, T., et al. 2011. Ribosomal and Mitochondrial DNA Target for Real-Time PCR Diagnosis of Invasive Aspergillosis. 49(3): 1058-1063.
152. MONCALVO, J. M., DREHMEL, D., VILGALYS, R. 2000. Variation in modes and rates of evolution in nuclear and mitochondrial ribosomal DNA in the mushroom genus *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota): phylogenetic implications. *Molecular phylogenetics and evolution*. 16(1): 48–63.
153. MOORE, G. G.; SINGH, R.; HORN, B. W.; CARBONE, I. 2009. Recombination and lineage-specific gene loss in the aflatoxin gene cluster of *Aspergillus flavus*. *Molecular ecology*, 18(23), 4870–87.
154. NAKAMURA, H., NARIHIRO, T., TSURUOKA, N., MOCHIMARU, H., MATSUMOTO, R., TANABE, Y., HAGIYA, K., et al. 2011. Evaluation of the Aflatoxin Biosynthetic Genes for Identification of the *Aspergillus* Section *Flavi*. *Microbes and Environments*, 26(4): 367-369.
155. NEWBERNE, P. M., BUTLER, W. H. 1969. Acute and chronic effect of aflatoxin B1 on the liver of domestic and laboratory animals: a review. *Cancer Research*. 29:236–250.
156. NI, W., GUINER, C. L., MOULLIER, P., SNYDER, R. O. 2012. Development and Utility of an Internal Threshold Control (ITC) Real-Time PCR Assay for Exogenous DNA Detection, 7(5): 1-12.
157. NICOLAISEN, M., JUSTESEN, A. F., THRANE, U., SKOUBOE, P., & HOLMSTRBM, K. 2005. An oligonucleotide microarray for the identification and differentiation of trichothecene producing and non-producing *Fusarium* species occurring on cereal grain. *Journal of Microbiological Methods*. 62: 57–69.
158. NICOLAISEN, M., JUSTESEN, A. F., THRANE, U., SKOUBOE, P., HOLMSTRBM, K. 2005. An oligonucleotide microarray for the identification and differentiation of trichothecene producing and non-producing *Fusarium* species occurring on cereal grain. *Journal of Microbiological Methods*. 62: 57–69.
159. NIESSEN, L. 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International journal of food microbiology*. 119(1): 38-46.
160. NIKKUNI, S., NAKAJIMA, H., HOSHINA, S., OHNO, M., SUZUKI, C., et al. 1998. Evolutionary relationships among *Aspergillus oryzae* and related species based on the sequences of 18S rRNA genes and internal transcribed spacers. *The Journal of general and applied microbiology*. 44:225–30.
161. NITTA, M., FURUKAWA, T., SHIDA, Y., MORI, K., KUHARA, S., MORIKAWA, Y., &

- OGASAWARA, W. 2012. A new Zn(II)(2)Cys(6)-type transcription factor BgIR regulates β -glucosidase expression in *Trichoderma reesei*. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 49(5):388-97.
162. OLSEN, G. J., LANE, D. J., GIOVANNONI, S. J., PACE, N. R., & STAHL, D. a. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual review of microbiology*. 40: 337–65.
163. OLSEN, G.J., LANE, D.J., GIOVANNONI, S.J., PACE, N.R., STAHL, D.A. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual review of microbiology*. 40:337–365.
164. OLSEN, M., JOHNSON, P., MOLLER, T., PALADINO, R., LINDBLAD, M. 2008. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts *World Mycotoxin Journal*. 1:123–126.
165. OMER, R. E., KUIJSTEN, A., KADARU, A. M., KOK, F. J., IDRIS, M. O., EL KHIDIR, I. M., VAN'T VEER, P. 2004. Population-attributable risk of dietary aflatoxins and hepatitis B virus infection with respect to hepatocellular carcinoma. *Nutrition and cancer*. 48(1): 15-21.
166. Organization Economic Cooperation and Development (OECD), OECD Guidelines for Quality Assurance in Molecular Genetic Testing. 2007. <http://www.oecd.org/dataoecd/43/38839788.pdf>.
167. OZTURK, M. 1991. P53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet*. 338(8779):1356–59.
168. PACHECO, A. M., SCUSSEL, V. M. 2009. Aflatoxins evaluation on in-shell and shelled dry Brazil nuts for export analysed by LC-MS/MS-2006 and 2007 harvests. *World Mycotoxin Journal*. 2(3): 295-304.
169. PATERSON, R.P.M., 2006. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry*. 41: 1467–1474.
170. PAVLÁTOVÁ, L., NOVOTNY, D., HODEK, J., CHRPOVÁ, J., OVESNÁ, J. 2011. Utilization of DNA microarrays for detection and identification of selected *Fusarium* species from the Czech Republic. 29(1):93-101.
171. PAYNE, G. A. 1998. Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. *Mycotoxins in agriculture and food safety*. 9: 279-306.
172. PAYNE, G., NYSTORM, G., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T., WOLOSHUK, C., 1993. Cloning of the afl-2 gene involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 156–162.
173. PAYNE, G.A., NIERMAN, W.C., WORTMAN, J.R., PRITCHARD, B.L., BROWN, D., DEAN, R.A., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T.E., MACHIDA, M., YU, J. 2006. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Medical Mycology*. 44: 9–11.
174. PEERS, F.; BOSCH, X.; KALDOR, J.; LINSELL, A.; PLUIJMEN, M. 1987. Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland. *International Journal Cancer*, 39:545–553.
175. PETERSON, S.W., ITO, Y., HORN, B.W., GOTO, T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia*. 93:689–703
176. PILDAIN, M.B., FRISVAD, J.C., VAAMONDE, G., CABRAL, D., VARGA, J., SAMSON, R.A. 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 725– 735.
177. PILDAIN, M.B., FRISVAD, J.C., VAAMONDE, G., CABRAL, D., VARGA, J., SAMSON, R.A. 2008. Two new aflatoxin producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 58:725–735.
178. PITT, J.I.; HOCKING, A.D. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd ed. New York Springer.
179. PITT, J.I.; SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. 2000. in: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification* (R.A. Samson and J.I. Pitt, Eds.), Hardwood Academic Publishers, Reading, UK, 9-50.
180. PRICE, M.S., NIERMAN, W.C., KIM, H.S., PRITCHARD, B., JACOBUS, C.A., et al. 2006. The aflatoxin pathway regulator AflR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS microbiology letters*. 255:275–79.
181. PRIETO, R.; WOLOSHUK, C.P. 1997. ord1, an oxidoreductase gene responsible for conversion of O-methylsterigmatocystin to aflatoxin in *Aspergillus flavus*. *Applied and environmental microbiology*. 63: 1661–1666.
182. RAHIMI, K.P., SHARIFNABI, B., BAHAR, M., 2008. Detection of aflatoxin in *Aspergillus*

- species isolated from pistachio in Iran. *The Journal of Pathology* 156: 15–20.
183. Raj, H. G., H. R. Prasanna, P. N. Mage, and P. D. Lotlikar. 1986. Effect of purified rat and hamster hepatic glutathione S-transferases on the micro-some mediated binding of aflatoxin B1 to DNA. *Cancer letters*. 33:1–9.
 184. RANDALL, L., LEMMA, F., RODGERS, J., VIDAL, A., CLIFTON-HADLEY, F., 2010. Development and evaluation of internal amplification controls for use in a real-time duplex PCR assay for detection of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology* 59: 172e178.
 185. REVERBERI, M., RICELLI, A., ZJALIC, S., FABBRI, A.A., FANELLI, C. 2010. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied microbiology and biotechnology*. 87:899–911.
 186. RIGO, K., VARGA, J., TOTH, B., TEREN, J., MESTERHAZY, A., KOZAKIEWICZ, Z. 2002. Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences of the intergenic transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. *The Journal of general and applied microbiology*. 48: 9–16.
 187. RODRIGUES P, SOARES C, KOZAKIEWICZ Z, PATERSON R, LIMA N, VENANCIO A. 2007. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. In: *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Edited by Méndez-Villas A. Formatex. 527-534.
 188. RODRIGUES, P., SOARES, C., KOZAKIEWICZ, Z., PATERSON, R. R. M., LIMA, N. 2007. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. *DNA Sequence*. 527–534.
 189. RODRIGUES, P., VENÂNCIO, A., KOZAKIEWICZ, Z., LIMA, N. 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International journal of food microbiology*. 129(2): 187–93.
 190. RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., PLA, M., SCORTTI, M., MONZÓ, H., VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. 2005. A novel real-time PCR for *Listeria monocytogenes* that monitors analytical performance via an internal amplification control. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 9008e9012.
 191. RODRÍGUEZ, A., WERNING, M. L., RODRÍGUEZ, M., BERMÚDEZ, E., & CÓRDOBA, J. J. 2012. Quantitative real-time PCR method with internal amplification control to quantify cyclopiazonic acid producing molds in foods. *Food Microbiology*. 32(2): 397-405.
 192. Rozas, J., J. C. Sanchez-DelBarrio, X., Messeguer, Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 19: 2496–2497.
 193. ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols; Methods in Molecular Biology*. Edited by KRAWETZ, S.; MISENER, S. New Jersey: Humana Press. 365–386.
 194. SAINZ, J., LUPIÁÑEZ, C. B., SEGURA-CATENA, J., VAZQUEZ, L., RÍOS, R., OYONARTE, S., HEMMINKI, K., et al. 2012. Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary Aspergillosis infection. *PloS one*. 7(2): e32273.
 195. SAITO, M., TSUROTA, O. 1993. A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. *Proc Japan Association Mycotoxicology* 37:31–36.
 196. SCHABEREITER -GURTNER, C., SELITSCH, B., ROTTER, M. L., HIRSCHL, A. M., & WILLINGER, B. 2007. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*. 45(3): 906-14.
 197. SCHOCH, C. L., SEIFERT, K. A, HUHNDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J. L., LEVESQUE, C. A., CHEN, W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(16): 6241–6.
 198. SECEX –Secretaria de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. <http://aliceweb2.mdic.gov.br>
 199. SHAPIRA, R., PASTER, N., EYAL, O., MENASHEROV, M., METT, A., SALAMON, R. 1996. Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 3270–3273.
 200. SHEPHARD, G. S. 2003. Aflatoxin and Food Safety: Recent African Perspectives. *Journal of Toxicology*. 22: 267-286.
 201. SIDDIQUEE, S., ABDULLAH, F., SOON, T., AZIZ, E. R. 2007. Phylogenetic Relationships of *Trichoderma harzianum* Based on the Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer

- Region -1 of the rDNA. 3(9): 896–903.
202. SIDHU G.S. 2002. Mycotoxin genetics and gene clusters. *European Journal of Plant Pathology*. 108: 705-711.
 203. SKORY, C., CHANG, P., CARY, J., LINZ, J. 1992. Isolation and characterization of a gene from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversion of versicolorin A to sterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3527–3537.
 204. SMITH, M. L., & ANDERSON, J. B. 1989. Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNAs of *Armillaria*: identification of North American biological species. *Mycological Research*, 93(3): 247–256.
 205. SOLEIMANY, F., JINAP, S., FARIDAH, A., & KHATIB, a. 2012. A UPLC–MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals. *Food Control*. 25(2): 647–653.
 206. Somashekar, D., Rati, E. R., Chandrashekar, A. 2004. PCR-restriction fragment length analysis of aflR gene for differentiation and detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize. *International journal of food microbiology*. 93(1): 101-107.
 207. SPIESS, B., SEIFARTH, W., HUMMEL, M., FRANK, O., FABARIUS, A., ZHENG, C., MÖRZ, H., et al. 2007. DNA microarray-based detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients. *Journal of clinical microbiology*. 45(11): 3743-53.
 208. SPIESS, B., SEIFARTH, W., HUMMEL, M., FRANK, O., FABARIUS, A., ZHENG, C., MORZ, H., HEHLMANN, R., BUCHHEIDT, D. 2007. DNA Microarraybased detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients. *Journal of clinical microbiology*. 45:3743–3753.
 209. STDF Project 114. 2008. Validation and transfer to the key stakehold- ers of a sustainable and effective Aflatoxin management system in the brazil nut production chain for recovering and consolidating export markets, particularly in Europe.FINALREPORTCovering Period from 1 June 2006 to 30 November 2008 <http://www.stdf-safenutproject.com>. Accessed 9 February 2011
 210. STROSNIDER, H., AZZIZ-BAUMGARTNER, E., BANZIGER, M., BHAT, R. V., BREIMAN, R., BRUNE, M. N., ... WILSON, D. 2006. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environmental health perspectives*, 1898-1903.
 211. SUANTHIE, Y., COUSIN, M. A., WOLOSHUK, C. P. 2009. Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Journal of Stored Products Research*. 45(2): 139–145.
 212. SUGITA, C., MAKIMURA, K., UCHIDA, K., YAMAGUCHI, H., NAGAI, A. 2004. PCR identification system for the genus *Aspergillus* and three major pathogenic species: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Medical Mycology*. 42(5), 433-7.
 213. SUZUKI, K., KAWASAKI, M., ISHIZAKI, H., 1989. Analysis of restric- tion profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii* and related fungi. *Mycopathologia* 103: 147–151.
 214. SWEENEY, M. J., PÀMIES, P., & DOBSON, A. D. 2000. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* 439. *International Journal of Food Microbiology*. 56(1): 97-103.
 215. TAJIMA, F., 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*. 105: 437–460.
 216. TAJIMA, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 585–595.
 217. TANIWAKI, M. H., PITT, J. I., IAMANAKA, B. T., SARTORI, D., COPETTI, M. V, BALAJEE, A., FUNGARO, M. H. P., et al. 2012. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil Nuts. *PLoS one*. 7(8): e42480.
 218. THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673–4680.
 219. TOMINAGA, M.; LEE, Y-H.; HAYASHI, R.; SUZUKI, Y.; YAMADA, O.; SAKAMOTO, K.; GOTOH, K.; AKITA, O. 2006. Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains. *Applied and environmental microbiology*.72: 484–490.
 220. TRAIL, F., N. MAHANTI, M. RARICK, R. MEHIGH, S. H. LIANG, R. ZHOU, AND J. E. LINZ. 1995. Physical and transcriptional map of an aflatoxin gene cluster in *Aspergillus parasiticus* and functional disruption of a gene involved early in the aflatoxin pathway. *Applied and*

- environmental microbiology. 61:2665–2673.
221. TRAN-DINH N, PITT JI, CARTER DA. 1999. Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycology. Research.* 103:1485–90.
 222. TURNER G. 2010. Genomics and secondary metabolism in *Aspergillus*. In *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, ed.M. Machida, K Gomi, 139–156.
 223. VARGA, J., FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A. 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in mycology.* 69(1): 57-80.
 224. VARGA, J., KEVEI, F., VRIESEMA, A., DEBETS, F., KOZAKIEWICZ, Z. AND CROFT, J.H. 1994. Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate. *Canadian Journal of Microbiology.* 40: 612-621.
 225. VARGA, J., KEVEI, F., VRIESEMA, A., DEBETS, F., KOZAKIEWICZ, Z., CROFT, J.H. 1994. Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate. *Canadian Journal of Microbiology.* 40(8): 612-621.
 226. WATTERSON, G. A. 1975. On the number of segregating sites in genetic models without recombination. *Theoretical population biology.* 7: 256–276.
 227. WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Gelfand, D.H., Innis, M.A., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications.* Academic Press, San Diego. 315-322
 228. WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications.* Edited by Innis MA, GELGARD, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. New York, Academic Press; 315-322.
 229. WILD, C.P.; SHRESTHA, S.M.; ANWAR, W.A.; MONTESANO, R. 1992. Field studies of aflatoxin exposure, metabolism and induction of genetic alterations in relation to HBV infection and hepatocellular carcinoma in the Gambia and Thailand. *Toxicology letters.* 64–65: 455–461.
 230. WILLIAMS, J.H.; PHILLIPS, T.D.; JOLLY, P.E.; STILES, J.K.; JOLLY, C.M.; AGGARWAL, D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: A review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American journal of clinical nutrition.* 80: 1106–1122.
 231. WINDELS, C.E. 2000. Economic and Social impacts of *Fusarium* head blight: Changing farms and rural communities in the Northern great plains. *Phytopathology.* 90: 17-21.
 232. WOGAN, G.N. 1992. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. *Progress in clinical and biological research.* 374: 123-37.
 233. WOGAN, G.N. 1992. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Research.* 52: 2114–2118.
 234. WOLOSHUK, C.P., FOUTZ, K.R., BREWER, J.F., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T.E., et al. 1994. Molecular characterization of *aflR*, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology.* 60:2408–14.
 235. YABE, K., AND T. HAMASAKI. 1993. Stereochemistry during aflatoxin biosynthesis: cyclase reaction in the conversion of versiconal to versicolorin B and racemization of versiconal hemiacetal acetate. *Applied and environmental microbiology.* 59:2493–2500.
 236. YABE, K., NAKAMURA, Y., NAKAJIMA, H., ANDO, Y., HAMASAKI, T. 1991. Enzymatic conversion of norsolorinic acid to averufininaflatoxin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology.* 57:1340–1345.
 237. YU, J. 2012. Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *Toxins.* 4: 1024-1057.
 238. YU, J., CHANG, P. K., EHRlich, K. C., CARY, J. W., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T. E., ... BENNETT, J. W. 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology.* 70(3): 1253-1262.
 239. YU, J., P. K. CHANG, J. W. CARY, D. BHATNAGAR, CLEVELAND, T. E. 1997. *avnA*, a gene encoding a cytochrome P-450 monooxygenase is involved in the conversion of averantin to averufininaflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and environmental microbiology.* 63:1349–1356.
 240. YU, J., WOLOSHUK, C., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T., 2000. Cloning and characterization of *avfA* and *omtdB* genes involved in aflatoxin biosynthesis in three *Aspergillus*

- species. *Gene*. 248: 157–167.
241. YU, J.; CHANG, P.K.; EHRLICH, K.C.; CARY, J.W.; MONTALBANO, B.; DYER, J.M.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E. 1998. Characterization of the critical amino acids of an *Aspergillus parasiticus* cytochrome P-450 monooxygenase encoded by *ordA* that is involved in the biosynthesis of aflatoxins B1, G1, B2, and G2. *Applied and environmental microbiology*. 64: 4834–4841.
242. YU, J.; CHANG, P.K.; PAYNE, G.A.; CARY, J.W.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E. 1995. Comparison of the *omtA* genes encoding O-methyltransferases involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus parasiticus* and *A. flavus*. *Gene*. 163: 121–125.
243. ZENG, Q.-YIN, WANG, X.-RU. 2003. Development of mitochondrial SSU rDNA-based oligonucleotide probes for specific detection of common airborne fungi, 17, 281-288.
244. ZHAO, G.-H., LI, J., SONG, H.-Q., LI, X.-Y., CHEN, F., LIN, R.-Q., YUAN, Z.-G., et al. 2012. A specific PCR assay for the identification and differentiation of *Schistosoma japonicum* geographical isolates in mainland China based on analysis of mitochondrial genome sequences. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 12(5): 1027-36.
245. ZHAO, J., KONG, F., LI, R., WANG, X., WANG, D. 2001. Identification of *Aspergillus fumigatus* and Related Species by Nested PCR Targeting Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions Identification of *Aspergillus fumigatus* and Related Species by Nested PCR Targeting Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions.
246. ZHENG, M. Z., RICHARD, J. L., BINDER, J. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*. 161(5):261-73.
247. ZHENG, Z., HUMPHREY, C. W., KING, R. S., RICHARD, J. L. 2005. Validation of an ELISA test kit for the detection of total aflatoxins in grain and grain products by comparison with HPLC. *Test*. 255-263.

10 ANEXOS

Espécies/NCBI ID	Amplicon mtDNA SSU rRNA (pb)	Posições dos sítios de restrição <i>DraI</i>	Tamanho dos fragmentos (pb)
<i>Aspergillus flavus</i> gb EU982152.1	437	170, 407	30, 170, 237
<i>Aspergillus flavus</i> gb EU982152.1	437	170, 407	30, 170, 237
<i>Aspergillus nomius</i> gb U29227.1	437	170, 407	30, 170, 237
<i>Aspergillus parasiticus</i> gb EU982160.1	437	170, 407	30, 170, 237
<i>Aspergillus parasiticus</i> gb EU982161.1	437	170, 407	30, 170, 237
<i>Aspergillus parasiticus</i> gb U29233.1	437	170, 407	30, 170, 237
<i>Aspergillus oryzae</i> gb EU982162.1	437	170, 407	30, 170, 237
<i>Aspergillus sojae</i> gb U29216.1	437	170, 407	30, 170, 237
<i>Aspergillus tamaris</i> gb U29224.1	437	170, 407	30, 170, 237
<i>Aspergillus kambarensis</i> gb U29219.1	437	170, 407	30, 170, 237
<i>Aspergillus subolivaceus</i> gb U29222.1	437	170, 407	30, 170, 237
<i>Aspergillus thomii</i> gb U29217.1	437	170, 407	30, 170, 237
<i>Aspergillus terricola</i> gb U29212.1	437	170, 407	30, 170, 237
<i>Aspergillus leporis</i> gb U29228.1	437	170	170, 267
<i>Aspergillus aculeatus</i> gb EU982176.1	437	170	170, 267
<i>Aspergillus aeneus</i> gb EU982174.1	440	172	172, 268
<i>Aspergillus awamori</i> gb EU982150.1	437	170	170, 267
<i>Aspergillus bisporus</i> gb EU982166.1	433	169	169, 264
<i>Aspergillus brunneo-uniseriatus</i> gb EU982168.1	439	171	171, 268
<i>Aspergillus campestris</i> gb EU982163.1	446	171	171, 275
<i>Aspergillus clavatoflavus</i> gb EU982172.1	439	173	173, 266
<i>Aspergillus clavatus</i> gb EU982154.1	435	170	170, 265
<i>Aspergillus clavatus</i> gb EU982155.1	435	170	170, 265
<i>Aspergillus elongatus</i> gb EU982173.1	436	170	170, 266
<i>Aspergillus fumigatus</i> gb AY291258.1	435	267	168, 267
<i>Aspergillus fumigatus</i> gb EU982153.1	435	170	170, 265
<i>Aspergillus giganteus</i> gb EU982181.1	440	174	174, 266
<i>Aspergillus janus</i> gb EU982175.1	441	173	173, 268
<i>Aspergillus niger</i> gb AY291253.1	436	269	167, 269
<i>Aspergillus niger</i> gb EU982148.1	437	170	170, 267
<i>Aspergillus niger</i> gb EU982149.1	437	170	170, 267
<i>Aspergillus niveus</i> gb EU982164.1	436	170	170, 266
<i>Aspergillus ochraceus</i> gb AY291267.1	435	267	168, 267
<i>Aspergillus ochraceus</i> gb EU982177.1	435	170	170, 265
<i>Aspergillus penicillioides</i> gb AY291264.1	439	269, 415	24, 146, 269
<i>Aspergillus puniceus</i> gb EU982159.1	436	172	172, 264
<i>Aspergillus restrictus</i> gb EU982167.1	436	172	172, 264
<i>Aspergillus rubrum</i> gb EU982158.1	439	172	172, 267
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> gb EU982178.1	435	170	170, 265

Aspergillus silvaticus gb AY291266.1	437	269	168, 269
Aspergillus sydowii gb EU982169.1	437	170	170, 267
Aspergillus terreus gb EU982165.1	437	170	170, 267
Aspergillus ustus gb EU982170.1	436	170	170, 266
Aspergillus ustus gb EU982171.1	436	170	170, 266
Aspergillus versicolor gb AY291275.1	437	269	168, 269
Aspergillus versicolor gb EU982182.1	437	170	170, 267
Eurotium herbariorum gb AY291259.1	439	269	170, 269
Eurotium rubrum gb AF346424.1	438	171	171, 267

Anexo 1: Perfil de restrição da endonuclease Dral das espécies de *Aspergillus*. Tabela descreve nome da espécie e identificador Genbank, seguida pela tamanho do amplicon gerado pelos primers específicos ASP_GEN_MTSSU_F1 e ASP_GEN_MTSSU_R1, posição dos sítios de restrição para Dral, e tamanhos (pb) dos fragmentos após a digestão. Os 13 primeiros perfis, são de espécies de *Aspergillus* da seção Flavi aflatoxigênicos.

11 ARTIGO CIÊNTEFICO PUBLICADO PELA REVISTA BMC MICROBIOLOGY.

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

Characterization of *Aspergillus* species on Brazil nut from the Brazilian Amazonian region and development of a PCR assay for identification at the genus level

BMC Microbiology 2014, **14**:138 doi:10.1186/1471-2180-14-138

Glaucia EO Midorikawa (glaucaemy@gmail.com)
Maria de de Sousa (marialourdes.m.souza@embrapa.br)
Otniel Freitas Silva (otniel.freitas@embrapa.br)
Jurema do Dias (jurema.dias@embrapa.br)
Luis IB Kanzaki (kanzaki@unb.br)
Rogerio E Hanada (rhanada@inpa.gov.br)
Renata MLC Mesquita (recastelloes@gmail.com)
Rivalvalve C Gonçalves (rivalvalve.goncalves@embrapa.br)
Virginia S Alvares (virginia.alvares@embrapa.br)
Daniela MC Bittencourt (daniela.bittencourt@embrapa.br)
Robert NG Miller (robertmiller@unb.br)

ISSN 1471-2180

Article type Research article

Submission date 20 December 2013

Acceptance date 23 May 2014

Publication date 30 May 2014

Article URL <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/138>

Like all articles in BMC journals, this peer-reviewed article can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in BMC journals are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about publishing your research in BMC journals or any BioMed Central journal, go to

<http://www.biomedcentral.com/info/authors/>

© 2014 Midorikawa *et al.*

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Characterization of *Aspergillus* species on Brazil nut from the Brazilian Amazonian region and development of a PCR assay for identification at the genus level

Glaucia EO Midorikawa¹
Email: glauciaemy@gmail.com

Maria de Lourdes M de Sousa²
Email: marialourdes.m.souza@embrapa.br

Otniel Freitas Silva²
Email: otniel.freitas@embrapa.br

Jurema do Socorro A Dias³
Email: jurema.dias@embrapa.br

Luis IB Kanzaki¹
Email: kanzaki@unb.br

Rogério E Hanada⁴
Email: rhanada@inpa.gov.br

Renata MLC Mesquita⁴
Email: recastelloes@gmail.com

Rivaldalve C Gonçalves⁵
Email: rivaldalve.goncalves@embrapa.br

Virginia S Alvares⁵
Email: virginia.alvares@embrapa.br

Daniela MC Bittencourt⁶
Email: daniela.bittencourt@embrapa.br

Robert NG Miller^{1*}
* Corresponding author
Email: robertmiller@unb.br

¹ Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70.910-900 Brasília D.F., Brazil

² EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Avenida das Americas, 29501, Guaratiba, CEP 23.020-470 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³ EMBRAPA Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, Km 5, No. 2600, CEP 68.903-419, Caixa Postal 10 Macapá, AP, Brazil

⁴ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Avenida André Araújo, 2936, CEP 69.067-375, Caixa Postal 2223, Manaus, AM, Brazil

⁵ EMBRAPA Acre, BR 364, Km 14, Zona Rural, CEP 69.908.970, Caixa Postal 321, Rio Branco, AC, Brazil

⁶ EMBRAPA Amazônia Ocidental, Rodovia AM-010, Km 29, CEP 69.011-970, Caixa Postal 319, Manaus, AM, Brazil

Abstract

Background

Brazil nut is a protein-rich extractivist tree crop in the Amazon region. Fungal contamination of shells and kernel material frequently includes the presence of aflatoxigenic *Aspergillus* species from the section *Flavi*. Aflatoxins are polyketide secondary metabolites, which are hepatotoxic carcinogens in mammals. The objectives of this study were to identify *Aspergillus* species occurring on Brazil nut grown in different states in the Brazilian Amazon region and develop a specific PCR method for collective identification of member species of the genus *Aspergillus*.

Results

Polyphasic identification of 137 *Aspergillus* strains isolated from Brazil nut shell material from cooperatives across the Brazilian Amazon states of Acre, Amapá and Amazonas revealed five species, with *Aspergillus* section *Flavi* species *A. nomius* and *A. flavus* the most abundant. PCR primers ASP_GEN_MTSSU_F1 and ASP_GEN_MTSSU_R1 were designed for the genus *Aspergillus*, targeting a portion of the mitochondrial small subunit ribosomal RNA gene. Primer specificity was validated through both electronic PCR against target gene sequences at Genbank and in PCR reactions against DNA from *Aspergillus* species and other fungal genera common on Brazil nut. Collective differentiation of the observed section *Flavi* species *A. flavus*, *A. nomius* and *A. tamarii* from other *Aspergillus* species was possible on the basis of RFLP polymorphism.

Conclusions

Given the abundance of *Aspergillus* section *Flavi* species *A. nomius* and *A. flavus* observed on Brazil nut, and associated risk of mycotoxin accumulation, simple identification methods for such mycotoxigenic species are of importance for Hazard Analysis Critical Control Point system implementation. The assay for the genus *Aspergillus* represents progress towards specific PCR identification and detection of mycotoxigenic species.

Keywords

Aspergillus section *Flavi*, Mycotoxin, Mitochondrial small subunit ribosomal RNA gene, PCR-RFLP

Background

Aflatoxins (AF) are polyketide family secondary metabolites produced by several members of the fungal genus *Aspergillus*, section *Flavi*. Considered amongst the most dangerous natural hepatotoxic carcinogens in mammals [1], consumption of foodstuffs contaminated with these extrolites can be a cause of mortality and reduced productivity in higher vertebrates. Within this family, AFB₁, B₂, G₁ and G₂ cause most concern, given their abundance and toxicity [2]. The mycotoxin cyclopiazonic acid (CPA) [3] can also be produced by aspergilli. This toxic indole ttramitic acid is associated with damage to liver, heart and kidneys [4].

The taxonomy of the genus *Aspergillus* is complex, with overlapping morphological characteristics and biochemical properties between species, as well as intraspecific polymorphism [5,6]. *Aspergillus* section *Flavi* comprises over 20 member species, based on polyphasic approaches for species delimitation that consider morphological, molecular and extrolite data [7-10]. A number of species within the section are aflatoxigenic, including the widely distributed species *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*, together with *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. minisclerotigenes*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonomius* and *A. pseudotamarii*, ([7] and references therein), *A. novoparasiticus* [8], *A. mottae*, *A. sergii* and *A. transmontanensis* [9].

Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl.) is a protein-rich oily nut, which, as an extractivist tree crop, provides employment to communities in the Amazon region. Currently, Bolivia and Brazil are the world's largest producers, with annual production in excess of 40 thousand tons [11]. Aflatoxin contamination negatively affects exports, with maximum tolerable limits imposed by the European Commission of 8.0 µg/kg and 5.0 µg/kg for AFB₁, for unshelled and shelled nuts, respectively, and 15.0 µg/kg and 10.0 µg/kg for total aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂). *A. flavus* and *A. nomius* are common aflatoxin producers on Brazil nut [12,13], with less frequent isolation of aflatoxigenic species *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. parasiticus* and *A. pseudotamarii* [12,14,15]. Non aflatoxigenic species include *Flavi* section members *A. caelatus* and *A. tamarii*, as well as aspergilli which are not classified in the section, such as *A. versicolor* and *A. sydowii* [12].

Given that morphological characters can be insufficient for distinguishing certain species belonging to section *Flavi*, numerous molecular-based approaches have been developed. These have included analysis of rDNA ITS and aflR-aflJ intergenic spacers for differentiation of *A. flavus* and *A. parasiticus* [16,17], as well as AFLP and SNP analysis for differentiation of *A. flavus*/*A. oryzae*, *A. parasiticus*/*A. sojae*, *A. tamarii* and *A. nomius* [18,19]. Sequence-based approaches include analysis of rDNA ITS and 28S rRNA variable regions [20,21], together with calmodulin and β-tubulin gene regions [7,22,23]. Variability in the latter two genes can be appropriate for resolving closely related *Aspergillus* species [24]. Molecular identification of nine species of section *Flavi* was recently described, based upon amplification of aflT and aflR genes and rDNA ITS regions, genomic DNA *Sma*I-derived RFLPs, and RAPD fingerprinting [25]. Specific detection of section *Flavi* species in

contaminated material has been described using both PCR e.g. [26] and loop-mediated isothermal amplification [27].

Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) methods are employed to reduce the risk of contamination of foods with microbial pathogens, toxins or allergens [28]. When setting up HACCP concepts, species identification is necessary for determining critical control points (CCPs) in the field, storage or transport. In this context, the objectives of this study were to identify *Aspergillus* species occurring on Brazil nut from different states in the Brazilian Amazon region on the basis of morphological, molecular and extralite data, followed by the development of a PCR method for collective identification of member species of the genus *Aspergillus*.

Results

Identification and abundance of *Aspergillus* species

Polyphasic identification of all 137 *Aspergillus* strains isolated from Brazil nut shell material collected from cooperatives across the Brazilian Amazon region (states of Acre, Amapá and Amazonas) revealed the presence of five species, with three belonging to *Aspergillus* section *Flavi*. Blastn-derived analyses against *Aspergillus* species sequences deposited in Genbank for ex-type strains revealed similarities of between 99 and 100% for rDNA ITS, β -tubulin and calmodulin sequences.

Qualitative analysis of mycotoxigenic potential in representative strains of the aflatoxigenic species isolated from different regions revealed, for *A. flavus*, AFB1, AFB2 and CPA production in 11 evaluated strains, and AFB1 and CPA production for a further five strains. From a total of seven examined strains of *A. nomius*, five produced AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2, one produced B1 and G1, and one produced B1, G1 and G2. CPA was not detected in *A. nomius*.

When considering totals for each species from all growing areas analysed, aflatoxigenic species *A. nomius* and *A. flavus* were the most abundant, representing 43.1 and 42.3% of all isolated aspergilli, respectively (Table 1). The non aflatoxigenic species *A. tamaritii* was observed at a lower overall frequency (13.13%). *Aspergillus* species which do not belong to section *Flavi* were also isolated, with one isolate of *A. fumigatus* from Amapá and one isolate of *A. niger* from Amazonas. When comparing *A. nomius* and *A. flavus*, although similar numbers of strains were identified in total, numbers varied considerably across regions, with *A. nomius* more frequent in samples from Amapá, Coari (Amazonas), Itacoatiara (Amazonas) and Manicoré (Amazonas), and *A. flavus* more common in contaminated material from Acre and Humaitá (Amazonas).

Table 1 Frequency of *Aspergillus* species from Brazil nut material across the Brazilian Amazon region

State	Number of strains isolated from Brazil nut material				
	<i>A. nomius</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. tamaritii</i>	<i>A. niger</i>
Acre	1 (5.3)*	18 (94.7)	0	0	0
Amapá	20 (95.2)	0	1 (4.8)	0	0
Amazonas					
Coari	5 (83.3)	0	0	1 (16.7)	0
Humaitá	7 (14.3)	40 (81.6)	0	1 (2.05)	1 (2.05)
Itacoatiara	19 (90.5)	0	0	2 (9.5)	0
Manicoré	7 (33.33)	0	0	14 (66.66)	0
Total	59 (43.1)	58 (42.3)	1 (0.73)	18 (13.13)	1 (0.73)

*Values in parentheses indicate percentages for each species for each geographical region.

MtDNA primer development for genus

Following sequence alignment of a portion of the mtDNA SSU rRNA gene from Genbank-derived sequences for all available *Aspergillus* species, specific primers ASP_GEN_MTSSU_F1 (5'-GCCATATTACTCTTGAGGTGGAA-3') and ASP_GEN_MTSSU_R1 (5'-CCGAAAGGCTGAACCAGTAA-3') were designed for amplification of a 480 bp PCR product specific for the genus (Figure 1). *In silico* analysis of the specificity of the primer pair was based upon electronic PCR against mtDNA SSU rDNA gene sequences available at Genbank for the genus *Aspergillus* and fungi from additional genera previously reported on Brazil nut [29]. Positive nucleotide BLAST search results with 0% mismatch were observed against target mtDNA SSU rRNA from all available *Aspergillus* species, as well as teleomorphs from the genera *Chaetosartorya*, *Emericella*, *Eurotium* and *Petromyces*. For all additional fungal genera documented on this host, primer annealing sites were absent in sequences. Wider testing across all deposited fungal mitochondrial DNA sequences in Genbank revealed primer target sequences in *Mycena* sp., *Monascus purpureus* and *Leiothecium ellipsoideum*, although expected amplicon sizes were at least 41 bp shorter than that expected for the genus *Aspergillus*.

Figure 1 Nucleotide sequence alignment of a portion of the mtDNA SSU rRNA among *Aspergillus* species.

Sequences available in Genbank were downloaded from NCBI.

Underlined sequences indicate annealing positions for the specific primers

ASP_GEN_MTSSU_F1 and ASP_GEN_MTSSU_R1. Boxed sequences indicate *Dra*I restriction sites.

When validating specificity of the primer pair against fungal DNA, a PCR product of the expected size was amplified only from members of the genus *Aspergillus*, with no amplification observed for other fungal genera associated with *B. excelsa* (Figure 2). An IAC was included for co-amplification in each sample to prevent false negative results which could potentially be caused by PCR inhibitors [30]. An IAC concentration of 10 pg was identified as optimum for simultaneous amplification of the 480 bp specific *Aspergillus* amplicon and the 330 bp IAC with primers ASP_GEN_MTSSU_F1, ASP_GEN_MTSSU_R1 and M13 reverse. Validation of the specific primers for detection of *Aspergillus* DNA directly from naturally contaminated samples showed that amplification of the genus-specific PCR product was possible from a minimum of 10 ng of total DNA extracted from Brazil nut material.

Figure 2 PCR amplification of a specific mtDNA SSU rRNA amplicon for species members of the genus *Aspergillus* using primers ASP_GEN_MTSSU_F1 and ASP_GEN_MTSSU_R1, together with co-amplification of an internal amplification control. M: 1 Kb plus DNA ladder; 1–2: *Aspergillus flavus*; 3: *Aspergillus nomius*; 4: *Aspergillus tamaritii*; 5: *Aspergillus fumigatus*; 6: *Aspergillus niger*; 7–8: *Fusarium solani* f. sp. *glycines*; 9: *Fusarium solani*; 10: *Penicillium citrinum*; 11: *Trichoderma harzianum*; 12: *Cladosporium cladosporioides*; 13: negative control.

RFLP analysis

Restriction maps for the specific mtDNA SSU rRNA amplicon for the genus were compared across the *Aspergillus* species isolated from Brazil nut. Minor nucleotide sequence differences were detected, with the restriction endonuclease *DraI* appropriate for differentiating the isolated *Aspergillus* section *Flavi* members from other species in the genus also encountered on Brazil nut. According to the restriction maps for the five isolated *Aspergillus* species in this study, two conserved restriction sites are present for this enzyme in the target amplicon region for the isolated *Aspergillus* section *Flavi* members *A. flavus*, *A. nomius* and *A. tamaritii*, which should result in PCR product cleavage into fragments of 30, 170 and 237 bp. Predicted restriction digest patterns were compared in mtDNA SSU rRNA sequences available in Genbank for section *Flavi* species *A. parasiticus*, *A. oryzae* and *A. sojae*, together with the *A. flavus* synonyms *A. kambarensis*, *A. subolivaceus* and *A. thomii* [7]), and for the *A. tamaritii* synonym *A. terricola* [7]). These sequences showed the same two conserved *DraI* restriction sites, in contrast to distinct RFLP profiles observed in sequences for *Aspergillus* species not belonging to section *Flavi* (Additional file 1), as well as in the *Aspergillus* teleomorphs and non-target genera *Mycena*, *Monascus* and *Leiothecium*.

In order to validate the restriction mapping data, PCR RFLP analysis was conducted on PCR-amplified specific mtDNA SSU rRNA amplicons across the different *Aspergillus* species isolated. PCR-RFLPs with *DraI* confirmed differentiation of these three section *Flavi* members from the other *Aspergillus* species, with digest patterns in agreement with *in silico* data (Figure 3).

Figure 3 *DraI* restriction digest profiles of the specific mtDNA SSU rRNA amplicon for differentiation of *Aspergillus* section *Flavi* species members from other aspergilli. M: Low DNA Mass Ladder; 1–3: *Aspergillus flavus*; 4–5: *Aspergillus nomius*; 6: *Aspergillus tamaritii*; 7–8: *Aspergillus fumigatus*; 9–10: *Aspergillus niger*.

Discussion

Morphology-based methods for identification of species of the genus *Aspergillus* can be unreliable as a result of both intraspecific similarities and differences [16]. In this present study, identification of *Aspergillus* species on Brazil nut from different states in the Brazilian Amazon region was conducted according to Samson and Varga [6] and Baquião et al. [14], through morphological and molecular characterization, together with extrolite profile (aflatoxins and CPA). As observed in previous studies for section *Flavi* [24,31], species identifications based upon analyses of rDNA ITS, β -tubulin and calmodulin gene sequence identities against sequences for ex-type strains available through the NCBI nucleotide nr database provided results in agreement with morphology-based identification and extrolite production.

The frequency we observed of aflatoxigenic *Aspergillus* section *Flavi* species from Brazil nut shell material confirmed recent reports that *A. nomius* and *A. flavus* are abundant species on Brazil nut across production areas in the Brazilian Amazonian region [14,32]. In our study, these two species represented over 85% of all *Aspergillus* species isolated. Qualitative analysis of mycotoxin production in strains of the mycotoxigenic species representative of the different states of origin supported the identifications, with *A. flavus* strains producing AFB and CPA, and *A. nomius* producing AFB and AFG, without CPA production. The extrolite profiles are in agreement with expected chemical characterization data for these member species in the section [16,33].

Given the documented widespread occurrence of both *A. flavus* and *A. nomius* on Brazil nut, together with the known capacity to produce mycotoxins AFB and CPA, and AFB and AFG, respectively, the presence of these species on husk materials represents a threat to safe production of Brazil nut. As the section *Flavi* species *A. tamaritii* and *A. fumigatus* are also documented producers of CPA [34,35], the occurrence of these species on Brazil nut highlights the need for regulations which also consider this mycotoxin.

PCR-based molecular diagnosis of microorganisms offers specificity and sensitivity appropriate for early detection, appropriate for both HACCP purposes [36] and implementation of countermeasures for control of microbial contamination. As Brazil nut is an extractivist crop, with aflatoxigenic species occurring throughout the production chain [32,37], safe production is dependent upon identification of CCPs and subsequent implementation of detection methods at these points. The mitochondrial genome is an attractive molecule for application in fungal taxonomy and systematics, with a rapid rate of evolution and limited genetic recombination [38,39]. For *Aspergillus*, both specific and intraspecific level comparisons have been described [40,41]. Considering the high copy number per cell, mitochondrial DNA (mtDNA) is also easily amplifiable by PCR and appropriate for characterization through RFLP analysis. In the current study, analysis of the mtDNA SSU rRNA gene region enabled the design of a genus-specific primer pair for amplification of a 480 bp PCR product in *Aspergillus*. Specific amplification was possible using DNA extracted from pure cultures, as well as from naturally contaminated Brazil nut samples. Together with the developed IAC, this PCR-based method has potential for inclusion in the setup of HACCP concepts. Many attempts with genetic markers for differentiation of section members at the interspecific level have not provided sufficient resolution for detection of small differences across the fungal genomes. In the case of the closely related species *A. flavus* and *A. oryzae*, minor differences across the genome can only be revealed by detecting differences across numerous loci, such as digestion of total DNA with restriction endonucleases [42] or aflatoxin biosynthetic pathway gene interspecific polymorphism [43]. Similarly, the closely related species *A. parasiticus* and *A. sojae* can only be distinguished using genetic markers such as RAPD [44]. Our approach based upon the use of genus specific primers for mtDNA SSU rDNA followed by RFLPs appeared to resolve phylogenetically distant species, with the three section *Flavi* member species encountered in this study all displaying a single RFLP profile. *In silico* analysis of restriction sites in the target mtDNA SSU rDNA sequence for all *Aspergillus* species available in Genbank supported the observed polymorphisms delimiting in a group specific manner, separating section *Flavi* species from other species not classified in the section. Further investigation of this polymorphism is warranted across all member species of the section.

Conclusions

In conclusion, five species of *Aspergillus* were identified on Brazil nut material from cooperatives across states in the Brazilian Amazon region, with the aflatoxigenic *Aspergillus* section *Flavi* species *A. nomius* and *A. flavus* the most abundant. A specific PCR-based method for identification at the genus level was developed, which also enabled collective differentiation of the observed section *Flavi* species *A. flavus*, *A. nomius* and *A. tamaritii* from other *Aspergillus* species, on the basis of RFLP polymorphism. Given the widespread distribution of *Aspergillus* section *Flavi* species and associated risk of food contamination due to mycotoxin accumulation, simple molecular methods to aid identification of mycotoxigenic species are of importance in identification of CCPs at the point of production and storage, from which appropriate management practices can be developed.

Methods

Fungal isolation

Strains belonging to the genus *Aspergillus* were isolated from 3 L samples of Brazil nut collected from cooperatives in growing areas in eastern and western regions of the Brazilian Amazon (Amapá, Amazonas and Acre states). A total of three localities were sampled per state. Isolation into pure culture from shell tissues was performed according to Freire et al. [45]. Single spore cultures were used throughout the study, with all strains preserved both in 20% glycerol at -80°C and on silica gel at 4°C . Strains were identified to species level based on macroscopic colony morphology and conidial morphology, extrolite production, and sequence data identities for rDNA ITS, β -tubulin and calmodulin gene regions, as described previously [7,32,46]. A representative isolate for each haplotype of each identified *Aspergillus* species was preserved as a single spore culture and deposited in the reference mycological culture collection at the Department of Phytopathology, University of Brasilia.

Determination of aflatoxins and cyclopiazonic acid

Analysis of mycotoxigenic potential of a number of *Aspergillus* section *Flavi* strains representative of each state was conducted under permissive conditions according to Schmidt-Heydt et al. [47], following growth at 25°C for 7 days on YES medium (20 g/L yeast extract, 150 g/L sucrose, 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de ZnSO_4 , 0,05 g CuSO_4 , 15 g/L agar), with water activity adjusted to 0.99, using a glycerol/water mixture of 108 mL glycerol per litre. Aflatoxin and cyclopiazonic acid standards were acquired from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), with liquid chromatography grade solvents from Merck (Darmstadt, Germany). For each fungal colony, mycotoxins from the entire content for each colonized plate were extracted under shaking conditions in 10 mL methanol at room temperature for 60 min. Following simple filtration using Whatman No. 1 filter papers, 500 μL of type 1 purified H_2O was added to 500 μL of supernatant and filtered through a 0.22 μm teflon membrane. A total of 10 μL of filtrate were diluted with 990 μL of acetonitrile:water (20:80, v/v). The filtrate (10 μL) was then subjected to UPLC/MS/MS analysis. Calibration curves were prepared for each mycotoxin standard using six concentrations: AFB1 0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 7.5 and 10.0 ng/mL; AFB2 0.06, 0.125, 0.25, 1.25, 1.875, 2.50; AFG1 0.25, 0.50, 1.0, 5.0, 7.6, 10.0 ng/mL; AFG2 0.06, 0.125, 0.25, 1.25, 1.875, 2.50; ACP 5, 10, 20, 100, 150, 200 ng/mL). The R^2 varied between 0.94 and 0.994, depending on the toxin. The quantification limits were 0.1 ng/mL for AFB1, 0.04 for AFB2, 0.10 for AFG1, 0.02 for AFG2 and 0.2 for

CPA. Analyses were performed on an ACQUITY UPLC™ separation system coupled with a Quattro Premier™ XE tandem quadrupole mass spectrometer (Waters, Manchester, UK). The software MassLynx version 4.1 with application manager software QuanLynx (Waters) was employed for instrument control and data analysis. Chromatographic separation of toxins was conducted using an ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μm, 2.1 × 100 mm; Waters). Elution was performed using the gradient: mobile phase A (H₂O + 0.2% formic acid) and mobile phase B (acetonitrile + 0.2% formic acid): 0–1 min (10% B); 10 min (50% B); 10.5 min (85% B); 11 min (10% B); and 12 min (10% B). Flow rate was set at 0.4 mL/min, with a column temperature of 40°C and total run time of 12 min. A full loop injection mode was employed, with an injection volume of 10 μL. The mass spectrometer was operated in mode with electrospray-ionization (ESI) source. Operating conditions were optimized as follows: capillary voltage, 3.5 kV (positive mode); ion source temperature, 120°C; desolvation temperature, 450°C; cone gas flow, 50 L/h; desolvation gas flow, 700 L/h (nitrogen gas in both cases); and collision gas flow, 0.15 mL/min (argon gas).

Total DNA extraction

Cultures for each strain were grown on Czapek Yeast Autolysate agar (CYA) [46] for seven days at 25°C. Mycelial discs were subcultured into 150 mL of CYA liquid media and incubated for a further three days at 25°C, with agitation at 120 rev min⁻¹. Mycelia were harvested by washing under sterile distilled water, vacuum filtration and freeze drying. Genomic DNA was extracted from 50 mg samples of macerated mycelia, as well as from naturally contaminated Brazil nut material, according to Raeder and Broda [48]. DNA was electrophoresed in 1% agarose gels at 5 V cm⁻¹ in the presence of ethidium bromide (1 μg mL⁻¹), with Low DNA Mass ladder® (Invitrogen) employed for quantification under UV at 254 nm.

Molecular-based identification

For all the isolates characterized in this study, a fragment of each of the rDNA ITS1–5.8S–ITS2 region, the β-tubulin and calmodulin genes were amplified using the universal primers ITS5/ITS4 [49], T1/T22 [23], and cmd5/cmd6 [50], respectively. Each PCR reaction contained 10 ng of template DNA, 0.4 μM of each primer, 200 μM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1.0U Taq DNA polymerase and 1× IB Taq polymerase buffer (Phonutria, Belo Horizonte, MG, Brazil). Temperature cycling was conducted with the following program: denaturation at 95°C for 4 min, 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 50°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, plus a final elongation period at 72°C for 5 min. PCR products were purified using ExoSAP-IT® (USB, Cleveland, Ohio, USA) and forward and reverse- sequenced using the Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Products were run on an ABI 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were quality-edited and mounted into contigs using the program Sequencher, version 4.8 (Gene codes Corporation, Ann Arbor, MI USA). Strains were identified on the basis of sequence similarity using the program BLASTn [51], against both the NCBI nucleotide nr database and a local database of sequences for *Aspergillus* ex-type strains (Additional file 2).

Nucleotide sequences for unique haplotypes of each species were deposited in the NCBI database. Ribosomal DNA ITS1–5.8S–ITS2 sequences were deposited in Genbank with the accession numbers KJ634089, KJ634090, KJ634091, KJ634092 and KJ634093, β-tubulin

gene sequences with accession numbers KJ634094, KJ634095, KJ634096 and KJ634097, and calmodulin gene sequences with accession numbers KJ634098 and KJ634099.

mtDNA SSU rDNA characterization and primer design for the Genus

Based upon sequence alignment using ClustalW [52] of representative mtDNA SSU rDNA sequences for *Aspergillus* species available at Genbank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Additional file 3), specific primers for the genus ASP_GEN_MTSSU_F1 and ASP_GEN_MTSSU_R1 were designed using the software Primer3 [53]. In order to test primer specificity *in silico*, electronic PCR was conducted using the program primersearch, available through The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS). Based upon BLAST searches, the specific primers were tested against both the NCBI nucleotide database and a local database of mtDNA SSU rDNA gene sequences for fungi documented on Brazil nut [29,45], comprising members of the genera *Aspergillus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Graphium*, *Hypocrea*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phialophora*, *Phoma*, *Rhizopus* and *Trichoderma* (Additional file 3).

Specificity of the primer pair was validated in PCR reactions against DNA from *Aspergillus* species and other fungal genera common on Brazil nut [29], namely *A. flavus*, *A. nomius*, *A. tamarii*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Fusarium solani*, *Penicillium citrinum*, *Trichoderma harzianum*, and *Cladosporium cladosporioides*. PCR reactions were conducted using 15 ng of template fungal DNA together with 0.20 µM of each primer, 0.2 µg/µL of bovine serum albumin (BSA), 1.0U Taq DNA polymerase (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brazil) and 1× IB Taq polymerase buffer (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brazil). Validation was also performed on total DNA samples extracted from naturally contaminated Brazil nut samples, with a detection limit assessed on diluted DNA. PCR thermocycling, product purification, sequencing and editing were as described earlier, with an annealing temperature of 60°C. All experiments were conducted in duplicate, with a positive internal amplification control (IAC) present in each sample and a separate negative control lacking template DNA included with PCR amplifications. The specific PCR product amplified with primers ASP_GEN_MTSSU_F1 and ASP_GEN_MTSSU_R1 was firstly digested using the restriction enzyme SnaBI (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), and a 154 bp fragment containing the annealing site for primer ASP_GEN_MTSSU_F1 then cloned into the vector pGEMTeasy (Promega, Madison, WI, USA) according to standard protocols. Following cloning, a recombinant strain was stored as a glycerine culture at -80°C. Plasmid DNA was isolated and 10 pg used as an IAC template in all PCR reactions, together with the pGEM®-T Easy-targeting reverse primer M13, annealing to position 176 on the pGEM®-T Easy plasmid vector DNA sequence.

mtDNA SSU rDNA PCR RFLP analysis

The potential of the mtDNA SSU rRNA gene amplicon for inter-specific differentiation was investigated based upon polymorphism in restriction sites. The target mtDNA sequence was analysed in each of the *Aspergillus* species available at Genbank, which included six *Aspergillus* species with complete mitochondrial genome sequences [54]. Restriction maps were generated for each species using the program Sequence Manipulation Suite (http://www.bioinformatics.org/sms2/rest_map.html). Following identification of suitable restriction sites for differentiation, RFLP digestion of the specific mtDNA amplicons was then tested across the section *Flavi* species and additional *Aspergillus* species isolated from

Brazil nut. Each digest reaction volume of 30 μL contained 1 mg of PCR product, 1 x restriction enzyme buffer React 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 1U of the selected restriction enzyme *DraI* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Following a two hour incubation period at 37°C, digest fragments were electrophoresed in 1% agarose gels at 5 V cm^{-1} in the presence of ethidium bromide (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and visualized under UV at 254 nm. The marker Low DNA Mass ladder® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was included on gels for digest fragment size estimation.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GEOM participated in DNA extraction, polyphasic identification, sequencing and analysis, primer development and validation and RFLP analysis. MLMS participated in mycotoxin determination. OFS participated in mycotoxin determination. JSAD participated in collection of contaminated Brazil nut and fungal isolation. LIBK participated in collection of contaminated Brazil nut and fungal isolation. REH participated in collection of contaminated Brazil nut and fungal isolation. RMLCM participated in collection of contaminated Brazil nut, fungal isolation and molecular-based identification. RCG participated in collection of contaminated Brazil nut and fungal isolation. VSA conceived the study, participated in collection of contaminated Brazil nut and fungal isolation. DMCB conceived the study, participated in collection of contaminated Brazil nut, fungal isolation and molecular-based identification. RNGM conceived the study, participated in DNA extraction, polyphasic identification, sequencing and analysis, primer development and validation, RFLP analysis and drafted the manuscript. All authors have contributed to, read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was funded by EMBRAPA (Project “Inovações tecnológicas para o controle da contaminação da castanha-do-Brasil por aflatoxinas”) and CNPq (Project “Aspectos epidemiológicos e moleculares no diagnóstico e controle da contaminação da castanha-do-Brasil por aflatoxinas”). GEOM was supported by a fellowship from CAPES at Universidade de Brasília. RNGM was supported by a fellowship from CNPq. We thank anonymous reviewers for their useful comments on the manuscript.

References

1. JECFA. Joint Expert Committee on Food Additives: *Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; 1996. WHO Technical Report Series 868*. Geneva: World Health Organization; 1997.
2. Council For Agriculture Science And Technology (Cast: *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems*. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology; 2003.

3. Holzapfel CW: **The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* Westling.** *Tetrahedron* 1968, **24**:2101–2119.
4. Rao BL, Husain A: **Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing “kodua poisoning” in man and its production by associated fungi.** *Mycopathologia* 1985, **89**:177–180.
5. Rodrigues P, Venâncio A, Kozakiewicz Z, Lima N: **A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Portuguese almonds.** *Int J Food Micro* 2009, **129**:187–193.
6. Samson RA, Varga J: **What is a species in *Aspergillus*?** *Med Mycol* 2009, **47**(Suppl 1):13–20.
7. Varga J, Frisvad JC, Samson RA: **Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*.** *Stud Mycol* 2011, **69**:57–80.
8. Gonçalves SS, Stchigel AM, Cano JF, Godoy-Martinez PC, Colombo AL, Guarro J: ***Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*.** *Med Mycol* 2012, **50**:152–160.
9. Soares C, Rodrigue P, Peterson SW, Lima N, Venâncio A: **Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal.** *Mycologia* 2012, **104**:682–697.
10. Taniwaki MH, Pitt JI, Iamanaka BT, Sartori D, Copetti MV, Balajee A, Fungaro MH, Frisvad JC: ***Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts.** *PLoS One* 2012, **7**(8):e42480.
11. Freitas-Silva O, Venancio A: **Brazil nuts: Benefits and risks associated with the contamination by fungi and mycotoxins.** *Food Res Int* 2011, **44**:1434–1440.
12. Reis TA, Oliveira TD, Baquião AC, Gonçalves SS, Zorzete P, Corrêa B: **Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region.** *Int J Food Microbiol* 2012, **159**:61–68.
13. Olsen M, Johnson P, Moller T, Paladino R, Lindblad M: ***Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts?** *World Mycotoxin J* 2008, **1**:123–126.
14. Baquião AC, Zorzete P, Reis TA, Assunção E, Vergueiro S, Correa B: **Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts.** *Food Control* 2012, **28**:224–229.
15. Gonçalves JS, Ferracin LM, Vieira MLC, Iamanaka BT, Taniwaki MH, Fungaro MHP: **Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts.** *World J Microb Biot* 2012, **28**:1817–1825.
16. Rodrigues P, Soares C, Kozakiewicz Z, Paterson R, Lima N, Venancio A: **Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins.** In *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Edited by Méndez-Villas A. Badajoz: Formatex; 2007:527–534.

17. El Khoury A, Atoui A, Rizk T, Lteif R, Kallassy M, Lebrihi A: **Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of aflR-aflJ Intergenic Spacer.** *J Food Sci* 2011, **76**:M247–M253.
18. Montiel D, Dickinson MJ, Lee HA, Dyer PS, Jeenes DJ, Roberts IN, James S, Fuller LJ, Matsuchima K, Archer DB: **Genetic differentiation of the *Aspergillus* section *Flavi* complex using AFLP fingerprints.** *Mycol Res* 2003, **107**:1427–1434.
19. Lee CZ, Liou GY, Yuan GF: **Comparison of the aflR gene sequences of strains in *Aspergillus* section *Flavi*.** *Microbiology* 2006, **152**:161–170.
20. Hinrikson HP, Hurst SF, Lott TJ, Warnock DW, Morrison CJ: **Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:2092–2103.
21. Samson RA, Hong SB, Frisvad JC: **Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*.** *Med Mycol* 2006, **44**:133–148.
22. Carbone I, Kohn LM: **A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes.** *Mycologia* 1999, **91**:553–556.
23. Glass NL, Donaldson GC: **Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes.** *Appl Environ Microbiol* 1995, **61**:1323–1330.
24. Pildain MB, Frisvad JC, Vaamonde G, Cabral D, Varga J, Samson RA: **Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts.** *Int J Syst Evol Micr* 2008, **58**:725–735.
25. Godet M, Munaut F: **Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*.** *FEMS Microbiol Lett* 2010, **304**:157–168.
26. Shapira R, Paster N, Eyal O, Menasherov M, Mett A, Salomon R: **Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR.** *Appl Environ Microbiol* 1996, **62**:3270–3273.
27. Luo J, Taniwaki MH, Iamanaka BT, Vogel RF, Niessen L: **Application of loop-mediated isothermal amplification assays for direct identification of pure cultures of *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, and *A. caelatus* and for their rapid detection in shelled Brazil nuts.** *Int J Food Microbiol* 2014, **172**:5–12.
28. Codex, Codex Alimentarius: *Hazard analysis and critical control point (HACCP) system and guidelines for its application. ANNEX to Recommended International Code of Practice/General Principles of Food Hygiene. CAC/RCP 1–1969, Rev 4. FAO/WHO Codex Alimentarius Commission.* Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization; 2003.

29. Costa AKF, Freire FCO, Icaro GPV, Andrade JA, Mendes FNP: **Fungos associados a Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e o amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceara).** *Rev Ciênc Agron* 2009, **40**:455–460.
30. Radstrom P, Lofstrom C, Lovenklev M, Knutsson R, Wolffs P: **2003. Strategies for overcoming PCR inhibition.** In *PCR Primer: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Edited by Diefenbach CW, Dveksler GS. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003:149–161.
31. Ito Y, Peterson SW, Wicklow D, Goto T: ***Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*.** *Mycol Res* 2001, **105**:233–239.
32. Calderari TO, Lamanaka BT, Frisvad JC, Pitt JI, Sartori D, Pereira JL, Fungaro MH, Taniwaki MH: **The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: from rainforest to consumer.** *Int J Food Microbiol* 2013, **160**:267–272.
33. Dorner JW, Cole RJ, Diener UL: **The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid.** *Mycopathologia* 1984, **87**:13–15.
34. Dorner JW: **Production of cyclopiazonic acid by *Aspergillus tamarii* Kita.** *Appl Environ Microbiol* 1983, **46**:1435–1437.
35. Vinokurova NG, Ivanushkina NE, Khmel'nitskaia II, Arinbasarov MU: **Synthesis of alpha-cyclopiazonic acid by fungi of the genus *Aspergillus*.** *Prikl Biokhim Mikrobiol* 2007, **43**:486–489.
36. FAO: *Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control.* FAO Food and Nutrition Paper 73; 2003.
<http://www.fao.org/docrep/005/y1390e/y1390e00.htm> [18/12/13].
37. Lima AM, Gonçalves EC, Andrade SS, Barbosa MSR, Barroso KFP, de Sousa MB, Borges L, Vieira JLF, Teixeira FM: **Critical points of Brazil nuts: a beginning for food safety, quality control and Amazon sustainability.** *J Sci Food Agric* 2012, **93**:736–740.
38. Bruns TD, White TJ, Taylor JW: **Fungal Molecular Systematics.** *Annu Rev Ecol Syst* 1991, **22**:525–564.
39. Xu J, Singh RS: **The inheritance of organelle genes and genomes: patterns and mechanisms.** *Genome* 2005, **48**:951–958.
40. Quirk JT, Kupinski JM: **Interspecific mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in *Aspergillus* section *Flavi*.** *Mycologia* 2002, **94**:1078–1086.
41. Juhász Á, Engi H, Pfeiffer I, Kucsera J, Vágvolgyi C, Hamari Z: **Interpretation of mtDNA RFLP variability among *Aspergillus tubingensis* isolates.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 2007, **91**:209–216.

42. Klich MA, Mullaney EJ: **DNA restriction enzyme fragment polymorphism as a tool for rapid differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus oryzae*.** *Exp Mycol* 1987, **11**:170–175.
43. Tominaga M, Lee Y-H, Hayashi R, Suzuki Y, Yamada O, Sakamoto K, Gotoh K, Akita O: **Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:484–490.
44. Yuan GF, Liu CS, Chen CC: **Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA.** *Appl Environ Microbiol* 1995, **61**:2384–2387.
45. Freire FC, Kozakiewicz Z, Paterson RRM: **Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts.** *Mycopathologia* 2000, **149**:13–19.
46. Pitt JI, Hocking AD: *Fungi and Food Spoilage*. 3rd edition. New York: Springer; 2009.
47. Schmidt-Heydt M, Abdel-Hadi A, Magan N, Geisen R: **Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature.** *Int J Food Microbiol* 2009, **135**:231–237.
48. Raeder U, Broda P: **Rapid preparation of DNA from filamentous fungi.** *Lett Appl Microbiol* 1985, **1**:17–20.
49. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J: **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** In *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*. Edited by Innis MA, Gelgard DH, Sninsky JJ, White TJ. New York: Academic Press; 1990:315–322.
50. Hong SB, Cho HS, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA: **Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2006, **56**:477–486.
51. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389–3402.
52. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:4673–4680.
53. Rozen S, Skaletsky HJ: **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** In *Bioinformatics Methods and Protocols; Methods in Molecular Biology*. Edited by Krawetz S, Misener S. New Jersey: Humana Press; 2000:365–386.
54. Joardar V, Abrams NF, Hostetler J, Paukstelis PJ, Pakala S, Pakala SB, Zafar N, Abolude OO, Payne G, Andrianopoulos A, Denning DW, Nierman WC: **Sequencing of mitochondrial genomes of nine *Aspergillus* and *Penicillium* species identifies mobile introns and accessory genes as main sources of genome size variability.** *BMC Genomics* 2012, **13**:698.

Additional files

Additional_file_1 as DOCX

Additional file 1 MtDNA SSU rRNA gene *Dra*I restriction mapping data for *Aspergillus* species.

Additional_file_2 as XLS

Additional file 2 Ribosomal DNA ITS, beta-tubulin and calmodulin gene sequences deposited at Genbank for *Aspergillus* ex-type strains.

Additional_file_3 as DOCX

Additional file 3 MtDNA SSU rRNA gene sequences deposited at Genbank for fungi documented on Brazil nut.

1 10 20 30 40 50 60 181 190 200 210 220 230 240

gb|AY291266.1 Aspergillus silvaticus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---ATAATAATACAATA..TC...
gb|EU982169.1 Aspergillus sydowii CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---ATAATAATACAATA..TC...
gb|AY291275.1 Aspergillus versicolor CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---ATAATAATACAATA..TC...
gb|EU982182.1 Aspergillus versicolor CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---ATAATAATACAATA..TC...
gb|EU982170.1 Aspergillus ustus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATA---AAAATAATACAATA..TC...
gb|EU982171.1 Aspergillus ustus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATA---AAAATAATACAATA..TC...
gb|EU982159.1 Aspergillus puniceus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---AAAAGAATACAGTA..TC...
gb|EU982173.1 Aspergillus elongatus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---AAAATAATACAATA..TC...
gb|EU982158.1 Aspergillus rubrum CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAAAAT-GTATTAAAAT-AATACATTA..TC...
gb|EU982167.1 Aspergillus restrictus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAAAAT-GTATTAAAAT-AATACATTA..TC...
gb|AY291264.1 Aspergillus penicillioides CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAAAAT-GTATTAAAAT-AATACATTA..TC...
gb|EU982172.1 Aspergillus clavatoflavus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAAAAT-GTATTAAAAT-AATACATTA..TC...
gb|EU982176.1 Aspergillus aculeatus CCGAAAGGCTGAGCCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---AAAATAATACAATA..TC...
gb|AY291253.1 Aspergillus niger CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---CAAGAATAACAATA..TC...
gb|EU982148.1 Aspergillus niger CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---CAAGAATAACAATA..TC...
gb|EU982149.1 Aspergillus niger CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---CAAGAATAACAATA..TC...
gb|EU982150.1 Aspergillus awamori CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---CAAGAATAACAATA..TC...
gb|U29216.1 Aspergillus sojae CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATTGTAATACAATA..TC...
gb|U29224.1 Aspergillus tamaris CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATTGTAATACAATA..TC...
gb|U29227.1 Aspergillus nomius CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATTGTAATACAATA..TC...
gb|U29233.1 Aspergillus parasiticus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATTGTAATACAATA..TC...
gb|EU982161.1 Aspergillus parasiticus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATTGTAATACAATA..TC...
gb|EU982160.1 Aspergillus parasiticus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATTGTAATACAATA..TC...
gb|EU982162.1 Aspergillus oryzae CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATTGTAATACAATA..TC...
gb|EU982152.1 Aspergillus flavus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATTGTAATACAATA..TC...
gb|EU982151.1 Aspergillus flavus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATTGTAATACAATA..TC...
gb|U29219.1 Aspergillus kambarensis CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATTGTAATACAATA..TC...
gb|U29222.1 Aspergillus subolivaceus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATTGTAATACAATA..TC...
gb|U29212.1 Aspergillus terricola CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATTGTAATACAATA..TC...
gb|U29217.1 Aspergillus thomii CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATTGTAATACAATA..TC...
gb|U29228.1 Aspergillus leporis CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATAATAATACAATA..TC...
gb|EU982164.1 Aspergillus niveus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---ATAATAATACAATA..TC...
gb|EU982165.1 Aspergillus terreus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---ATAATAATACAATA..TC...
gb|EU982175.1 Aspergillus janus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATTTTAATAATAATACAATA..TC...
gb|EU982154.1 Aspergillus clavatus CCGAAAGGCTGAGCCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---ATAGTAATACAATA..TC...
gb|EU982155.1 Aspergillus clavatus CCGAAAGGCTGAGCCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---ATAGTAATACAATA..TC...
gb|AY291258.1 Aspergillus fumigatus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATAGTAATACAGTA..TC...
gb|EU982153.1 Aspergillus fumigatus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGTAAGTGT-ATT---ATAGTAATACAGTA..TC...
gb|EU982168.1 Aspergillus brunneo-uniseriatus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---ATATTAATACAATA..TC...
gb|EU982166.1 Aspergillus bisporus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---AAAATAATACA-TA..TC...
gb|AY291267.1 Aspergillus ochraceus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---GTAATAATACAATA..TC...
gb|EU982177.1 Aspergillus ochraceus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---GTAATAATACAATA..TC...
gb|EU982178.1 Aspergillus sclerotiorum CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAAAGTGT-ATT---GTAATAATACAATA..TC...
gb|EU982163.1 Aspergillus campestris CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGAA--TGT-ATTATTAACCTAATACAATA..TC...
gb|EU982174.1 Aspergillus aeneus CCGAAAGGCTGAACCAGTCCATAGGAAAAATGATAATGTTA-CTATGTATGGTGCAATTC..TC...
gb|EU982181.1 Aspergillus giganteus CCGAAAGGCTGAACCAGTAACTTGAAGAATGATAATGTAACTTTATAGGTCATTC..TC...

421 430 440 450 460 470 480 490 500

gb|AY291266.1 Aspergillus silvaticus ATAGACTAGATA-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAGTGTAAAGCATTCCACCTCAAGAGTACTATGGC
gb|EU982169.1 Aspergillus sydowii ATAGACTAGATA-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAGTGTAAAGCATTCCACCTCAAGAGTAAATGGC
gb|AY291275.1 Aspergillus versicolor ATAGACTAGATA-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAGTGTAAAGCATTCCACCTCAAGAGTAAATGGC

Figure 1

gb|EU982182.1 Aspergillus versicolor ATAGACTAGATA-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAGTGAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982170.1 Aspergillus ustus ATAGACTAAATA-----TATATTTAGTTCATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATAGC
gb|EU982171.1 Aspergillus ustus ATAGACTAAATA-----TATATTTAGTTCATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATAGC
gb|EU982159.1 Aspergillus puniceus ATAGACTAGATA-----TATATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTACTATGGC
gb|EU982173.1 Aspergillus elongatus ATAGACTAGATA-----TATATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982158.1 Aspergillus rubrum ATAGACTAGAAA-----ATATATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982167.1 Aspergillus restrictus ATAGACTAGAAA-----ATATATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|AY291264.1 Aspergillus penicillioides AAAGACTAGAAA-----ATAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982172.1 Aspergillus clavatoflavus ATGGGCTAGAAA-----TATATTTAGCCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982176.1 Aspergillus aculeatus ATAGACTAGATA-----ATGTATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|AY291253.1 Aspergillus niger ATAGACTAGATT-----TAATATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982148.1 Aspergillus niger ATAGACTAGATT-----TAATATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982149.1 Aspergillus niger ATAGACTAGATT-----TAATATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982150.1 Aspergillus awamori ATAGACTAGATT-----TAATATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTACTATGGC
gb|U29216.1 Aspergillus sojae ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|U29224.1 Aspergillus tamarii ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|U29227.1 Aspergillus nomius ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|U29233.1 Aspergillus parasiticus ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982161.1 Aspergillus parasiticus ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982160.1 Aspergillus parasiticus ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982162.1 Aspergillus oryzae ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982152.1 Aspergillus flavus ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982151.1 Aspergillus flavus ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|U29219.1 Aspergillus kambarensis ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|U29222.1 Aspergillus subolivaceus ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|U29212.1 Aspergillus terricola ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|U29217.1 Aspergillus thomii ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|U29228.1 Aspergillus leporis ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982164.1 Aspergillus niveus ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982165.1 Aspergillus terreus ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982175.1 Aspergillus janus ATAGGCTAGATT-----TAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982154.1 Aspergillus clavatus ATAGACTAGAT-----AAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982155.1 Aspergillus clavatus ATAGACTAGAT-----AAAATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|AY291258.1 Aspergillus fumigatus ATAGGCTAGAT-----AATATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982153.1 Aspergillus fumigatus ATAGGCTAGAT-----AATATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982168.1 Aspergillus brunneo-uniseriatus ATAGGCTAGATA-----TAACATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982166.1 Aspergillus bisporus AAAGGCTAGAT-----AATTTTGGCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|AY291267.1 Aspergillus ochraceus ATAGGCTAGATT-----TTATTTAGCTTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982177.1 Aspergillus ochraceus ATAGGCTAGATT-----TTATTTAGCTTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982178.1 Aspergillus sclerotiorum ATAGGCTAGATT-----ATATTTAGCTTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982163.1 Aspergillus campestris ATAGGCTAGATAAATTTTTTATTTTCATTTAGTCTATAAATGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTAATATGGC
gb|EU982174.1 Aspergillus aeneus ATACATTAGATAA-----ATATATTTAATGTATAAACGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTACTATGGC
gb|EU982181.1 Aspergillus giganteus ATACATTAGATA-----TATATTTAATGTATAAACGAAAATGTAAGCATTCCACCTCAAGAGTACTATGGC

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

480bp →
330bp →

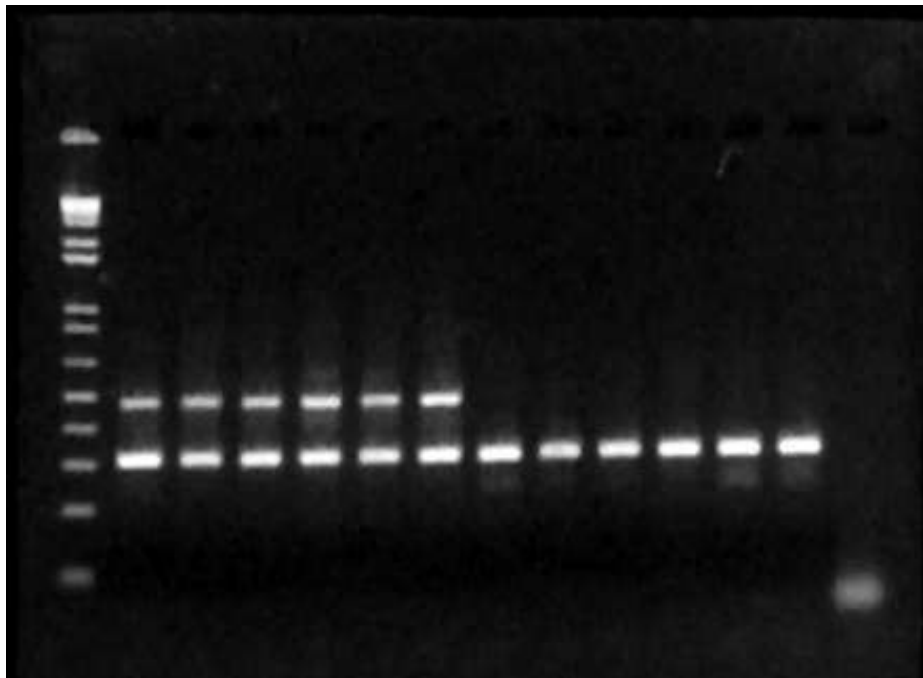
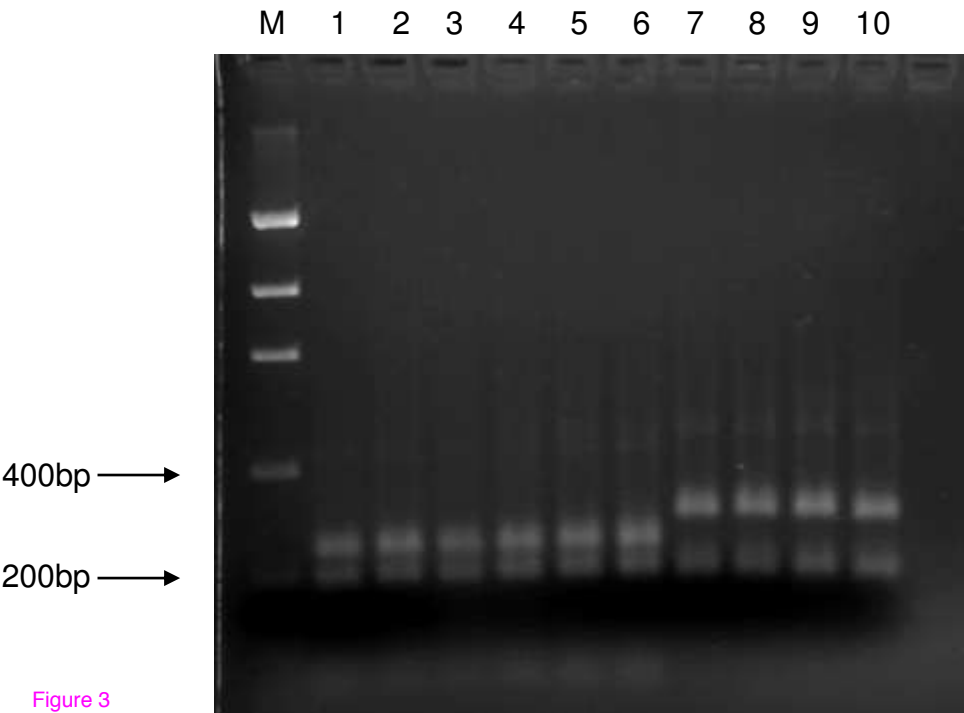


Figure 2



Additional files provided with this submission:

Additional file 1: 1911455946116624_add1.docx, 17K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1740948003131290/supp1.docx>

Additional file 2: 1911455946116624_add2.xls, 45K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1893622502131290/supp2.xls>

Additional file 3: 1911455946116624_add3.docx, 38K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1630001333131290/supp3.docx>

12 TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Trabalho apresentado no XLIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, realizado em Cuiabá-MT, nos dias 15 a 19 de agosto de 2010.

Um sistema de detecção molecular para o gênero e espécie *Aspergillus flavus* que utiliza um controle de amplificação interno.

Midorikawa, GEO¹; Freire, F²; Miller, RNG¹

¹Universidade de Brasília / Laboratório de Interação Planta-Praga, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Bloco 6 – 2º pavimento, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília, D.F.

²Embrapa Agroindústria / CNPAT, Rua Dra Sara Mesquita, 2270, Planalto do Pici - Cx. Postal 3761, CEP 60511110, Fortaleza, CE
E-mail: rmiller@pos.ucb.br

Palavra chave: *Aspergillus flavus*, mtDNA SSU rDNA, rDNA ITS, IAC

Micotoxinas são metabólitos produzidos por fungos, pertencentes a diferentes classes químicas, os quais são comumente encontrados em alimentos. Um grupo muito importante para a segurança alimentar mundial devido a sua alta toxicidade e propriedades hepatocarcinogênicas, são as aflatoxinas. Ocorrendo em diferentes alimentos, as aflatoxinas são produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Os objetivos desse projeto são desenvolver métodos de detecção molecular para fungos aflatoxigênicos comumente encontrados em castanha-do-Brasil com o intuito de contribuir em programas de monitoramento de controle e qualidade de alimentos. Uma das principais vantagens dos métodos moleculares que utilizam a PCR sobre os demais métodos de detecção de aflatoxinas é que os mesmos possibilitam a detecção de fungos produtores de aflatoxinas em diferentes amostras, por longos períodos. Para tanto, *primers* específicos para o gênero *Aspergillus* e espécie *A. flavus*, específicos para a região do mtDNA SSU rDNA e região nuclear do rDNA ITS, respectivamente, em conjunto com um controle de amplificação interno (IAC) foram desenvolvidos visando a utilização desses marcadores moleculares em um método de PCR múltipla para a identificação de *A. flavus* em alimentos.

Trabalho apresentado no VI Congresso Brasileiro de Micologia, realizado em Brasília-DF, nos dias 29 de novembro a 02 de dezembro de 2010.

Análise da diversidade nucleotídica dos genes *aflR*, *aflP* e *aflQ* da via biossintética de aflatoxinas em populações de *Aspergillus flavus* aflatoxigênicos e não aflatoxigênicos

Midorikawa, GEO¹; Figueiredo, LFA¹; Freire, F²; Miller, RNG¹

¹Universidade de Brasília / Laboratório de Interação Planta-Praga, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Bloco 11-35/8 , Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília, D.F.

²Embrapa Agroindústria / CNPAT, Rua Dra Sara Mesquita, 2270, Planalto do Pici - Cx. Postal 3761, CEP 60511110, Fortaleza, CE

E-mail: glaucaemy@gmail.com

Palavra chave: *Aspergillus flavus*, Diversidade, SNPs.

Grãos brasileiros como o amendoim, a castanha-do-Brasil e a castanha-de-caju, são extensivamente afetados pela contaminação por fungos aflatoxigênicos, como o *Aspergillus flavus*. A biossíntese de aflatoxina aparentemente é regulada por vários mecanismos interligados que incluem, além da via biossintética, elementos da regulação transcricional e fatores fisiológicos que afetam o metabolismo do fungo. A via biossintética de aflatoxinas em *A. flavus* possui aproximadamente 70kb, onde estão localizados 29 genes. Os SNPs são muito utilizados para diferenciação fenotípica entre indivíduos da mesma espécie. Para tanto, a partir dos genes da via biossintética de aflatoxinas, três genes candidatos na diferenciação de isolados aflatoxigênicos e não aflatoxigênicos de *A. flavus* foram selecionados (AFLP, AFLQ, e AFLR) na tentativa de correlacionar polimorfismos entre fungos produtores e não produtores de aflatoxinas. Amplificações e seqüenciamento (ABI 377) de seqüências alvos nos três genes foram realizadas com isolados aflatoxigênicos e não aflatoxigênicos. Para a identificação e caracterização dos SNPs, foi utilizado o programa Sequencher. Análises da diversidade genética baseado em polimorfismos nos genes AFLP, AFLQ, e AFLR entre as três espécies de *Aspergillus* potencialmente aflatoxigênicos: *A. flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus oryzae*, mostraram que *A. flavus* possui maior similaridade com *A. oryzae* do que *A. parasiticus*, com a maior divergência observada entre os genes AFLR e AFLP, comparadas com sequencias do Genbank. A potencial identificação de marcadores que diferenciem a nível intra-específico baseado na aflatoxigenicidade, pode possibilitar o desenvolvimento de um sistema de diagnóstico molecular para *A. flavus* aflatoxigênico.

Trabalho apresentado no XLV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, realizado em Manaus-AM, nos dias 19 a 23 de agosto de 2012.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF MEMBER SPECIES OF *ASPERGILLUS* SECTION *FLAVI* CONTAMINATING BRAZILNUT MATERIAL FROM ACRE AND AMAZONAS. DE SOUSA TRINDADE, L.¹; MIDORIKAWA, G. E. O.¹; LEITE CASTELLÕES MESQUITA, R. M.²; BITTENCOURT, D.²; HANADA, R.E.³. COELHO GONÇALVES, R.⁴; MILLER, R.N.G.¹. ¹Universidade de Brasília; ²Embrapa Amazônia Ocidental; ³INPA - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, ⁴Embrapa Acre. E-mail: s.luciano.trindade@gmail.com. Identificação molecular de espécies membros do *Aspergillus* seção *flavi* contaminantes de castanha do Brasil nos estados de Acre e Amazonas

Aflatoxins (AFs) are carcinogenic polyketides produced by fungi within the genus *Aspergillus*, section *Flavi*. Typically, *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* are the most common AF producers, with *A. nomius*, *A. tamaraii*, and *A. pseudotamaraii* less frequent. Fungal isolates were collected from *Bertholletia excelsa* endocarp and kernel material. Total DNA was extracted from single-spore isolates belonging to the genus *Aspergillus*, using a standard phenol-chloroform-based protocol. PCR amplification and sequencing of ribosomal DNA (rDNA) ITS regions 1 and 2, followed by Blastn analysis against the NCBI nr database allowed identification of isolates to species level. A variety of potential aflatoxin producing members of *Aspergillus* section *Flavi* were identified, with species predominance dependent upon geographical origin. In the case of isolates from production areas in Acre, rDNA-based identification revealed 18 isolates of *A. flavus* and one *A. nomius* isolate, in contrast to those originating from Amazonas, with 20 isolates identified as *A. nomius* and four as *A. tamaraii*. Data on species distribution of potential aflatoxin-producing *Aspergilli* is important for the development of adequate strategies for mycotoxin prevention and control.

Hospedeiro: *Bertholletia excelsa*

Patógeno: *Aspergillus flavus*

Doença: Micotoxinas

Área: Micologia

Estudantes: Apresentação () Oral (X) Poster

Apoio: Embrapa (0209010100000), CNPq (562680/2010-1), MCT/CNPq/FNDCT (50/2010).

CAPÍTULO 2

**ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DE *ASPERGILLUS ORYZAE* EM RELAÇÃO A
DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR PRÉ-TRATADO**

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Aspergillus oryzae*

Fungos filamentosos que fazem parte da taxonomia do grupo *Aspergillus* da seção *Flavi*, são divididos em duas classes baseado na capacidade de produção da aflatoxina e refletindo na qualidade dos alimentos e saúde humana. Espécies como o *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sojae*, são pertencentes à classe de espécies não produtoras de aflatoxinas e relatados como espécies economicamente importantes para a produção de produtos alimentícios fermentáveis (Varga et al., 2011).

Embora exista uma relação taxonômica estreita entre fungos do gênero *Aspergillus* toxigênicos e não toxigênicos, a segurança do produto é cuidadosamente avaliada antes da comercialização e assegurada na fabricação, processamento, transporte, armazenamento e uso do produto. As medidas de segurança variam desde a seleção da matéria prima até uma série de testes toxicológicos. Para assegurar a segurança do alimento, o comitê de especialistas da FAO/WHO (Food Additives) exigem que as enzimas derivadas a partir de fungos não contenham quantidades detectáveis de aflatoxina B1, ocratoxina A, esterigmatocistina, toxina T-2 (toxina de tricotecenos) ou zearalenona (Remarks & Reading, 1997) (FAO, 1989).

Por mais de mil anos, o *A. oryzae* e *A. sojae* têm sido utilizados no Oriente na fermentação de alimentos e bebidas, em produtos como a bebida sake, molho shoyu e a pasta de soja chamada de miso (Bando et al., 2011). Além da sua importância na indústria alimentícia, o *A. oryzae* possui importante papel na produção de bioetanol de segunda geração por sua grande capacidade de produção de enzimas que hidrolisam celulose, hemicelulose e lignina (Abe et al., 2006).

Devido a grande importância do *A. oryzae* pela indústria, estudos relacionados ao genoma e ao transcrito têm sido realizados. Em 2005, Machida, et al. disponibilizou a sequência genômica completa do *A. oryzae* RIB40. Consistindo em oito cromossomos, numerados de I a VIII em ordem decrescente de tamanho, o genoma de *A. oryzae* possui 37,6 Mpb e o genoma mitocondrial possui 28,9 Kpb. Cerca de 21.368 ESTs (expressed sequence tags) preparados a partir de cultivos em meio líquido com glicose, maltose ou pH alcalino, ou em cultura líquida sem fonte de carbono, ou ainda, a partir de cultura sólida com soja, trigo ou arroz, ou a partir do estado germinativo, estão disponíveis no banco de dados de ESTs de *Aspergillus oryzae* (<http://nribf21.nrib.go.jp/EST2/>).

1.2 Biocombustível

O uso de combustíveis fósseis contribui para diversos problemas que afetam a economia global e a saúde ambiental. A substituição ou diminuição do uso de combustíveis fósseis por biocombustíveis como, o bioetanol e biodiesel podem contribuir para a redução

da emissão de CO₂, diminuir a dependência de fontes fósseis, promover a economia local, entre outros (Banerjee et al., 2010). Esforços no desenvolvimento de novas tecnologias para a utilização de combustível renovável a partir da biomassa lignocelulósica estão sendo realizados principalmente devido a grande disposição de resíduos lignocelulósicos agroindustriais.

Devido ao sucesso da capacidade de adaptação do cultivo da cana-de-açúcar às condições climáticas e às características do solo brasileiro, em 1975, o Brasil começou um programa, o Programa Nacional de Álcool – Proálcool. Esse programa visava a substituição da gasolina por etanol como uma alternativa para a crise do petróleo. Nesse mesmo programa, a cana-de-açúcar foi escolhida como matéria prima para a produção do etanol, e como consequência, estudos na área agrícola e tecnológica foram intensificados, levando o Brasil a uma posição favorável em termos de segurança de energia.

Atualmente o Brasil é um dos produtores agrícolas mais importantes do mundo, tendo a cana-de-açúcar uma das principais culturas brasileira. De acordo com a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), para a safra de 2013/2014, a produção total de cana-de-açúcar moída no Brasil foi de 658,8 milhões de toneladas, onde um total de 297,9 milhões de toneladas foram destinadas a produção de açúcar. Já para a produção de etanol total, foram destinados 360,9 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, produzindo 27,96 bilhões de litros na safra de 2013/2014 (CONAB, 2014).

A produção tradicional de bioetanol no Brasil, chamada de bioetanol de primeira geração, usa a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação da sacarose acumulada no xilema da cana-de-açúcar, onde o produto é recuperado por meio de destilação. Esse processo corresponde a somente um terço da cana-de-açúcar. Os outros dois terços, correspondentes à folhas e ao bagaço, não são fermentados pelo *S. cerevisiae*, devido a incapacidade desse organismo de produzir enzimas hidrolíticas capazes de hidrolisar a celulose e hemicelulose presente na parede celular da cana-de-açúcar (Goldemberg, 2008). Entretanto, fungos filamentosos são capazes de produzir grandes quantidades de enzimas hidrolíticas. A conversão da biomassa vegetal em açúcares fermentáveis é chamada de bioetanol de segunda geração. Um obstáculo central que impede a utilização generalizada da biomassa celulósica, são tecnologias de processamento da biomassa, e a redução dos custos de produção para tornar o bioetanol de segunda geração economicamente viável (Agbor et al., 2011). Um outro tipo de produção do etanol, é o realizado a partir da conversão de microalgas em etanol, chamado de bioetanol de terceira geração.

A biomassa lignocelulósica sendo uma fonte de energia sustentável para produção de biocombustíveis é particularmente atraente, pois está disponível em abundância e a baixos custos. Sendo a celulose o biopolímero mais abundante na Terra, a produção de biocombustível a partir da biomassa celulósica tem se tornado grande foco de intensivas pesquisas (Lynd et al., 2002).

O reaproveitamento do bagaço da cana-de-açúcar, tem a estimativa de um aumento de 40% da capacidade de produção do etanol sem aumentar as áreas plantadas de canavial

(Petrobras, 2014), trazendo mais produtividade, eficiência e sustentabilidade para o ciclo de produção do bioetanol. O reaproveitamento do bagaço de cana possibilita às usinas de etanol trabalho durante todo o ano, uma vez que o bagaço pode ser estocado e processado durante a entressafra (Oliveira, 2012).

No Brasil, o sistema de produção do etanol a partir da cana-de-açúcar é considerado um sistema eficiente (Goldemberg, 2007). Entretanto, em ordem de produção em larga escala do etanol de segunda geração, um aumento no desenvolvimento de tecnologias capaz de obter etanol a partir de material lignocelulósico será necessário. Apesar da hidrólise química da biomassa da cana-de-açúcar ser uma metodologia consolidada sob condições laboratoriais, a sua aplicação em larga escala ainda não é economicamente viável no Brasil. No entanto, já existem empresas em plantas pilotos, no Brasil, USA, Canadá e Suécia (Lin & Tanaka, 2006).

O etanol tem um grande potencial na substituição da gasolina no mercado de combustíveis. Entretanto, o custo versus o benefício do etanol ainda é elevado e comparado ao de combustíveis fósseis. A produção mundial de etanol em 2001 foi de 31 bilhões de litros (Berg, 2001). E esses dados têm aumentado para 39 bilhões de litros em 2006, e espera-se que atinja 200 bilhões de litros em 2015 (Taherzadeh & Karimi, 2007). O Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores de etanol com cerca de 62% da produção mundial. São estimados 442 bilhões de litros de etanol produzido a partir da biomassa lignocelulósica e o total de resíduos agrícolas pode produzir cerca de 491 bilhões de litros de etanol de segunda geração por ano (Kim & Dale, 2004).

Nos últimos anos programas como o Centro de Tecnologia Canavieira – CTC, grupo Ridesa e o Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas – IAC resultaram em um aumento na produção de cana de açúcar de 1,6% ao ano. Entretanto, novas variedades de cana deverão ser desenvolvidas para adaptar em novas áreas do País, uma vez que todas as variedades comerciais utilizadas no Brasil foram desenvolvidas para o Estado de São Paulo, responsável por 62% de toda a produção de cana de açúcar do Brasil (Ministério da Agricultura e Agroenergia, 2008). Outros programas brasileiros como, o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) e o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (INCT do bioetanol), têm focado em estudos nos bioprocessos do bioetanol, assim como, prospecção de micro-organismos e cana-de-açúcar.

Uma vez que a produção de bioetanol pode ser uma alternativa para utilização de resíduos agroindustriais, a palha de arroz, palha de trigo, palha de milho e bagaço da cana de açúcar são fortes candidatos para produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica. Além de outros materiais lignocelulósicos, como plantas lenhosas e não lenhosas, rejeitos e resíduos florestais e urbanos (Lynd *et al.*, 2008).

A produção do etanol nos Estados Unidos utiliza o amido extraído do milho como principal matéria-prima e a sua utilização nesse processo em escala industrial, requer o rompimento das ligações α -1,4 e α -1,6 (MacDonald *et al.*, 2001). A quebra destas ligações

pode ser realizada industrialmente pelo tratamento com ácidos fortes ou enzimas que degradam a molécula de amido produzindo açúcares fermentáveis.

O processo de produção de bioetanol a partir de amido é mais dispendioso do que o processo de produção a partir de celulose, pois possui menor rendimento por tonelada de matéria-prima utilizada e esbarra em um ponto de caráter social muito importante que é o uso de alimentos para a produção de biocombustível. Sendo assim, a utilização de rejeitos agrícolas como bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz e demais rejeitos agrícolas e florestais além da vantagem econômica é uma excelente alternativa ao uso de material amiláceo, pois não utiliza alimentos para a produção do álcool combustível, assim como contribui para a redução do impacto ambiental decorrente do acúmulo destes materiais na natureza (Demain *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de novas e eficientes tecnologias capazes de obter etanol a partir de material lignocelulósico poderia aumentar consideravelmente a produção de bioetanol e tornar o processo lignocelulósico do etanol economicamente viável. A utilização completa da biomassa vegetal no processo de produção do etanol, significa que todos os tipos de açúcares da lignocelulose devem ser convertidos em etanol e que os micro-organismos devem ter uma performance eficiente na conversão sob condições industriais (Souza *et al.*, 2011).

1.2.1 Estrutura da biomassa Lignocelulósica

Apesar da grande diversidade na morfologia da parede celular de plantas, elas são basicamente classificadas em dois grandes grupos, paredes primária e secundária. A parede primária é formada por células generalistas, que podem diferenciar-se em diferentes tipos celulares e estão em crescimento constante. Essa parede é formada por microfibrilas de celulose envolvidas por uma matriz altamente hidratada conferindo à célula força e flexibilidade, permitindo que a célula possa crescer. A matriz da parede celular consiste de dois grupos principais de polissacarídeos, hemiceluloses e pectinas. Essa matriz de polissacarídeos consiste numa variedade de polímeros que variam de acordo com o tipo celular e espécie da planta (figura 17).

A parede secundária, é a parede celular formada após o término do crescimento celular. Geralmente é grossa, rica em fibras e outras células que conferem suporte mecânico à planta. Apesar das diferenças da composição de monossacarídeos serem pequenas em um mesmo tipo de parede celular, o modo como os polímeros são arranjados nas paredes de cada tecido pode variar consideravelmente. Células do xilema, como as encontradas em madeiras, são conhecidas por tornar a parede secundária grossa e rica em lignina. A diferença entre a parede secundária e a parede primária é que a parede secundária possui grande porcentagem de celulose, diferentes hemiceluloses e a matriz de pectinas é substituída por lignina (Taiz & Zeiger, 2010).

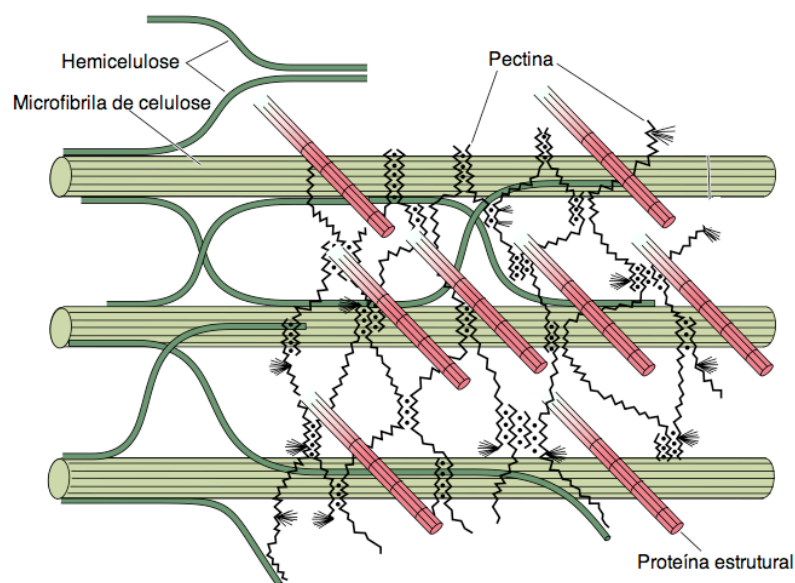


Figura 17: Diagrama esquemático dos componentes estruturais da parede celular primária e seus arranjos. As microfibrilas de celulose são revestidas com hemiceluloses (como as xiloglicanas), que podem interligar as microfibrilas umas as outras. As pectinas formam um bloqueio de matriz e interage com proteínas estruturais (modificada de Taiz & Zeiger, 2010).

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por polímeros de celulose, hemicelulose e lignina ligados por uma estrutura complexa, representando cerca de 70% da biomassa vegetal (Jorgensen et al. 2007). Cada tipo de biomassa, como bagaço de cana de açúcar, palha de arroz, palha de trigo e palha de milho, possuem porcentagens diferentes em sua composição química (tabela 7). O bagaço é composto por 19-24% de lignina, 27-32% de hemicelulose e 32-44% de celulose (Jacobsen & Wyman, 2002).

Tabela 7: Composição química de resíduos agroindustriais (in Sarkar et al., 2012)

Substrato	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Proteína (%)
Palha de arroz	32-47	19-27	4,24	
Palha de trigo	35-45	20-30	5,15	3,1
Palha de milho	42,6	21,3	8,2	5,1
Bagaço de cana de açúcar	32-44	27-32	19-24	3
Substrato	Glicose (%)	Xilose (%)	Galactose (%)	Arabinose (%)
Palha de arroz	41-43,4	14,8-20,2	0,4	2,7
Palha de trigo	38,8	22,2	2,7	4,7
Palha de milho	39	14,8	0,8	3,2
Bagaço de cana de açúcar	38,1	23,3	1,1	2,5

As paredes celulares podem ser consideradas estruturas modulares na qual diferentes proporções de classes de polímeros associados formam compostos através de interações não covalentes. Diferentes funções dessas estruturas irão depender do arranjo dos polímeros na parede celular, conhecido como arquitetura da parede celular (McCann & Roberts,). Os principais elementos estruturais que formam a estrutura detalhada da parede celular são a cadeia principal, ramificações contendo elementos carboidratos e não

carboidratos. A partir do entendimento da estrutura detalhada de paredes principais de hemicelulose, Buckeridge & de Souza (2014), propuseram o código glicômico. Definido como a diversidade de resultados encriptados dos mecanismos biossintéticos dos polissacarídeos da parede celular da planta que formam os domínios da estrutura detalhada, o código glicômico é responsável pela formação dos compostos do polímero com diferentes níveis de interação e recalcitrância a hidrólise. Regiões dos polissacarídeos hidrolizados por endoglucanases são definidas por *pexons* e porções ramificadas dos polímeros que são bloqueadas ao ataque de endoenzimas são definidas por *pointrons*. Do ponto de vista biotecnológica para produção do bioetanol de segunda geração, o entendimento do código glicômico auxiliará na hidrólise enzimática eficiente de regiões recalcitrantes da parede celular.

1.2.1.1 Celulose

A celulose é um dos principais constituintes da parede celular vegetal formada por monômeros de D-glicose ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas que formam moléculas de celobiose. As celobioses formam longas cadeias, chamadas de fibrilas, que são ligadas por ligações de hidrogênio e por forças de *van der Waals* (Pérez et al., 2002) (figura 18). As microfibrilas, formadas por um conjunto de fibrilas, são altamente organizadas, rígidas, cristalinas, de difícil acesso pelas enzimas e resistentes à degradação. Possuem algumas regiões amorfas na cadeia de celulose que são suscetíveis ao ataque enzimático. A hemicelulose e pectina envolvem a microfibrila, formando uma rede coesa e atuando como um revestimento para evitar atrito entre as microfibrilas (Carpita & Gibeaut 1993).

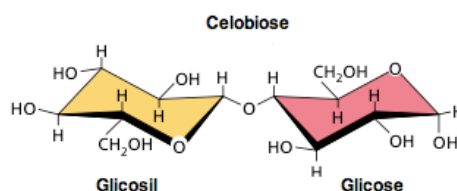


Figura 18: Celobiose. Ligação β -1,4-glicosídica entre dois resíduos de glicose em orientação invertida (modificada de Taiz & Zeiger, 2010).

1.2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é uma estrutura amorfa e variável. É formada por unidades heteropolímeros que incluem as hexoses como as D-glicoses, D-galactoses e D-manoses; pentoses como as D-xiloses e L-arabinoses; e ácidos urônicos como as D-galacturônicos, D-glicurônicos e ácidos metilglucurônicos (Limayem & Ricke, 2012). Os açúcares são unidos por ligações glicosídicas β -1,4 e ocasionalmente β -1,3. As hemiceluloses mais abundantes, a xilana e xiloglicana, contêm ligações glicosídicas β -1,4 e possui várias ramificações composta de monômeros de xilose e galactose. As ramificações da cadeia principal tem

função de prevenir que a xiloglicana se transforme em uma microfibrila cristalina. A composição precisa da hemicelulose é extremamente dependente da espécie da planta e tecidos (Scheller & Ulvskov, 2010) (figura 19).

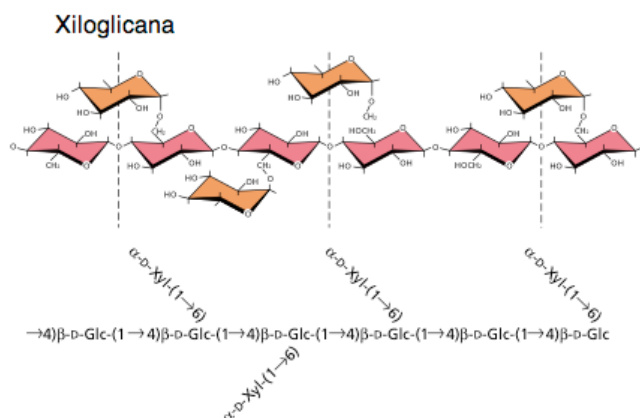


Figura 19: Estrutura parcial da hemicelulose xiloglicana (modificada de Taiz & Zeiger, 2010).

1.2.1.3 Lignina

A lignina é o terceiro complexo fenólico mais abundante na natureza. Está presente na parede celular das plantas e confere rigidez, impermeabilidade, resistência contra ataque microbiano e estresse oxidativo. A lignina é uma rede de heteropolímeros amorfa de fenilpropanóides monoméricos como, o cumaril, coniferil e álcool sinapil, que se ligam por diferentes tipos de ligações (Hendricks & Zeeman, 2009). Lignina é geralmente aceita como a cola que liga os diferentes componentes da biomassa lignocelulósica e o mantém insolúvel em água. Devido a sua próxima associação com as microfibrilas de celulose, a lignina tem sido identificada como maior impedimento a hidrólise enzimática e microbiana da biomassa lignocelulósica (Avgerinos & Wang, 1983; Pérez et al., 2002).

1.2.1.4 Pectina

Outro polímero presente na parede celular das plantas é a pectina. Algumas plantas como casca de citrus são ricas em pectina (Angel Siles Lopez et al. 2010). Semelhante a hemicelulose, a pectina é composta por um grupo heterogêneo de açúcares. A cadeia principal da pectina, consiste principalmente de açúcares ácidos como ácido galacturônico e açúcares neutros como raminose, galactose e arabinose. As pectinas são classificadas em basicamente três grupos, homogalacturonana, que é um polímero linear de ligação 1-4 α -D-ácido galacturônico, xilogalacturonana, que é um polímero ramificado por ligações β -1,3-xilosídicas e ramnogalacturonana, que é uma cadeia extensa e longa de resíduos alternados de 1-4 α -D-ácido galacturônico e 1-2 α -D-ácido raminose (Ridley et al. 2001; Wong, 2008) (figura 20).

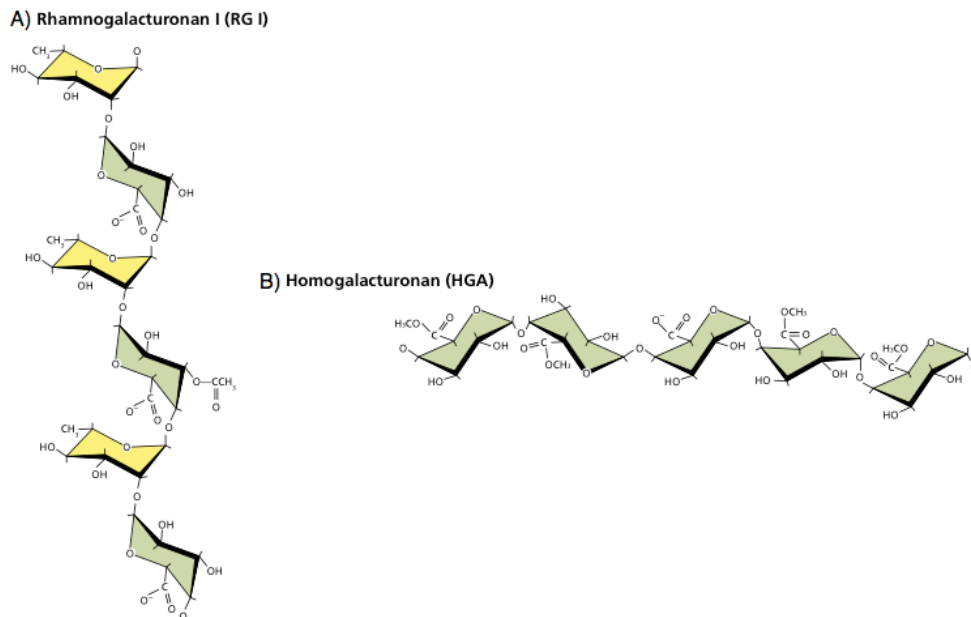


Figura 20: Estrutura parcial da pectina. A) rhamnogalacturonan; B) homogalacturonan (modificada Taiz & Zeiger, 2010).

1.2.2 Produção do bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica

A produção do combustível etanol a partir da biomassa lignocelulósica pode ser realizada por duas diferentes abordagens, conversão termoquímica e bioquímica. Ambas as abordagens incluem a quebra da recalcitrância da estrutura da parede celular lignocelulósica em fragmentos de lignina, hemicelulose e celulose. A conversão termoquímica inclui a gasificação da matéria prima a temperatura de 800°C seguida da reação catalítica. Já a conversão bioquímica inclui o pré-tratamento, hidrólise enzimática ou ácida dos materiais celulósicos e hemicelulósicos, a conversão em açúcares monoméricos (sacarificação), fermentação biológica pela ação de um micro-organismo, como por exemplo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Hahn-Hagerbal *et al*, 2006), e purificação do etanol por meio de destilação (Mu *et al.*, 2010).

1.2.2.1 O pré-tratamento

O pré-tratamento é um dos principais passos para a conversão com sucesso de materiais lignocelulósicos em etanol. Ele diminui a recalcitrância da biomassa lignocelulósica e aumenta a superfície de contato para a otimização da acessibilidade aos carboidratos da planta no processo biológico da hidrólise enzimática (Gámez *et al.*, 2006).

Diversos métodos de pré-tratamentos mecânicos, físico-químicos, químicos, biológicos, entre outros, têm sido descritos para a remoção da recalcitrância da parede celular lignocelulósica. Apesar da maioria dos pré-tratamentos conseguirem liberar

hemicelulose e celulose da parede celular, alguns são economicamente inviáveis devido as questões técnicas aplicadas à produção em larga escala (Socool et al., 2010).

No Brasil, diversos grupos de pesquisa têm sido envolvidos no desenvolvimento ou avaliação de diferentes métodos de pré-tratamento como o organosol, auto-hidrólise, hidrólises ácidas, água quente líquida (*liquid hot water – LHW*) e dióxido de carbono (CO₂). Nos últimos anos intensivos esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de tecnologias eficientes para o pré-tratamento do bagaço, o desenvolvimento de enzimas para aumentar a sacarificação de celulose e hemicelulose, e tecnologias adequadas para a fermentação de C₆ (glicose) e C₅ (xilose) (Socool et al., 2010).

1.2.2.2 A hidrólise

O sucesso da hidrólise é extremamente dependente da efetividade do pré-tratamento. Na reação de hidrólise, a partir da celulose e hemicelulose, são liberados monômeros de açúcares prontamente disponíveis para a fermentação e conversão em etanol (Chandel et al., 2007). Existem dois tipos de processo de hidrólise, um que envolve reações ácidas, com ácido sulfúrico, e outro que envolve a ação de enzimas.

A hidrólise ácida requer altas temperaturas, entre 200-240°C, para a quebra dos cristais de celulose. É seguida da degradação de hexoses e pentoses havendo formação de altas concentrações de compostos tóxicos que diminuem a efetividade da sacarificação (Sun, 2002). A hidrólise ácida é comercialmente menos atrativa, pois requer grandes quantidades de ácido e custos adicionais para a reciclagem do ácido (Hamelinck et al., 2005).

O uso de enzimas naturalmente secretadas por fungos celulolíticos na desconstrução da biomassa têm sido consideradas uma abordagem interessante. A hidrólise enzimática pode ser realizada separadamente da fermentação alcoólica, processo conhecido como hidrólise e fermentação separadas (SHF) ou os processos podem ser realizado juntos, sacarificação e fermentação simultânea (SSF) (Socool et al., 2010).

No processo de SHF a hidrólise pode ser realizada com enzimas estáveis a altas temperaturas, favorecendo a inibição de contaminações por bactérias. Também facilita a separação dos xaropes de açúcares da lignina hidrofóbica. Entretanto, a SHF leva o acúmulo de glicose derivada da hidrólise da celulose que pode inibir as endo e exo-glucanases e β-glicosidasas, afetando as taxas da reação. No processo de fermentação subsequente, as células de leveduras podem ser recicladas ou utilizadas na alimentação animal (Socool et al., 2010).

No processo SSF, a produção de etanol é mais rápida e o risco de contaminação é mais baixo devido a presença de etanol e condições anaeróbicas. O processo também apresenta baixos custos devido a utilização de somente um reator. A dificuldade nesse processo está relacionada a diferença de temperatura ótima entre hidrólise enzimática (45-50°C) e fermentação alcoólica (28-35°C) (Socool et al., 2010).

1.2.3. Enzimas produzidas por fungos capazes de despolimerizar a parede celular vegetal

O Brasil possui uma grande diversidade de micro-organismos capazes de produzir e secretar enzimas lignocelulolíticas. Uma grande variedade de fungos são capazes de degradar o bagaço da cana de açúcar, incluindo fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Esses micro-organismos produzem uma mistura complexa de enzimas que catalizam a hidrólise de carboidratos. São organizadas em glicosidases de diferentes famílias baseado na sequência de aminoácido estruturalmente relacionada aos módulos catalíticos. Essas sequências podem ser encontradas no banco de dados CAZY (Carbohydrate Active enZymes database - www.cazy.org).

As enzimas de fungos envolvidas na degradação de polissacarídeos de plantas estão distribuídas em pelo menos 35 famílias de glicosil hidrolases (GH), 3 famílias de carboidrato esterases (CE) e 6 famílias de polissacarídeo lisase (PL) (Battaglia et al. 2011; Coutinho et al. 2009).

Apesar de enzimas que estejam classificadas em uma mesma família, estas podem apresentar múltiplas atividades. Por exemplo, a família GH5 possui várias atividades catalíticas, incluindo exoglucanases, endoglucanases e endomananases (Dias et al., 2004). A especificidade de atividade enzimática é importante para a eficiente degradação do polissacarídeo da planta, uma vez que as enzimas de cada família possuem especificidade complementar ao substrato.

1.2.3.1.1 Degradação da celulose

A degradação da celulose é realizada por enzimas que possuem diferentes especificidades e trabalham em conjunto, hidrolizando as ligações β -1,4-glicosídicas presentes na celulose. Tradicionalmente, essas enzimas são divididas em β -1,4-endoglucanase (EGL) (EC 3.3.1.4), também conhecidas como endocelulases capazes de hidrolisar ao interior da molécula de celulose, exoglucanases/celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91) que catalisam a hidrólise da celulose insolúvel em celooligossacarídeos como a celobiose, e as β -glicosidades (BGL) (EC 3.2.1.21), que quebram os oligossacarídeos, liberando monômeros de glicose (Vries, 2011). Essas enzimas são divididas em oito famílias GH. As β -1,4-endoglucanase (EGL) (EC 3.3.1.4) pertencem as famílias GH 5,7,12 e 45. Já as exoglucanases/celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91) pertencem as famílias GH 6 e 7, e as β -glicosidades (BGL) (EC 3.2.1.21) pertencem as famílias GH 1 e 3. (figura 21).

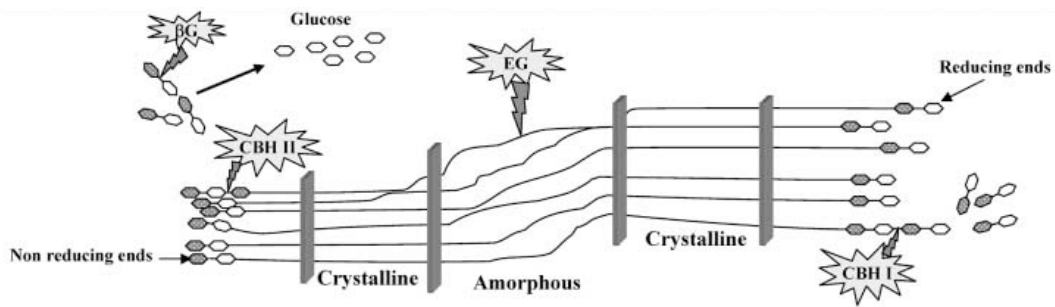


Figura 21: Estrutura esquemática da celulose com enzimas celulolíticas. β -glicosidase (BGL), celobiohidrolase (CBH) e β -1,4-endoglucanase (Pérez et al., 2002).

O fungo lignocelulolítico *Aspergillus niger* possui cinco EGLs dentro da família GH5 e 12, quatro CBHs nas famílias 6 e 7, e 13 BGLs nas famílias 1 e 3. Enquanto que *Trichoderma reesei*, o fungo reconhecido como extremamente eficiente na degradação da celulose, possui cinco EGLs na família GH 5, 7, 12 e 45, duas CBHs super expressas das famílias 6 e 7, e duas BGLs das famílias 1 e 3 (Martinez et al. 2008; Kubicek et al. 2011). Embora o *T. reesei* não possua o maior numero de celulases, o seu conjunto de enzimas é muito eficiente na quebra da celulose agindo de modo sinérgico (Ward et al., 1993).

A EGI (GH7) e EGII (GH5) são as enzimas mais abundantes produzidas por *Trichoderma reesei* das 5 EGLs (Foreman et al., 2003; Vlasenko et al. 2010). Ambas as enzimas possuem um módulo de ligação ao carboidrato que aumenta a eficiência da degradação da microfibrila de celulose pela ligação da celulose (Beckham et al., 2010; Guillen et al., 2010). EGII da GH 12, é expressa em um nível menor do que a EGI e EGII, porém possui uma ampla atividade contra a celulose, β -1,4-glicosídica, xiloglucana e xilana (Sprey & Bochem 1003; Eriksson et al., 2002).

Duas CBHs muito expressas de *T. reesei* são as CBHI e CBHII que pertencem às famílias 7 e 6, respectivamente. Essas enzimas são consideradas por agirem sinérgicamente e terem preferência pelo terminal redutor ou não redutor, respectivamente, das cadeias de celulose (Nutt et al., 1998). CBHs também são consideradas importantes para a hidrólise de partes cristalinas da celulose (Liu et al., 2011). Essas CBHs de *T. reesei* são extremamente sensíveis à inibição pelo produto, em particular pela celobiose (Bezerra & Dias, 2005; Holtzaple et al., 1990; Kristensen et al., 2009).

Depois da quebra endo e exo da celulose, BGLs pertencentes as famílias GH 1 e 3 degradam os oligossacarídeos remanescentes para glicose monomérica. BGLs são um grupo com propriedades diversas e localização celular, embora a maioria das BGLs pertençam à GH3 e tenham mecanismo de retenção similar (Decker et al., 2001; Saloheimo et al., 2002). As duas BGLs conhecidas de *T. reesei*, BGI e BGII são produzidas em baixos níveis e são sujeitas a forte inibição pelo produto (Chen et al., 1992). Essas características mascaram a função celulósica de *T. reesei* para a extensiva sacarificação da celulose *in vitro*. Porém em aplicações industriais, as misturas são frequentemente suplementadas com

BGLs de *Aspergilli*, os quais são super expressos e mais tolerantes à glicose (Decker et al., 2000; Reczey et al., 1998; Riou et al., 1998).

1.2.3.1.2 Degradação da hemicelulose

Hemicelulose, o segundo polissacarídeo mais abundante das plantas, é um grupo de estruturas complexas compostas por 3 tipos de cadeias principais e diferentes tipos de ramificações (figura 22). Os três tipos de cadeias principais correspondente ao grupo das hemiceluloses, são hidrolizados por um conjunto específico de enzimas dedicadas a quebra de carboidratos. A xilana é o composto principal da hemicelulose. As enzimas β -1,4-endoxilanase (EC 3.2.1.8) e β -1,4-xilosidase (EC 3.2.1.37) hidrolisam os xilo-oligossacarídeos em xilose, as xiloglicanas ativas β -1,4-endoglucanase e β -1,4-glicosidade fazem a quebra da xiloglicana. Outras enzimas acessórias como a α -L-arabinofuranosidase, α -glucoronidase, acetilxilana esterase, ácido ferulico esterase e ácido *p*-coumarico esterase, são também necessárias para a hidrólise das diferentes cadeias laterais da xilana (Striker et al., 2008).

As β -1,4-endoxilanasas de fungos pertencem as famílias GH 10 e 11, diferenciando entre si na especificidade do substrato. Endoxilanasas da família GH 10, em geral, possuem ampla especificidade a substratos do que a família GH 11. Enzimas GH 10 degradam não só cadeias lineares ligados D-1,4 com resíduos de xilose, mas também cadeias principais de xilanas com um alto grau de substituições e pequenos xilo-oligossacarídeos (Pollet et al., 2010). Portanto, endoxilanasas da família GH 10 são importantes para a degradação completa de xilanas substituídas. Os xilo-oligossacarídeos são degradados pelas β -xilosidases. A maioria das β -xilosidases de fungos pertencem à família GH 3, porém as β -xilosidases produzidas por *Aspergillus oryzae* e *Penicillium herquei*, pertencem à família GH 43 (Ito et al., 2003; Machida et al., 2005). As xiloglucanasas pertencem às famílias GH 12 e 74. A principal diferença entre enzimas dessas famílias são os seus mecanismos de retenção (GH 12) e inversão (GH 74) (Gilbert et al., 2008). Enzimas GH 12 de *A. niger* não fazem a quebra nos resíduos de glicose ramificada, elas preferem os xiloglico-oligossacarídeos contendo mais de seis resíduos de glicose com, pelo menos, um resíduo de glicose não ramificado (Master et al., 2008; Desmet, et al., 2007).

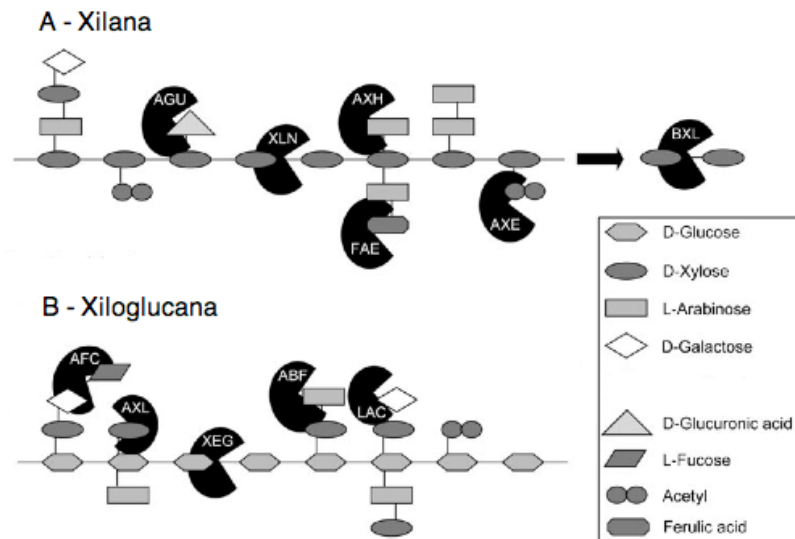


Figura 22: Estrutura esquemática de duas hemiceluloses, xilana e xiloglicanas com enzimas hemicelulolíticas. ABF α -arabinofuranosidase; AFC α -frucosidase; AXE acetil esterase; AGU α -glucuronidase; AXH arabinoxilana α -arabinofuranohidrolase; AXL α -xilosidase; BLX β -1,4-xilosidase; FAE feruloil esterase; LAC β -1,4-galactosidase; XEG xiloglicana ativa β -1,4-endoglucanase; XLN β -1,4-endoxilanase (modificado Brink & Vries, 2011).

Stricker et al. (2008) descreve o mecanismo de regulação transcricional de genes que codificam celulasas e hemicelulasas de *A. niger*. O regulador transcricional XlnR que foi inicialmente identificado em *A. niger* como regulador transcricional de genes que codificam a xilanase, controla a transcrição de uns 20-30 genes entre eles hemicelulasas e celulasas. XlnR regula a transcrição dos genes *xlnB*, *xlnC* e *xlnD* que codificam principais enzimas xilanolíticas (endoxilanase B e C e β -xilosidase). A produção xilanolítica é regulada por três mecanismos independentes, pH do ambiente, repressão do catabolismo do carbono (CCR) e indução específica na presença de xilana e xilose. XlnR também regula a transcrição de endoglucanases (*eglA* e *eglB*) e celobiohidrolases (*cbhA* e *cbhB*) (McKelvey & Murphy, 2010).

1.2.3.1.3 Degradação da Pectina

A degradação da cadeia principal de pectina requer duas classes de enzimas, as glicosil hidrolases e polissacarídeos liases. Grande parte das glicosil hidrolases de fungos envolvidas na degradação da cadeia principal de pectina, pertencem a família GH 28 (Martens-Uzunova & Schaap, 2009). Essas enzimas podem ser divididas em dois grupos de acordo com a especificidade de ataque à pectina. Endo e exopoligalacturonase quebram ligações α -1,4-glicosídicas entre α -ácidos galacturônicos da cadeia principal, enquanto regiões mais densas de ramificações são quebradas pelas endo e exoramnogalacturonase, xilogalacturonase (figura 23). Estas fazem a quebra de ligações α -1,2-glicosídicas formadas entre D-ácidos galacturônicos e resíduos de L-raminose (Kofod et al., 1994; Suykerbuyk et al., 1005).

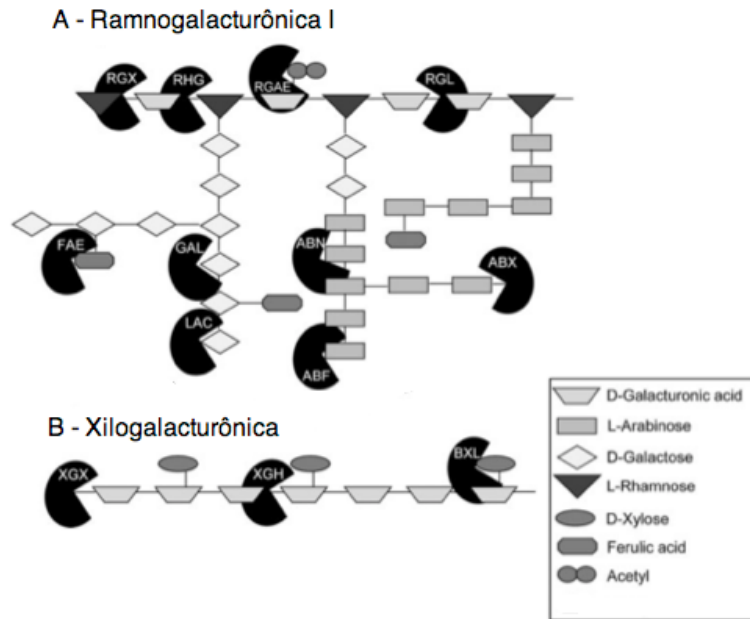


Figura 23: Estrutura esquemática de duas pectinas, ramnogalacturônica I e xilogalacturônica com enzimas pectinolíticas. ABF α -arabinofuranosidase; ABN endoarabinase; ABX exoarabinase; BLX β -1,4-xilosidase; FAE feruloil esterase; GAL β -1,4-endogalactanase; LAC β -1,4-galactosidade; RGAE ramnogalacturônico acetil esterase; RGL ramnogalacturônico liase; RGH endoramnogalacturonase; RGX exoramnogalacturonase; XGH engoxilo-galacturonase; XGX exoxilogalacturonase, α -ramnosidase (RHA) (modificado Brink & Vries, 2011).

1.2.3.1.4 Degradação da Lignina

A degradação da lignina é um processo resultante da ação coordenada de enzimas lignocelulolíticas. São enzimas do grupo das oxidoreduções, como as peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio, que desestabilizam as ligações da macromolécula, causando o seu colapso. As peroxidases (E.C. 1.11.1) são agrupadas em dois grupos, as ligno-peroxidases (LiPs) e as manganeso-peroxidases (MnPs). As LiPs agem oxidando compostos fenólicos, aminas, éteres aromáticos e aromáticos policíclicos presentes nas regiões expostas do lúmen. Já as MnPs oxidam Mn (II) a Mn (III), oxidando apenas os compostos fenólicos da lignina (Dashtban et al., 2010). As peroxidases são responsáveis pela fragmentação inicial do polímero de lignina quando na presença de peróxido de hidrogênio. Já a lacase (E.C. 1.10.3.2), possui grande capacidade de oxidar fenóis e polifenóis, fenóis com metoxilações e aminas aromáticas, reduzindo a molécula de oxigênio em uma molécula de água e ajudando a diminuir a recalcitrância da planta (Fasanella, 2008). Peroxidases e lacases agem sobre a molécula de lignina, favorecendo a delignificação das fibras lignocelulósicas e assim como as hemicelulases facilitam o acesso das celulases ao interior do substrato (Dashtban et al., 2010). Grupos fenólicos formados na degradação da lignina inibem a ação de enzimas celolíticas, portanto, influenciam negativamente no desempenho da hidrólise enzimática.

1.3 Genômica e transcritômica aplicada a fungos lignocelulolíticos

1.3.1 Genômica

A grande demanda de energia mundial e fontes fósseis limitadas, ditam a necessidade de exploração e o desenvolvimento alternativo de fontes de energia renováveis. Uma das alternativas é o biocombustível de segunda geração, baseado na eficiente combinação das plantas em produzir e armazenar carbono na forma de celulose, hemicelulose e lignina, e micro-organismos que decompõem esses resíduos e convertem os açúcares liberados em combustíveis renováveis. Estudos de genômica oferecem ferramentas para explorar mecanismos moleculares desses processos naturais e otimizar a engenharia industrial do bioprocessamento de fontes renováveis por meio de fungos.

O primeiro marco da genômica de fungos foi o sequenciamento completo do genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau et al., 1996). Depois, visando o conhecimento dos bioprocessos celulolíticos e hemicelulolíticos, e suas aplicações biotecnológicas, outros fungos filamentosos apresentaram, no final do século passado, enormes avanços em estudos de genômica.

A. oryzae, estirpe RIB40/ATCC 42149, teve o seu genoma completamente sequenciado sob a coordenação do *A. oryzae* Genome Analysis Consortium. O tamanho do genoma foi estimado em 37.12Mb, com predição atual de 12.336 genes. A versão preliminar do genoma foi publicado por Machida et al. (2005), com análises de sintenia com os genomas de *A. fumigatus* AF293 e *A. nidulans* FGSC (Galagan et al. 2005; Nierman et al. 2005). *A. terreus*, estirpe NIH2624, um microrganismo utilizado como fonte de enzimas importantes como as xilanases, foi completamente sequenciado pelo Broad Fungal Genome Initiative. O genoma completo foi estimado em 29.33 Mb, sendo codificado 10.406 genes. *A. niger* é um fungo bastante utilizado pela indústria para a produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas. O genoma da estirpe ATCC 1015 foi sequenciado pelo *Joint Genome Institute* (JGI), com tamanho estimado em 37.2Mb, com 11.200 genes preditos (Pel et al., 2007).

Embora o gênero *Aspergillus* apresente grande potencial nos bioprocessos celulolíticos e hemicelulolíticos, o gênero *Trichoderma* também é conhecido pelo seu potencial celulolítico. *T. harzianum* é um produtor de celulasas como exoglucanases, endoglucanases e β -glicosidases. No últimos quatro anos, os genomas de estirpes de *T. reesei* (Martinez et al., 2008) e *T. atroviride* (Kubicek et al., 2011) tiveram seu genoma completamente sequenciados. Entretanto para *T. harzianum* e *T. virens* o sequenciamento dos seus genomas ainda continuam incompletos. *T. reesei* é hoje uma fonte principal de enzimas usados na produção de etanol proveniente da hidrólise de celulose. O genoma foi publicado recentemente, possui tamanho de aproximadamente 34 Mbp, e com 9.129 genes preditos. O número de genomas fúngicos sequenciados parcial ou completamente que estão disponíveis nas bases de dados aumentam constantemente (Weld et al., 2006). Atualmente constam mais de 360 genomas de fungos (Ascomycetos, Basidiomycetos e outros fungos) em fase de sequenciamento ou já sequenciados no NCBI. Estes dados fornecem um caminho

para a construção de estirpes modificadas para aplicações industriais como produção de bioenergia.

1.3.2 Transcritômica

Visando o melhoramento dos processos de conversão da biomassa lignocelulósica por meio de fungos filamentosos, faz-se necessária a aplicação de métodos que avaliem os níveis de expressão de enzimas de fungos potencialmente lignocelulósicos. A transcritômica aplicada ao estudo de fungos filamentosos consiste na obtenção de ESTs (*Expressed Sequenced Tags*), definidos como sequências curtas de transcritos de genes expressos, produzidas a partir de clones de cDNA escolhidos aleatoriamente e sequenciados uma única vez (Gautheret et al., 1998). O sequenciamento somente da porção transcrita do genoma (genoma funcional / transcrito) tem aplicação não somente na identificação de genes, mas também na comparação de expressão genica. Análises bioinformáticas podem ser utilizadas para diferenciar níveis de expressão de genes via análises estatísticas de número de cópias de cada sequência gênica comparada. Assim, microrganismos podem ser analisados quanto à expressão gênica diferenciada em larga escala para uma determinada característica, em ambientes contrastantes, possibilitando o isolamento de genes envolvidos que conferem e regulam tal característica.

O genoma funcional de espécies membros do gênero *Aspergillus* tem sido estudado, com aplicação incluindo a busca de genes envolvidos na produção de enzimas e compostos químicos de valor na indústria. No final dos anos 90, o primeiro estágio da genômica de *A. oryzae* focou no sequenciamento em larga escala de ESTs a partir de cultivos sob diversas condições de crescimento (Machida, 2003; Yu et al., 2004), gerando cerca de 6.000 sequências não redundantes. Desde então, o Gênero *Aspergillus* possui 10415 ESTs de *A. terreus*, 19830 de *A. oryzae*, 14195 de *A. niger* depositados no banco de dados Genbank do NCBI.

Entre as aplicações da análise do genoma funcional de *Aspergillus* não aflatoxigênico, está na compreensão dos mecanismos envolvidos na dinâmica de genes envolvidos na síntese de enzimas e compostos químicos de valor industrial, como por exemplo a caracterização da xilanase da família GH10 de *A. terreus* (Garcia-Kirchner et al., 2002; Chantasingh et al., 2006).

Exemplos da aplicação da análise do genoma funcional de *Aspergillus* por meio de ESTs podem ser vistos como, a análise do perfil transcricional de *A. niger* em resposta a dois meios de cultura limitantes, xilose e maltose, sugerindo que a regulação transcricional da via secretora é parte do mecanismo fisiológico adaptada para secretar enzimas específicas ao substrato (Jørgensen et al., 2009). Comparações entre o transcrito de *A. oryzae*, *A. nidulans* e *A. niger* cultivados em meios contendo glicose e xilose identificaram genes conservados entre as espécies de *Aspergillus*, como o ativador transcricional *XlnR*

(Andersen et al., 2008). Semelhante comparação foi realizada entre *A. oryzae* e *A. niger* utilizando como substrato maltose e glicose (Vongsangnak et al., 2009).

Genes de *A. niger* codificadores de celulases e hemicelulases que tiveram aumento de expressão durante crescimento em bagaço de cana de açúcar foram analisados por ESTs. No mesmo trabalho também foi determinado se o acúmulo de mRNA de genes induzidos pelo bagaço de cana e codificadores de transportadores, são induzidos por xilose e são dependentes de glicose. Foram identificados 18 e 21 genes codificadores de celulases e hemicelulases, respectivamente, que possuem a expressão aumentada durante o crescimento em bagaço de cana de açúcar (Souza et al., 2011).

Mecanismos moleculares relacionados à adaptação a hipóxia também tem sido estudado em *A. fumigatus* (Terabayashi et al., 2012; Barker et al., 2012), assim como a influencia de substâncias no meio de cultura na expressão de genes em *A. fumigatus* (Gautam, 2011).

Análise da expressão de genes por *A. oryzae* sob diferentes condições de crescimento tem sido conduzida por diferentes abordagens. Análise por ESTs descrita por Akao et al. (2007) e Vongsangnak et al. (2008) mostram que dentre todas as sequencias consenso gerada por ESTs, 72,4% resultaram de um dentre nove condições de cultivo de importância biológica ou industrial de *A. oryzae* RIB40.

Análises comparativas a níveis genômicos e transcritômicos entre *A. oryzae* e *A. niger* de genes co-expressos conservados, catabolismo de ácidos graxos pela via de beta-oxidação, transporte de ácidos graxos, desvio do glioxilato e biogênese peroxissomal foram identificados como vias chave que co-evoluíram entre as duas espécies. Motifs regulatórios e fatores de transcrição também foram identificados. O motif "CCTCGG" foi identificado como principal sitio de ligação para os fatores de transcrição *FarA* e *FarB* envolvidos no metabolismo de lipídeos e biogênese peroxissomal. Outros motifs identificados foram consistentes com os sítios de ligação dos fatores de transcrição de *XlnR* (Andersen et al., 2008), *CreA* (Chamalaun-Hussey, 1996), e *Adr1* (Salazar et al., 2009). Os achados mostram que essas proteínas são evolutivamente conservadas entre as espécies de *Aspergillus* (Vongsangnak et al., 2010).

O estabelecimento da rede de integração da regulação metabólica, identificação de fatores de transcrição, genes, enzimas, proteínas e metabólitos envolvidos em resposta à um estímulo, como no estudo da análise do transcrito de *A. oryzae* em resposta a o aumento do nível de produção da α -amilase (Vongsangnak et al., 2011) também têm sido realizados.

Análises por microarranjos da expressão de genes também têm sido empregadas por Tamano et al. (2008), mostrando que a expressão transcricional dos genes relacionados ao metabolismo é significativamente mais fraca do que os genes dos blocos sintênicos. Os trabalhos sugerem que genes localizados em blocos não sintênicos, são genes do metabolismo secundário e possuem um importante papel na expressão de enzimas extracelulares de *A. oryzae* capazes de degradar a biomassa lignocelulósica (Machida et al., 2005).

Vongsangnak et al. (2009) recentemente relatou o uso do Affymetrix GeneChip com oligonucleotídeos representando 13.120 genes putativos no genoma de *A. oryzae* (Machida et al., 2005; Vongsangnak et al., 2008) para análise de transcrito comparativo durante o cultivo em glicose e maltose como fontes de carbono. Foram identificados genes regulados positivamente durante o crescimento em maltose, correspondendo a regulação MAL de três genes, assim descritos anteriormente para *Saccharomyces cerevisiae* (Chow et al., 1989).

Estudos com microarranjos também demonstram que *A. oryzae* cultivado em cultura líquida suplementada com glicose expressa altos níveis de transcritos de genes catabólicos das vias glicolíticas (EMP) e ácido tricarboxílico (TCA). Resultados sugerem a utilização de ambas as vias no metabolismo de glicose sob condições de disponibilidade de glicose. Nesse mesmo trabalho, os microarranjos foram utilizados para comparar perfis de expressão enzimática de *A. oryzae* cultivado em farelo de trigo, arroz e soja fase sólida. Celulases (endoglucanase), hemicelulases (xilanase e β -xilosidade), amilases (taka-amilase e glicoamilase) e α e β -glicosidade foram expressas em culturas com farelo de trigo. Em culturas com farelo de soja geraram altos níveis de expressão para genes que codificam β -xilosidade e β -glicosidade. E para cultura com farelo de arroz foram expressos genes que codificam a β -xilosidade e a glucan 1,4- α -glicosidade. Os dados suportam que o *A. oryzae* é um forte candidato para a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica (Maeda et al., 2004).

1.3.3 Next Generation Sequencing-NGS

Atualmente a transcriptômica vem utilizando as novas tecnologias de Sequenciamento Massal em Paralelo (Next Generation Sequencing-NGS ou sequenciamento de segunda geração) e de análise do transcrito, possibilitando a caracterização de unigenes e sua expressão em escala com velocidade e precisão (Mardis, 2008). As técnicas disponíveis mais utilizadas em estudos de transcriptômica são a 454 (www.rocke-applied-science.com) e a Illumina (www.illumina.com). Comparada a abordagens tradicionais de análise de transcrito, Illumina RNA-seq oferece diversas vantagens como a quantificação acurada de níveis baixos de expressão de genes. Além de ser muito sensível e poder detectar grande amplitude de níveis de expressão de genes, contrastando com microarranjos, o qual é menos sensível.

A tecnologia de sequenciamento massal por Illumina (Illumina Genome Analyzer) é baseada no conceito de sequenciamento por síntese, onde milhões de fitas de cDNA são ligados a adaptadores em ambas as extremidades dos fragmentos. Os fragmentos de fita simples de cDNA são então ligados randomicamente uma superfície laminar sólida e opticamente transparente que contém oligonucleotídeos complementares aos adaptadores das amostras. Nucleotídeos livres e enzimas polimerase são adicionadas à superfície laminar para iniciar a amplificação por ponte (*Bridge-PCR*) da fase sólida. A *Bridge-PCR* gera

milhões de densos grupos de cDNA fita dupla. Os membros de cada cluster são sequenciados através da utilização de uma polimerase e quatro terminadores reversíveis marcados com diferentes fluoróforos. O primeiro ciclo do sequenciamento é marcado pela incorporação dos terminadores reversíveis marcados, havendo a excitação do laser, a fluorescência emitida por cada grupo de cDNA fita dupla é capturada, e a primeira base é identificada. As imagens capturadas são alinhadas e comparadas ao genoma de referência (<http://www.illumina.com/>).

RNA-Seq é um método recentemente desenvolvido para o sequenciamento via shotgun do transcrito, onde o cDNA é fragmentado mecanicamente para produzir a sobreposição de pequenos fragmentos que possam cobrir todo o transcrito. Essa abordagem permite a identificação de novos exons, isoformas, genes, entre outros, envolvidos na alta produtividade de proteínas quando sob condições contrastantes. A tecnologia de sequenciamento massal paralelo mostra uma abordagem mais sensível para a caracterização de transcritos com baixos níveis de expressão (Garber et al., 2011), em contraste com abordagens SAGE e microarranjos. Análise de todos os níveis de expressão em organismos submetidos a um tratamento em particular podem ser determinadas através da contagem do total de números de moléculas individuais de mRNA transcritas e, subsequente sequenciadas, para cada gene. Esse método de perfil da transcrição direta é livre da tendência das abordagens de clonagem como, aquele em que o transcrito é mais provável em refletir a biologia da célula (Wang et al., 2009).

Essa tecnologia tem sido aplicada em análise de expressão de genes de inúmeros fungos como, o patógeno de plantas oomycete *Phytophthora phaseoli* (Kunjeti et al., 2012), que aplicaram RNA-Seq Illumina para elucidar a interação entre planta e hospedeiro. Seis bibliotecas foram mapeadas no modelo mais próximo *Phytophthora infestans*, resultando em 10.427 genes homólogos e com expressão em pelo menos uma biblioteca. 318 desses genes resultaram em homologia à genes de virulência. Berka et al. (2011) em análise RNA-Seq Illumina buscando o perfil transcricional de genes codificadores de enzimas com atividade carboidrato em *Myceliophthora thermophila* e *Thielavia terrestris* quando cultivados em cevada, palha de alfafa e glicose, identificaram regulação positiva em genes envolvidos na degradação da lignocelulose quando expostas a polissacarídeos derivados de biomassa. Similarmente, Delmas et al. (2012) recentemente relatou a aplicação de SoLID para o perfil do transcrito de *A. niger*. RNA-Seq usando SoLID revelou que aproximadamente 20% do total de mRNA está envolvido na expressão de genes relacionada a enzimas que degradam a parede celular de planta após 24 horas de exposição a palha de trigo.

Sob condições contrastantes, fatores transcricionais requeridos para o crescimento e atividade enzimática sobre polímeros como celulose foram analisados por NGS no "organismo modelo" *Neurospora crassa*, os fatores *crl1* e *crl2* foram identificados como responsáveis da indução dos genes das principais celulases e hemicelulases neste fungo (Coradetti et al., 2012; Znameroski et al., 2012). Da mesma forma no fungo anaeróbico ruminal *Neocallimastix patriciarum*, um organismo "não modelo", as estratégias NGS

permitiram a identificação de genes envolvidos na degradação de diferentes materiais lignocelulósicos (Wang et al., 2011). Outro exemplo da resposta transcritômica analisada por NGS é o fungo *Phanerochaete carnosae* cultivado em diferentes substratos de madeira, revelando maior abundância de transcritos que codificam enzimas com atividade para degradação de lignina do que enzimas com atividade para a degradação de carboidratos (MacDonald et al., 2011).

Técnicas de sequenciamento massal de alta qualidade como Illumina RNA-seq, são tecnologias de ponta e custo-eficiência para análises de genoma e transcrito. Estudos utilizando *RNA-seq paired-end* analisou o transcrito de *A. oryzae* sob quatro condições de cultura diferentes, culturas sólidas e líquidas com ou sem estresse do retículo endoplasmático. Com o genoma de *A. oryzae* disponível, foi possível identificar transcritos singulares, novos exons, regiões não transcritas, códons de iniciação alternativos e open reading frames. Foram capazes de acessar isoformas alternativas de RNA mensageiro e um grande número de genes formando splicing alternativo. Também foram identificados diversos genes e vias diferencialmente produzidos em culturas sólidas e líquidas (Wang et al., 2010). O resultados também mostraram níveis altos de produtividade de proteína em cultura sólida do que em cultura líquida. Análise de Gene Ontology (GO) revelaram regulação diferencial de genes nos diferentes estados de cultura. Os autores sugerem que *A. oryzae* altera drasticamente a maneira de expressão de genes em resposta à diferentes condições do estado da cultura, e que essa capacidade de tradução/modificação da proteína e produção de energia foi muito mais expressiva em *A. oryzae* cultivado em cultura sólida comparada à cultura líquida (Wang et al., 2010).

1.4 Prospecção de fungos lignocelulolíticos

A maioria das estratégias de conversão da biomassa lignocelulósica em etanol, envolve a depolimerização de polissacarídeos por catálise enzimática. Estratégia essa, que representa um gargalo no processo de conversão da biomassa devido à recalcitrância da parede celular da planta. Uma forma de otimizar esse processo é a bioprospecção de fungos filamentosos lignocelulósicos, por produzirem grande número e variedade de enzimas que possuem atividades catalíticas diferentes e complementares. Entretanto, as enzimas usadas na hidrólise da biomassa, possuem um alto custo de produção por serem produzidas por sistemas vivos e serem termodinamicamente instáveis. E devido a recalcitrância química e física da lignocelulose, grandes quantidades de enzimas são necessárias para obter razoáveis taxas de degradação. O custo final das enzimas lignocelulósicas ainda é um dos fatores que desfavorecem a indústria do etanol lignocelulósico. Embora a produção dessas enzimas ainda possua um custo de produção elevado, estudos visando a diminuição desses custos por meio da bioprospecção de fungos lignocelulósicos estão sendo realizados (Lundell et al., 2010).

Enzimas que depolimerizam a biomassa vegetal são produzidas, em sua maioria, por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Humicola*, entre outros. Busca por novos organismos, principalmente fungos, que secretam enzimas mais eficientes das enzimas já conhecidas e enzimas que atuam sinergicamente com as enzimas comerciais existentes são abordagens para a otimização do processo de hidrólise da biomassa. Melhoria das cepas por metagêneses convencional e molecular, melhoramento das enzimas por engenharia de proteína e evolução direcionada, e melhoria na eficiência de produção de enzimas em escala industrial também visam um sistema de hidrólise da biomassa ótimo (Merino & Cherry, 2007; Banerjee & Scott-Craig, 2010). A partir da bioprospecção de fungos lignocelulolíticos, podem ser isolados micro-organismos que secretem enzimas mais eficientes, otimizando a hidrólise da biomassa.

Estudos de levantamento em larga escala de 156 fungos patogênicos e não patogênicos de plantas, revelaram que as espécies patogênicas apresentaram atividade moderada a alta de seus perfis com atividade hidrolítica. O estudo também revelou que quando testados na biomassa e hemicelulose derivadas de suas plantas hospedeiras, a hidrólise foi mais intensa. Esses resultados mostram que muitos dos fungos patogênicos de plantas são potenciais produtores de enzimas lignocelulolíticas, e são uma fonte promissora de novas enzimas acessórias para complementar o sistema de hidrólise da biomassa de *T. reesei*, um grande produtor industrial de celulases (King et al., 2011).

Também em estudo de metatranscritômica de solo húmico, foram revelados um grupo dominante de 99% de eucariotos, onde 99% eram do Filo Ascomycota. Baseado na informação de BLAST e busca por motif, foram identificadas 22 famílias de glicosil hidrolases. A família GH18 foi a mais abundante com 14 % do número total de sequências codantes de enzimas GH. Outras famílias GH também apresentaram resultados significativos como a família GH43 com 10% e as famílias GH1, GH5, GH16 e GH75 com 7% do número total de sequências que codificam enzimas da família GH. Quase todos os genes que codificam hemicelulases como, xilanase e xilosidade, foram classificados na família GH43. Resultados sugerem que a comunidade eucariótica do solo húmico possui um grande potencial para hidrólise de componentes da parede celular das plantas (Takasaki et al., 2013).

A partir de dados de genômica disponíveis foram analisadas 20 espécies de fungos filamentosos com intuito de investigar o potencial de hidrólise da biomassa de cada espécie. A comparação genômica mostrou que espécies do gênero *Aspergilli* e *Fusaria* possuem grandes números de genes que codificam glicosil hidrolases. O perfil de atividade do secretoma à sacarificação da palha de trigo, revelaram que as espécies *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* e *A. nidulans*, foram capazes de aumentar a taxa de glucose liberada na hidrólise, quando comparados com o secretoma do *T. reesei* CL847. Dados sugerem que a maioria dos fungos analisados suplementam, o conjunto de enzimas produzidas pelo *T. reesei* CL847 usadas pela indústria (Couturier et al., 2012).

2 JUSTIFICATIVA

A utilização da biomassa vegetal em processos biotecnológicos alternativos para a produção de etanol de segunda geração, é de grande importância na implementação de tecnologias sustentáveis que contribuem na redução da poluição ambiental, além de diminuir o uso das culturas alimentares na produção de combustíveis.

O desenvolvimento de biotecnologias para a conversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol estão sendo realizados principalmente devido a grande disponibilidade e o baixo custo de resíduos lignocelulósicos agroindustriais. O programa de bioetanol brasileiro é um exemplo de produção de cana de açúcar eficiente e alta tecnologia para a produção de bioetanol (Soccol et al., 2010). Entretanto, em ordem de produção em larga escala, um aumento no desenvolvimento de tecnologias será necessário. Um obstáculo central que impede a utilização generalizada da biomassa celulósica são tecnologias de processamento, principalmente na conversão da biomassa em açúcares com redução dos custos.

Atualmente a utilização de enzimas celulolíticas e hemicelulíticas são um grande atrativo, visto que estas são específicas e eficientes ao substrato no processo de bioconversão, uma vez que a hidrólise dos biopolímeros é resultante do somatório de ações de diferentes enzimas que agem sinergicamente. Essas são características importantes para a redução de custos do processo. O uso dessas enzimas, também, em conjunto, podem diminuir os passos do processo, assim como, diminuir o impacto ambiental com a diminuição de resíduos.

O etanol tem um grande potencial como substituição da gasolina no mercado de combustíveis. A produção mundial de bioetanol em 2006 foi de 39 bilhões de litros e espera-se que atinja 200 bilhões de litros em 2015. Entretanto o custo para a produção do bioetanol ainda é elevado se comparado ao de combustíveis fósseis. Uma vez que o fungo filamentososo *A. oryzae* possui um grande potencial para a produção de enzimas lignocelulósicas, estudos biotecnológicos relacionados à bioprospecção dessas enzimas são de grande contribuição para a produção do bioetanol de segunda geração.

Este projeto visa a contribuição em programas de melhoramento genético para um melhor conhecimento e entendimento a respeito de genes expressos por *A. oryzae* envolvidos no processo de hidrólise e desconstrução de biopolímeros como, a celulose e hemicelulose, encontrados em resíduos agroindustriais como o bagaço de cana de açúcar em estado sólido e líquido. Adicionalmente a expressão de genes de interesse identificados por meio de análise *in silico*, será validada com ajuda da técnica de transcrição reversa do RNA por PCR quantitativo (qRT-PCR). Os resultados, além de contribuir na otimização e aplicação de técnicas de engenharia genética nos bioprocessos de conversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol, contribuirá para a prospecção e crescimento do potencial biotecnológico da produção de enzimas industriais que hidrolizam o bagaço por isolados de *Aspergillus*. Benefícios ao meio ambiente pelo aproveitamento e diminuição de resíduos agroindustriais poderão ser adquiridos.

3 HIPÓTESE A SER TESTADA

- A análise global do transcrito de *A. oryzae* BLU37 durante diferentes estágios do crescimento na presença do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ou glicose como fonte de carbono, possibilita a identificação de genes envolvidos nos diferentes processos de cultivo.
- A análise funcional do transcrito de *A. oryzae* BLU37 durante diferentes estágios do crescimento na presença do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ou glicose como fonte de carbono, possibilita a identificação de genes envolvidos na síntese de enzimas CAZy capazes de degradar a biomassa vegetal.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O presente projeto tem como objetivo geral a análise da expressão diferencial de genes do fungo *A. oryzae* associados à utilização do bagaço da cana de açúcar como única fonte de carbono em sistemas de cultivo líquido e semi-sólido.

4.1.2 Objetivos Específicos

1. Analisar o transcrito diferencialmente expresso de *A. oryzae* associado ao resíduo agroindustrial, bagaço de cana-de-açúcar, utilizado como única fonte de carbono na fase exponencial de atividade enzimática em sistemas de cultivo líquido e semi-sólido;
2. Selecionar as sequências gênicas diferencialmente expressas na fase exponencial de atividade enzimática de *A. oryzae*, envolvidas na regulação e expressão de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas mediante análise bioinformática *in silico*;

5 MATERIAL E MÉTODOS

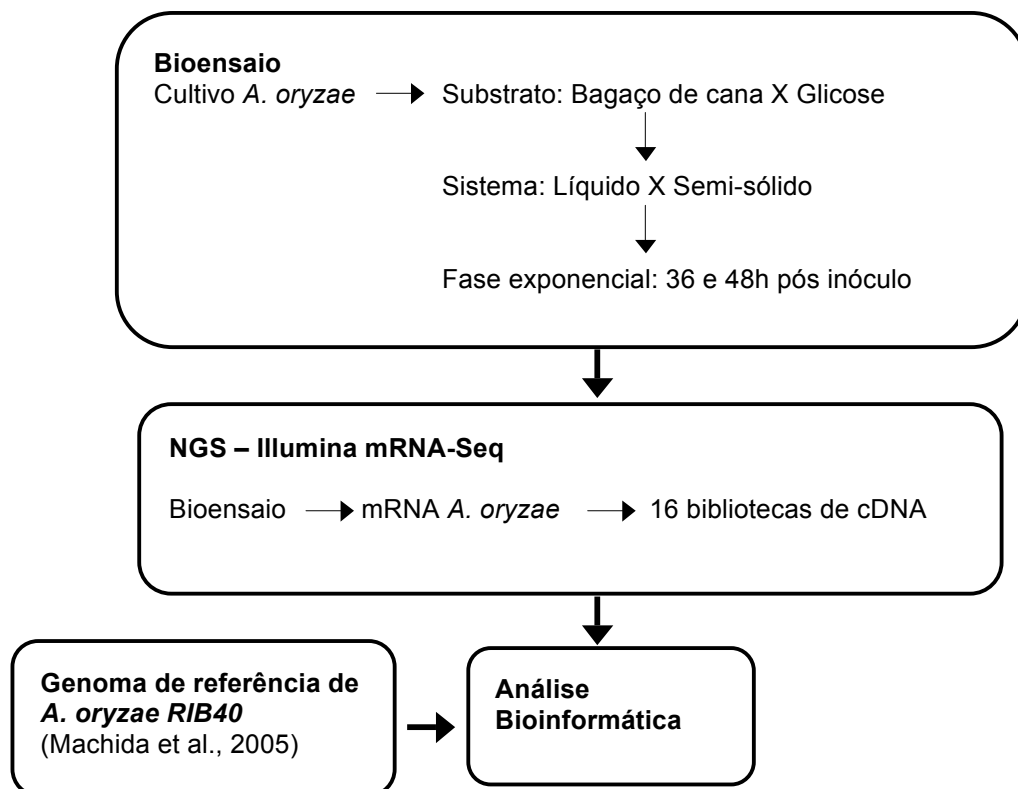


Figura 24: Diagrama do bioensaio da análise do transcrito de *A. oryzae* BLU37 cultivado em culturas líquidas e semi-sólidas, usando bagaço de cana de açúcar e glicose como única fonte de carbono, em cultivos de 36 e 48 horas.

5.1 Condições de cultura e identificação molecular do fungo *A. oryzae*

A estirpe do fungo *A. oryzae* BLU37, proveniente da micoteca do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília, foi isolado no polo têxtil da região do Vale do Itajaí (SC) a partir de resíduos de algodão da indústria de rebeneficiamento de algodão (Siqueira et al., 2009; Siqueira, 2010). Siqueira et al. (2009) identificaram a estirpe, de acordo com as características morfológicas para o Gênero (Pitt & Hocking, 1997; Klich, 2002). A preservação do isolado foi realizada em discos de Ágar Batata Dextrose (BDA) embebidos em glicerol 50% (w/v) a -80°C . Posteriormente, para a obtenção da cepa de trabalho, um dos discos foi transferido para placas de BDA e após esporulação mantida a 4°C .

Para a confirmação da posição taxonômica do fungo por meio de análise molecular, um disco de micélio com 0,7 cm de diâmetro, foi crescido em meio de cultura líquida Czapek com extrato de levedura (CYA) (Pitt & Hocking, 1985) por três dias, 28°C , a 120 rpm. A recuperação do micélio foi feita por meio de filtragem com auxílio de uma bomba de vácuo, com lavagem com água destilada e esterilizada, para remoção de todo resíduo do meio de cultura. A maceração manual foi conduzida com auxílio de nitrogênio líquido. O DNA

genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (Raeder & Broda, 1985), contendo no tampão de extração Tris HCl 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM e SDS 0,5% pH 7,0. A quantificação do DNA total foi realizada visualmente por comparação com o marcador padrão *Low DNA Mass Ladder*® (*Invitrogen*) por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, 5V cm⁻¹, brometo de etídio na concentração de 1 µg mL⁻¹ e U.V. a 254 nm.

A amplificação das regiões espaçadoras intergênicas do DNA ribossomal (rDNA) nuclear (ITS 1 e 2) foi conduzida utilizando *primers* universais ITS5 e ITS4 em uma reação contendo Tampão da *Taq platinum*® (*Invitrogen*) 1X, MgCl₂ 4 mmol, dNTPs 1 mmol⁻¹, *primer forward* ITS5 e *reverse* ITS4 2,5 mmol⁻¹, *Taq polimerase platinum*® (*Invitrogen*) 1U e DNA total 20 ng. O programa de termociclagem utilizado foi de desnaturação inicial à 94°C por 4 minutos, desnaturação do DNA à 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento do *primer* de 50°C por 1 minuto, extensão de 72°C por 1 minuto, extensão final de 72°C por 5 minutos e conservação da reação à 10°C. Os três passos de desnaturação do DNA, anelamento e extensão foram repetidas 30 vezes.

O sequenciamento da região rDNA ITS foi realizado em sequenciador ABI 3130xl da Applied Biosystems nos sentidos *forward* e *reverse*, onde a reação de sequenciamento foi conduzida com 15ng do produto da PCR, 3,2 pmol do *primer forward* (ITS5) e 3,2 pmol do *primer reverse* (ITS4), e 3 µl do kit BigDye V3.1 da Applied Biosystems. A análise bioinformática das sequências foi realizada utilizando o programa *Sequencher* v4.8 (*Gene Codes Corporation*) para o alinhamento, edição e formação de contigs, e análise BLASTn das sequências contra o banco de dados GenBank no NCBI.

5.2 Avaliação da produção enzimática de *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana de açúcar e glicose

A determinação da atividade de enzimas xilanases, CMCases e pectinases secretadas por *A. oryzae* BLU37 associado ao bagaço de cana de açúcar e glicose como única fonte de carbono foi realizada mediante a um bioensaio de 240 horas sob pH 7,0.

O pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar utilizado, foi realizado pela adição de ½ do volume de água ao bagaço de cana de açúcar e autoclavado por 2 horas à 120 psi. O resíduo foi lavado, secado à 60°C por 48 horas e moído. O ensaio foi conduzido com o crescimento do *A. oryzae* BLU37 em meio líquido básico (em 1L 7g de KH₂PO₄, 2g de K₂HPO₄, 0,4g de MgSO₄, 1,6g de (NH₄)₂SO₄), 1% (p/v) de bagaço de cana de açúcar pré-tratado e 1% (p/v) de glicose em pH 7,0. Foram inoculados a uma concentração final de 1,0 × 10¹⁰ esporos e mantidos a 28°C, a 120 rpm. O secretoma foi avaliado durante 240 horas em intervalos de 24 horas.

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados por meio do método DNS (*dinitrosalicilic acid reagent*) (Miller, 1959), utilizando carboxi-metil celulose (CMC) 1%, xilana 1%, pectina 1% e papel filtro Whatman® n° 1 na dimensão de 1cm x 0,6 cm. Para cada substrato e tempo de cultivo avaliado, os ensaios foram realizados em triplicata. Cada ensaio conteve

20 µl do substrato (CMC, xilana e pectina) e 10 µl do secretoma. As amostras foram incubadas à 50°C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 60 µl de DNS em todas as reações e incubadas à 100°C por 10 minutos para reação do DNS com a glicose liberada na reação enzimática. Aos ensaios de quantificação de celulases totais (FPases) foram adicionados 15 µl do secretoma ao papel filtro Whatman® n° 1, e incubados à 50°C por 1 hora (Vale et al., 2012). Foram transferidos 45 µl de cada reação em uma placa de ELISA e adicionados 155 µl de água destilada em todas as reações. A quantificação dos açúcares redutores foi realizada colorimetricamente pela leitura em espectrofotômetro (*Spectra Max*) à absorvância de 540 nm, e calibrados usando curvas padrão de glicose, xilose e ácido galacturônico. A absorvância de cada ensaio foi calculada em unidade internacional (UI), que é expressa como µmol de açúcar redutor formado por minuto em mL da solução de enzima, onde 1 UI é a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol do açúcar redutor min⁻¹ L⁻¹.

5.3 Avaliação de protocolos para a extração do RNA total de *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana de açúcar pré-tratado

Um total de aproximadamente entre 0,03 - 0,07 g de massa micelial de *A. oryzae*, coletada entre 72h a 120h, foi lavado com água MilliQ autoclavada (Millipore), filtrada e armazenadas em freezer a -80°C. O RNA total foi extraído utilizando os *kits Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen)*, *Trizol RNA Extraction (Invitrogen)*, e *Invisorb (Invitek)*, de acordo com as instruções dos fabricantes. Um protocolo de extração de RNA total utilizando o reagente fenol ácido quente (modificado de Ribeiro et al., 2007) também foi avaliado. Para tanto, a amostra foi inicialmente macerada em graal com o auxílio de N₂ líquido até obter-se um pó fino, e transferidas para um tubo para centrifuga de fundo cônico de 50mL. Em seguida foram adicionados à amostra 4 mL do tampão de extração (0,2M de acetato de sódio, 10mM de EDTA, 1% de SDS e 2% sarcosil) e 4 mL de fenol ácido à 65°C. A amostra foi agitada brevemente e incubada por 3 minutos a 65°C. Após a incubação, foi agitada por 3 minutos e centrifugada à 4°C, 10.000rpm por 20 minutos. O sobrenadante formado foi cuidadosamente transferido para um novo tubo e adicionado 4,5 mL de isopropanol. O sobrenadante foi incubado em gelo por 10 minutos e centrifugado à 4°C, 12.000 rpm por 10 minutos para a formação do pellet. O novo sobrenadante foi descartado cuidadosamente, evitando a perda do pellet. O novo pellet foi lavado com 5 mL de etanol 70% e centrifugado 4°C, 12.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante formado foi novamente descartado cuidadosamente e o pellet ressuspendido em 200 µl TE pH 7,5. A amostra foi congelada a -20°C por no mínimo 1 hora e centrifugada a 14.000rpm por 2 minutos. O sobrenadante contendo porções de DNA/RNA total/siRNA foi transferido para um novo tubo. À 180 µl do sobrenadante foram adicionados 20 µl de 0,2M de EDTA pH 8, 235 µl de 10% PEG (10% PEG 8000 e 1M de NaCl), incubado no gelo por 30 minutos e centrifugada a 14.000rpm por

10 minutos. O sobrenadante contém siRNA e o pellet contém uma mistura de DNA/RNA. O pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70% e ressuspenso em 30 µL de água MilliQ autoclavada. Para a precipitação do siRNA, ao sobrenadante, foram adicionados 1,2 mL de etanol absoluto, incubado overnight (12 horas) a -20°C e centrifugado à 4°C, 14.000rpm por 20 minutos. O pellet seco foi ressuspenso em 30µL de TE (10mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA) pH 7,5.

Em todas as metodologias avaliadas, a massa micelial foi macerada manualmente com nitrogênio líquido. O DNA foi removido utilizando DNase-free (Ambion), e o RNA total precipitado em etanol 70 % (v/v). A análise de pureza e quantificação de RNA total, medido por meio de análise da integridade das porções 28S e 18S do RNA ribossomal, foi avaliada em gel de agarose 1,2 % (m/v) na presença de brometo de etídio (1µg/mL) e marcador molecular padrão *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

Um protocolo não comercial de fenol para o isolamento do RNA total de *A. oryzae* BLU37 (Brasileiro & Carneiro, 1998) foi escolhido como metodologia mais apropriada para os passos subsequentes de preparação de bibliotecas de cDNA para as análises transcritômicas (Illumina mRNAseq e RT-qPCR). Todas as soluções e materiais utilizados, foram preparadas sob os cuidados para serem livres de RNases exógenas. As amostras foram inicialmente maceradas em gral com o auxílio de nitrogênio líquido, até obter-se um pó fino e transferidas para um tubo para centrifuga de fundo cônico de 50mL. Em seguida foram adicionados 6mL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1) e 9mL de tampão de extração NTES (0,1M de NaCl; 10mM de Tris-HCl pH 7,5; 1mM de EDTA; 1% de SDS). À temperatura ambiente, as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 minutos e centrifugadas à 4°C, 10.000G por 10 minutos. A fase aquosa superior foi coletada e transferida para um novo tubo previamente resfriado. A partir deste passo, as amostras foram mantidas sempre em gelo. À fase aquosa superior, foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 3M, pH 4,5 e dois volumes de etanol absoluto previamente resfriado e incubado a -20°C por, no mínimo, 1 hora. As amostras foram centrifugadas à 4°C, 10.000G por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi dissolvido em 2,5 mL de água MilliQ autoclavada previamente resfriada e foram adicionados 2,5 mL de LiCl 4M e incubado por 4°C por, no mínimo, 3 horas. As amostras foram centrifugadas à 4°C, 10.000G por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet*, translúcido e com aparência gelatinosa, foi dissolvido em 1,8 mL de água MilliQ autoclavada previamente resfriada e adicionado 0,2 mL de acetato de sódio 3M, pH 4,5, ajustado com ácido acético glacial, e 4 mL de etanol absoluto previamente resfriado. O RNA total foi precipitado a -20°C por, no mínimo, 1 hora. As amostras foram centrifugadas à 4°C, 10.000G por 20 minutos e o sobrenadante descartado. Para retirar o excesso de sal, o qual foi precipitado junto com o RNA, foram adicionados 5 mL de etanol 70% ao pellet e centrifugados à 4°C, 10.000G por 3 minutos e o sobrenadante descartado cuidadosamente. O pellet de RNA total foi dissolvido em 200µL de água MilliQ autoclavada previamente resfriada.

A quantificação da concentração de RNA total extraído de *A. oryzae* foi medida através da determinação das absorvâncias (Abs) a 260nm, 280nm e 230nm em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop technologies), onde $Abs_{260nm} = 1$ corresponde a 40ug de RNA em 1 mL de solução, quando a razão $Abs_{260nm}/Abs_{280nm} = 1,9$. A razão Abs_{260nm}/Abs_{230nm} é uma outra medida de pureza, com os valores de um ácido nucléico "puro" em geral na faixa de 1,8 - 2,2.

A integridade do RNA total foi também avaliada pela intensidade de bandas referentes aos rRNA 28S e 18S, visualizada por meio de eletroforese utilizando gel de agarose 1% (14 V/cm) na presença de brometo de etídio (1µg/mL) e marcador molecular padrão *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

5.4 A caracterização do transcrito de *A. oryzae*

Uma suspensão de esporos de *A. oryzae* foi usada para inocular os meios de cultura líquido e semi-sólido a uma concentração final de 1×10^8 esporos/mL (figura 24). As culturas líquidas foram crescidas em 100 mL de meio mínimo em frascos de Erlenmeyer de 250 mL (7g de KH_2PO_4 , 7g; K_2HPO_4 , 2.0g; $MgSO_4$, 0.4g; $(NH_4)_2SO_4$, 1.6g; pH 7,0). As culturas foram incubadas em shaker orbital a 150 rpm. As culturas semi-sólidas foram crescidas em placas de petri sob o mesmo meio de crescimento, com a adição de 15g/L de agar. O bagaço de cana pré-tratado foi incluído ao meio mínimo à concentração final de 1% (w/v) em tratamentos que utilizam essa fonte de carbono para a indução de enzimas envolvidas na degradação da lignocelulose. Tratamentos controle utilizaram a glicose (Sigma) como a única fonte de carbono, a uma concentração final de 1% (w/v). Todas as culturas foram incubadas à 28°C durante o período de crescimento. Um período de crescimento de 36 e 48 horas foi empregado para cada fonte de carbono em meios líquido e semi-sólido, totalizando oito tratamentos distintos. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata. O micélio do fungo a partir do meio líquido foi coletado por meio de filtração usando papel filtro Whatman nº1, lavado rapidamente com água MilliQ autoclavada e armazenado à -80°C. O micélio do meio semi-sólido foi manualmente coletado com o auxílio de uma espátula esterilizada e armazenado à -80°C.

As amostras de RNA total de cada cultura líquida e semi-sólida de *A. oryzae* foi extraída de acordo com o método escolhido de Brasileiro & Carneiro (1998). Tabela 8 demonstra um resumo dos tratamentos empregados para a análise do transcrito de *A. oryzae*.

Tabela 8: Resumo do desenho experimental para a análise do transcrito de *A. oryzae* mostrando tratamentos, réplicas e aplicação na flowcell do canal Illumina.

Fonte de carbono	Período de crescimento (horas)	Forma do meio mínimo de crescimento	Réplica biológica	flowcell do canal Illumina
Bagaço de cana	36	Líquido	1	1
Bagaço de cana	36	Líquido	2	1
Bagaço de cana	48	Líquido	1	1
Bagaço de cana	48	Líquido	2	1
Bagaço de cana	36	Semi-sólido	1	1
Bagaço de cana	36	Semi-sólido	2	1
Bagaço de cana	48	Semi-sólido	1	1
Bagaço de cana	48	Semi-sólido	2	1
Glicose	36	Líquido	1	2
Glicose	36	Líquido	2	2
Glicose	48	Líquido	1	2
Glicose	48	Líquido	2	2
Glicose	36	Semi-sólido	1	2
Glicose	36	Semi-sólido	2	2
Glicose	48	Semi-sólido	1	2
Glicose	48	Semi-sólido	2	2

5.4.1 Construção da bibliotecas de cDNA e sequenciamento Illumina RNAseq

O isolamento do RNA mensageiro, o preparo de enriquecimento das bibliotecas de cDNA e Illumina RNAseq (www.Illumina.com) foram conduzidos pela empresa Eurofins MWG Operon (Alabama, USA). As amostras de RNA total foram previamente quantificadas e transportadas em RNAsable (Biomátrica), de acordo com as instruções do fabricante. Após ressuspensão a integridade do RNA foi avaliada por meio do Agilent 2100 Bioanalyzer e RNA LabChip® kits system (Agilent Technologies). As moléculas de RNA contendo poli-A foram purificadas usando Sera-mag Magnetic Oligo(dT) Beads (Illumina) de aproximadamente 10µg de cada amostra de RNA total. O mRNA eluido foi fragmentado usando cátions divalentes à temperatura elevada antes da síntese de cDNA. Esse procedimento foi realizado para reduzir vies inicial durante a síntese de cDNA. O cDNA dupla fita foi sintetizado a partir de fragmentos de mRNA molde por iniciadores aleatórios, usando SuperScript II, RNaseH e DNA Pol I. O cDNA foi purificado usando QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), as extremidades reparadas e fosforilado usando T4 DNA polymerase, Klenow DNA polymerase e T4 PNK, e purificado uma segunda vez. Para permitir a ligação dos adaptadores, uma única cauda de adeninas foi adicionada ao final 3' usando Klenow Exo (Illumina) seguido por um passo de purificação com o MinElute PCR Purification Kit (Qiagen). A ligação dos adaptadores foi realizada de tal forma que as amostras de cDNA foram agrupadas e sequenciadas em um mesmo canal de flowcell de acordo com a fonte de carbono. Essa etapa foi conduzida para garantir a distinção entre as réplicas biológicas, assim como cada biblioteca recebeu adaptadores diferentes quando sequenciados no mesmo canal de flowcell. A seleção por tamanho das amostras (200±25 pb), enriquecidas por PCR, foi conduzida por meio de eletroforese e subsequente excisão em gel de agarose TAE 2%. Os fragmentos foram purificados usando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Um total de 15 ciclos de amplificação de PCR foi conduzido para enriquecimento das bibliotecas de cDNA usando *primers* complementares aos adaptadores

ligados. Produtos de PCR foram então purificados usando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), quantificados por meio do Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer e sequenciados em dois canais de flowcell dupla usando o sistema Illumina HiSeq2000. O sequenciamento *Paired-end* (2 X 100 bases), nos dois sentidos da fita de cDNA, foi conduzido usando TruSeq RNA Chemistry v3. Dados do sequenciamento Illumina serão depositados no NCBI GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

5.4.2 Análise bioinformática

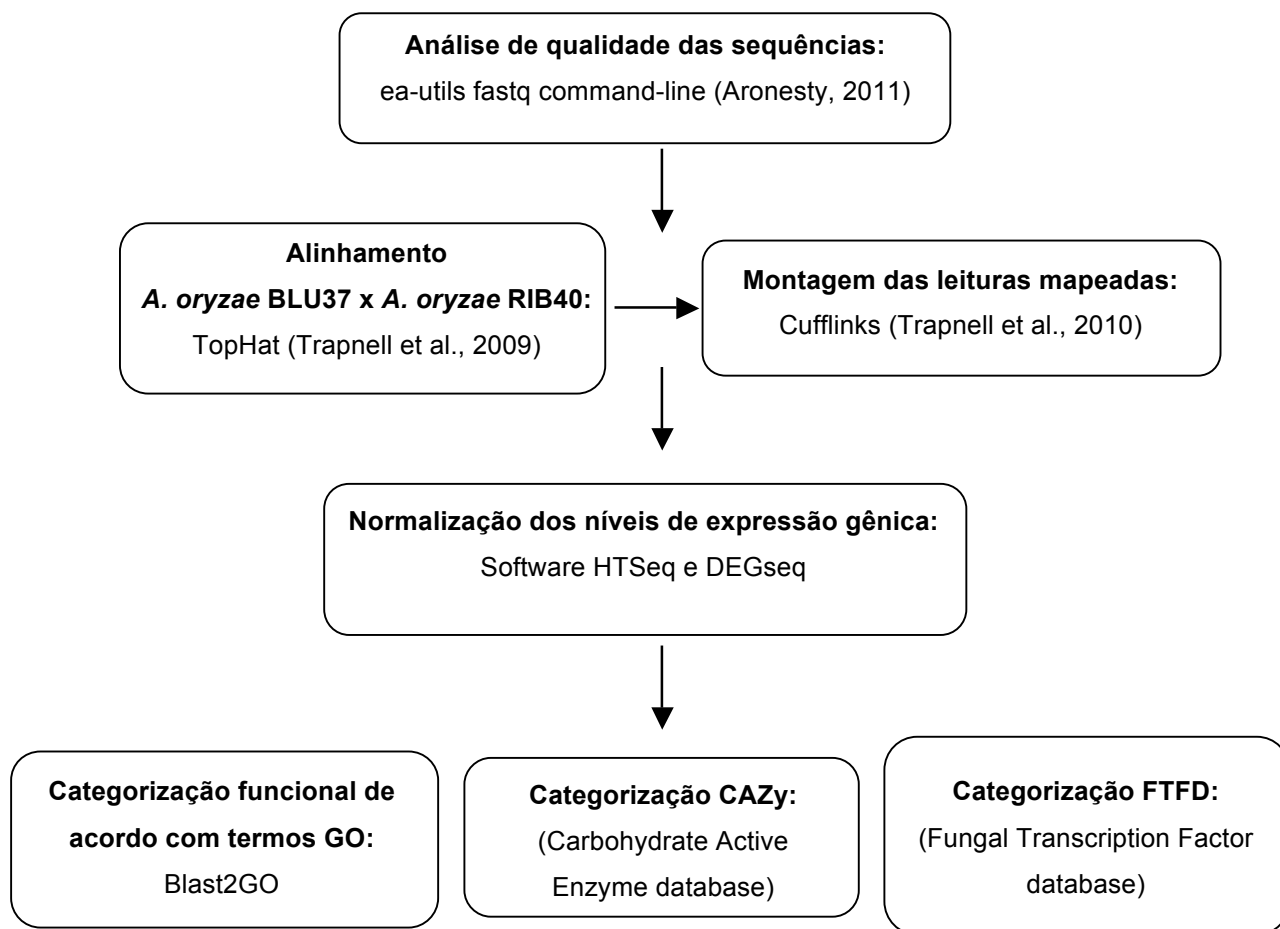


Figura 25: Diagrama da análise bioinformática do transcrito de *A. oryzae* BLU37 cultivado em culturas líquidas e semi-sólidas, usando o bagaço de cana de açúcar e glicose como única fonte de carbono, em cultivos de 36 e 48 horas.

5.4.2.1 Análise de qualidade das sequências

A média do índice de qualidade de cada biblioteca de cDNA foi calculada dos dados de cada leitura, baseado na soma do índice de qualidade Sanger Fastq para cada base dividido pelo total do número de bases de cada sequência lida. O índice de qualidade Sanger Fastq é um valor de atributo numérico entre 0 a 93, o qual corresponde a probabilidade de erro no processo de incorporação de cada base. Representado pela escala PHRED ($Q = -10$

x $\text{Log}_{10}(\text{Pe})$), Q30 corresponde a uma probabilidade de erro de $10\text{E}-3$ (0.1%). Análises dos dados FASTQ para o cálculo da média do índice de qualidade por biblioteca de cDNA foi conduzida usando a ferramenta `ea-utils fastq command-line` para processamento de sequenciamento de dados biológicos (Aronesty, 2011). A qualidade GTE 30 mostra a percentagem de leituras por biblioteca de cDNA com o valor `fastq` igual ou maior que 30.

5.4.2.2 Alinhamento das leituras ao genoma de referência e análises da expressão diferencial *in silico*

Leitura das sequências dos adaptadores e leituras de baixa qualidade foram removidos. As leituras restantes foram mapeadas ao genoma de *A. oryzae* RIB40 (National Research Institute of Brewing Stock Culture ATCC-42149) (Machida et al., 2005), baixado do DOGAN (<http://www.bio.nite.go.jp/dogan/Top>). O alinhamento foi conduzido de acordo com o programa TopHat (Trapnell et al., 2009), com uma intolerância de incompatibilidade de até 3 bases e comprimento da sequência 21. As leituras que não alinharam com o genoma de referência foram tratadas como leitura de uma potencial junção de *splice* de acordo com a sequência do genoma de referência. O tamanho mínimo das leituras paired-end processadas testadas usadas foi definida a 36pb. As leituras mapeadas foram montadas com o programa Cufflinks (Trapnell et al., 2010).

5.4.2.3 Níveis de expressão dos genes normalizados

O número de leituras por modelos de genes foram obtidas usando HTSeq, um *software python* aplicado para o processamento de dados a partir de ensaios de sequenciamento de alto rendimento (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/overview.html#documentation-overview>). Análises de expressão foram empregadas para identificar genes com mudanças significativas no número de cópias através dos tratamentos experimentais testados (*A. oryzae* cultivado em bagaço, cultura líquida, 36h; bagaço, cultura líquida, por 48h; bagaço, cultura semi-sólida, por 36h; bagaço, cultura semi-sólida, por 48h; glicose, cultura líquida, 36h; glicose, cultura líquida, 48h; glicose, cultura semi-sólida, 36h; glicose, cultura semi-sólida, 48h). As análises foram conduzidas com o *software* DEGseq (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DEGseq.html>) onde para cada tratamento foram adotadas expressões com significância estatisticamente diferentes, aceitando como ponto de corte, valores menores que 0,01 para `padj`, e `log2FoldChange` maior que 5 ou menor que -5.

5.4.2.4 Categorização de enzimas com atividade carboidrato

O banco de dados Carbohydrate Active Enzyme database (CAZy - <http://www.cazy.org/>) foi empregado para identificar as glicosil hidrolases (GHs), polissacarídeos liases (PLs), glicosil transferases (GTs) e carboidratos esterases (CEs) expressas por *A. oryzae*, sob todas as condições de crescimento em cada tratamento. Essas quatro classes principais de enzimas são responsáveis pela desconstrução dos polissacarídeos da parede celular da planta. O banco de dados CAZy subdividirá as enzimas de acordo com cada classe em famílias baseada nas sequências e atividade relacionada. A porcentagem do mRNA total representado pelos genes do CAZy foi calculado para cada tratamento.

5.4.2.5 Categorização de fatores de transcrição

Os transcritos mapeados para fatores de transcrição anotados na sequência completa do genoma de *A. oryzae* RIB 40 foram selecionados e categorizados de acordo com famílias de genes de fatores de transcrição utilizando o banco de dados de fatores de transcrição de fungos (<http://ftfd.snu.ac.kr/index.php?a=view>).

5.4.2.6 Desenho de *primers* constitutivos para validação em qRT-PCR

Uma lista de genes candidatos para normalizar a expressão dos genes de interesse durante as análises dos tratamentos foram escolhidos baseado em evidencia da literatura (Bohle et al., 2007; López-Errasquín et al., 2007; Suanthie et al., 2009). Foram desenhados *primers* para reações de PCR de transcriptase reversa (RT-PCR) e PCR em tempo real (qRT-PCR) a partir de genes potencialmente constitutivos como a actina, β -tubulina e rRNA 18S. As sequências gênicas utilizadas foram do banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com os seguintes números de acesso: *A. oryzae* gene Actina: NW_001884660.1; *A. oryzae* gene β -tubulina: AP007169.1; *A. oryzae* gene rDNA 18S: AP007172.1. Com a utilização do programa ORF Finder (NCBI), foram selecionadas as maiores sequências de ORFs para o desenho dos primers. Os pares de *primers*, que potencialmente servem ambos para RT-PCR e RT-qPCR, foram desenhados utilizando o programa *Primer 3 Plus*, (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (tabela 9).

Tabela 9: Sequencia de primers forward e reverse, temperatura de anelamento e tamanho esperado do produto de PCR em bares de bases.

Primers	Forward	Temperatura de anelamento (Tm)	Reverse	Temperatura de anelamento (Tm)	Tamanho do produto (pb)
Actin	ACGAGAACGAGTTGAAAACG	58.0 °C	ATAATTTGGCCGCTGTATC	58.9 °C	100
Beta-tubulin	TGTTCTTGGGGTCGAACATC	60.9 °C	TTCTTCATGGTTGGCTTCG	59.8 °C	103
rRNA_18s	AACGGGTAACGGGGAATTAG	60.1 °C	TGTCGGGATTGGGTAATTTG	60.6 °C	103

6 RESULTADOS

6.1 Confirmação da posição taxonômica do *A. oryzae* BLU37

Análise BLASTn foi conduzida usando uma sequência de alta qualidade da região nuclear rDNA ITS1-5,8S-ITS2, amplificada utilizando pares de *primer* universal ITS5 e ITS4 (White et al., 1990). Uma região consenso dessa região, baseada no sequenciamento *forward* e *reverse*, totalizando 573pb foi utilizada para a identificação molecular (anexo 2). Resultados revelaram homologia com espécies membro do grupo *Aspergillus* seção *Flavi*, nomeadas de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus pseudotamarii*, *Aspergillus caelatus*, *Aspergillus bombycis*, *A. parasiticus* e *A. sojae*. Análise *RefSeqGene Blast* da mesma sequência consenso contra sequência da região rDNA ITS da amostra *A. oryzae* RIB40 mostrou 98% de identidade, com a presença de 5 gaps, o qual aparenta ser resultado de dados de sequenciamento de uma região de baixa qualidade da nossa amostra. O alinhamento da sequência da região rDNA ITS de *A. oryzae* BLU37 contra o genoma de *A. oryzae* RIB40 é mostrada na figura 26. *RefSeqGene Blast* usando o banco de dados de sequencias de referência genômica contra sequência da região rDNA ITS de *A. oryzae* BLU37, mostrou maior identidade com *A. oryzae* RIB40 em relação aos outros organismos.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Aspergillus oryzae RIB40 contig SC206	972	972	100%	0.0	98%	NW_001884680.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus oryzae RIB40 contig rDNA_te13	972	972	100%	0.0	98%	NW_001849579.1

Aspergillus oryzae RIB40 contig SC206

Sequence ID: [ref|NW_001884680.1](#) Length: 343979 Number of Matches: 1

Range 1: 338528 to 339091 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
972 bits(526)	0.0	555/568(98%)	5/568(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACCTGCCGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTG			60
Sbjct 338528	ACCTGCCGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTG			338587
Query 61	TTTACTGTAACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAA-GGCCCGCGGGGGCATCAG			119
Sbjct 338588	TTTACTGT-ACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCCGCGGGGGCTCTCAG			338646
Query 120	CCCCCGGGCCCGCCCGCCGGAGACACCACGAACCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAG			179
Sbjct 338647	-CCCCGGGGCCCGCCCGCCGGAGACACCACGAACCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAG			338705
Query 180	TTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGAT			239
Sbjct 338706	TTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGAT			338765
Query 240	GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGAGT			299
Sbjct 338766	GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGAGT			338825
Query 300	CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG			359
Sbjct 338826	CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG			338885
Query 360	CTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCGCCCTTTCgggggggACGGGCC			419
Sbjct 338886	CTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCGCCCTTTCGGGGGGACGGGCC			338945
Query 420	CCAAAGGCAGCGGGCCACCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTC			479
Sbjct 338946	CCAAAGGCAGCGGGCCACCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTC			339005
Query 480	TGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAAACAACCATTTTCCAGGTTGACCTCGG			539
Sbjct 339006	TGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAAACAACCATTTTCCAGGTTGACCTCGG			339063
Query 540	ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA 567			
Sbjct 339064	ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA 339091			

Figura 26: Análise RefSeqGene Nucleotide Blast derivado de dados de alinhamento da sequência da região nuclear rDNA ITS1-5,8S-ITS2 de *A. oryzae* BLU36 (Query) contra a amostra de *A. oryzae* RIB40, mostrando a posição de 5 gaps e 98% de identidade entre as amostras.

6.2 Avaliação da produtividade enzimática de *A. oryzae* BLU37 cultivado em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e glicose

A quantificação da atividade enzimática dos secretomas de *A. oryzae* BLU37 cultivado em meio líquido com bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado como única fonte de carbono mostraram que a cinética de produção de xilanases apresentou um aumento superior durante as primeiras 24 horas (0,62 UI. mL⁻¹), mantendo-se constante após 48 horas do período de incubação (0,71 UI. mL⁻¹) em comparação com as cinéticas de produção de FPases (0,2 UI. mL⁻¹), CMCases (0,13 UI. mL⁻¹) e pectinases (0,06 UI. mL⁻¹). As cinéticas de produção de CMCases e pectinases mostraram-se constantes e pouco expressivas durante todo o período de incubação (figura 27). Além da cinética de produção da xilanase apresentar melhor resultado, também houve a formação de duas fases exponenciais e estacionárias de atividade enzimática, sugerindo a atividade de duas isoformas de xilanases durante o cultivo. A partir da cinética de produção da xilanase, foram estabelecidas 36h e 48h para a análise do transcrito dos tratamentos com bagaço de cana e glicose.

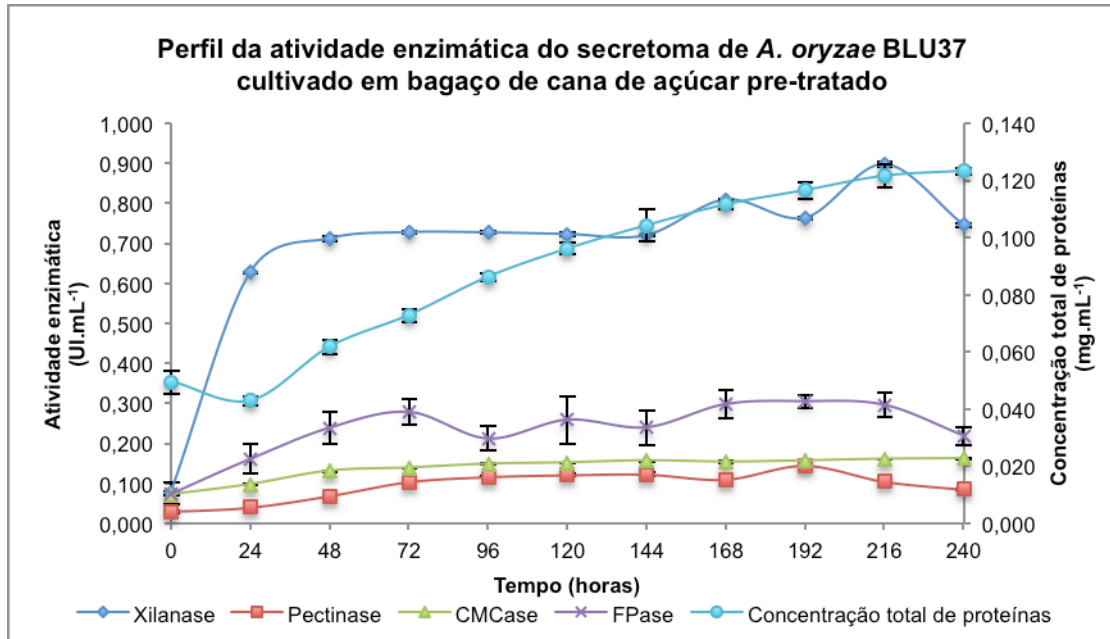


Figura 27: Perfil da atividade enzimática do secretoma de *A. oryzae* BLU37 cultivado em meio líquido com bagaço de cana de açúcar pré-tratado como única fonte de carbono. Quantificação da atividade de xilanase (losângulo azul), pectinase (quadrado vermelho), CMCCase (triângulo verde), FPase (cruz roxo) e concentração de proteínas totais (círculo azul claro) foram medidas em triplicatas a partir de secretomas de 240 h com intervalos de 24 h.

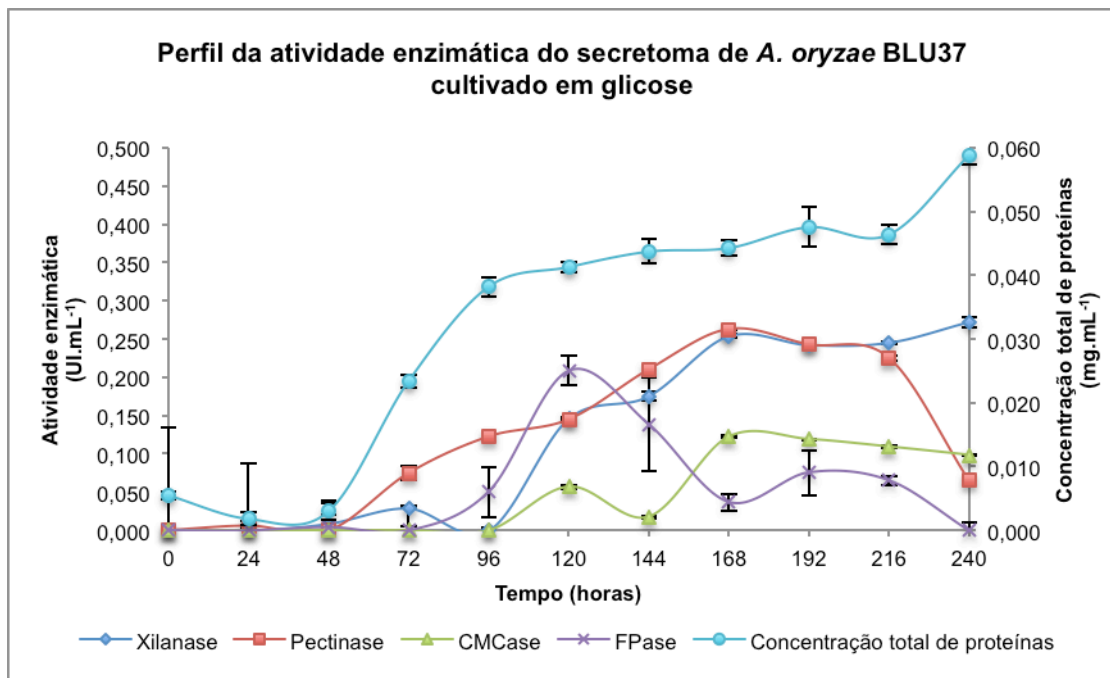


Figura 28: Perfil da atividade enzimática do secretoma de *A. oryzae* BLU37 cultivado em meio líquido com glicose como única fonte de carbono. Quantificação da atividade de xilanase (losângulo azul), pectinase (quadrado vermelho), CMCCase (triângulo verde), FPase (cruz roxo) e concentração de proteínas totais (círculo azul claro) foram medidas em triplicatas a partir de secretomas de 240 h com intervalos de 24 h.

Um segundo perfil de atividade enzimática do secretoma de *A. oryzae* BLU37 foi realizado a partir de um cultivo usando a glicose como única fonte de carbono. A cinética de produção de xilanase, CMCCase, pectinase e FPase durante as primeiras 48h após o inóculo

foi aproximadamente $0,00 \text{ UI. mL}^{-1}$ para todas as enzimas. Após 72h a cinética de produção das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas quantificadas no tratamento com glicose, começam a aumentar (figura 28). Entretanto, a cinética de produção dessas enzimas secretadas no tratamento contendo somente glicose, em comparação com a cinética de produção das enzimas secretadas no tratamento contendo somente o bagaço, é muito menos expressiva com valores de xilanase de $0,2 \text{ UI. mL}^{-1}$ no tratamento com glicose e $0,7 \text{ UI. mL}^{-1}$ no tratamento com bagaço, em 240h de cultivo. Resultados dos perfis de atividade dos secretomas de *A. oryzae* BLU37 sob os tratamentos com bagaço de cana e com glicose, mostram que em 36h e 48h de cultivo, a cinética de produção da xilanase é expressiva para a análise diferencial de celulasas e hemicelulasas.

6.3 A caracterização do transcrito de *A. oryzae*

6.3.1 Extração e quantificação do RNA total de *A. oryzae*

A integridade do RNA total de *A. oryzae* extraído usando os kits comerciais e métodos de extração que envolvem o fenol ácido foi examinada. Alíquotas do RNA total foram sujeitas a eletroforese em géis de agarose e corados com brometo de etídeo. O RNA total intacto deve mostrar claras bandas do RNA ribossômico (rRNA) 28S e 18S em organismos eucarióticos. A intensidade da banda 28S deve ser aproximadamente duas vezes da banda 18S, o que é uma indicação da integridade do RNA na proporção de 2:1. O RNA degradado aparece com um rastro e mancha próximo ao final do marcador molecular, com a falta de bandas bem desenhadas e a perda da proporção de 2:1. Contaminação com o DNA genômico também aparecem como uma pequena banda de alto peso molecular.

Os ácidos nucleicos foram quantificados por meio da absorbância por U.V. usando espectrofotometria, medindo a 260 e 280nm. Baseado na lei de *Beer-Lambert*, uma mudança linear na absorbância ocorre com a concentração do ácido nucleico. RNA possui um máximo de absorbância a 260nm, com um a leitura de A260 de 1,0 equivalente a $40 \mu\text{g/mL}$. Taxas de absorbância a 260 e 280nm são usadas para análise de qualidade do RNA, com taxas de A260/A280 entre 1,8-2,1 indicando RNA puro. Picos de absorbância a A280 podem ser indicativos de contaminantes de proteínas. Três contaminantes de RNA que produzem picos na faixa de absorbância de 220-230nm, são as proteínas, sais caotrópicos como a guanidina isotiocianato, e o fenol. Taxas para A260/A230 próximas a 2,0 são indicativos de um RNA puro.

A avaliação do RNA extraído utilizando Concert® RNA Plant Reagent (Invitrogen) e TRIzol® Plus RNA Purification System (Ambion, USA), revelaram integridade do rRNA 28S e 18S, porém ambos obtiveram baixo rendimento de RNA extraído. Figura 29 A mostra amostras de RNA total de *A. oryzae* BLU37 extraído com cada protocolo. Um teste com o kit TRIzol® Plus RNA Purification System (Ambion, USA), com maceração do micelio usando beads de metal em Fastprep-24TM (MP Biomedicals, USA) foi realizado com 2 tempos de 20

seg, por 6m/s. Nota-se que ocorreu a degradação da porção do rRNA 28S, onde a proporção entre o rRNA 28S e 18S é o dobro, respectivamente (figura 29B). O kit INVISORB Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex) também foi avaliado com maceração de micélio baseado no uso de beads de metal e agitação mecânica no Fastprep-24™ (MP Biomedicals, USA). Apesar de extrair um RNA total com pureza, foram retidas grandes quantidades do RNA total nas colunas de afinidade utilizadas no kit, inviabilizando a utilização subsequente em Illumina RNAseq (figura 29C). Um método não comercial, baseado em maceração de micélio em N₂ líquido e extração de RNA com fenol quente (modificado de Ribeiro et al., 2007), apresentou integridade e bom rendimento de RNA total extraído de *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana (figura 29D). As porções de produtos genômicos (DNA) e transcritômicos (rRNA, mRNA, tRNA, siRNA) podem ser isoladas a partir dessa metodologia. Um método que utiliza fenol a temperatura ambiente também foi testado (Brasileiro & Carneiro, 1998). Apesar de extrair uma grande concentração de material genômico, o método extraiu o RNA total de *A. oryzae* com integridade da região rRNA 18S e 28S e bom rendimento, uma vez que o volume de material extraído submetido a eletroforese foi de 5 vezes menos do que o volume aplicado quando extraído com kits comerciais e o método modificado de Ribeiro et al, (2007) (figura 29E). Para a caracterização do transcrito de *A. oryzae*, o método de Brasileiro & Carneiro (1998) foi adotado para extração de RNA total das amostras de *A. oryzae* cultivados em bagaço de cana de açúcar e glicose, em culturas líquidas e semi-sólidas. Figura 30 mostra exemplos de RNA total extraído com este método, após crescimento de *A. oryzae* em cultura semi-sólida (fonte de carbono glicose) e cultura líquida (fonte de carbono bagaço de cana de açúcar).

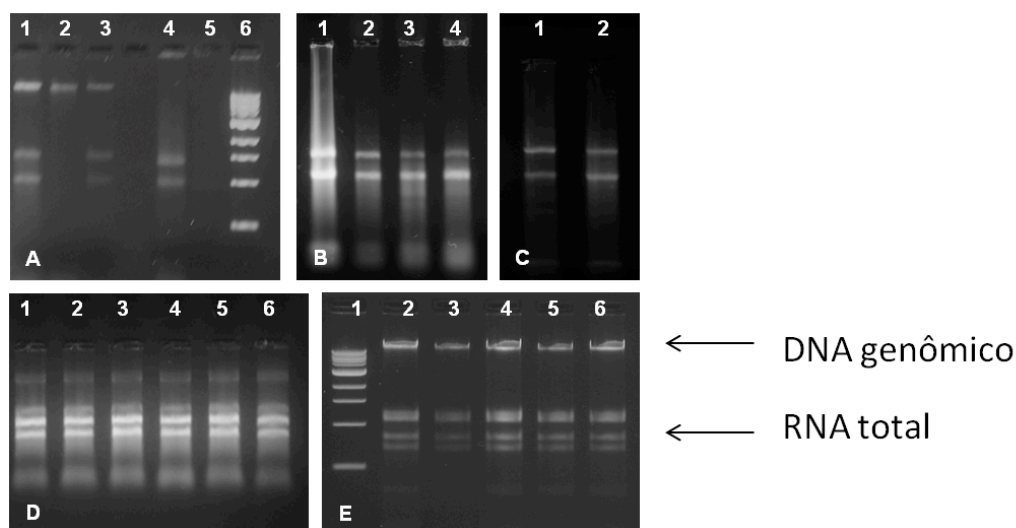


Figura 29: Comparação da integridade das amostras de RNA total extraídos com diferentes protocolos de extração de RNA. A). Canaletas 1 a 3: RNA total extraído com Concert® RNA Plant Reagent (Invitrogen); canaletas 4 e 5: RNA total extraído com TRIzol® Plus RNA Purification System (Ambion, USA); canaleta 6: marcador molecular 1 Kb DNA Ladder (New England BioLabs, USA). B). Canaletas 1 a 4: RNA total extraído com TRIzol® Plus RNA Purification System (Ambion, USA) com beads de metal em Fastprep-24™ (MP Biomedicals, USA). C). Canaletas 1 a 2: RNA total extraído com INVISORB Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex), com maceração de micélio baseado no uso de beads de metal e agitação mecânica no Fastprep-24™ (MP Biomedicals, USA). D). Canaletas 1 a 6: RNA total extraído com o método fenol quente (modificado de Ribeiro et al., 2007). E). Canaleta 1: marcador molecular 1 Kb DNA

Ladder (New England BioLabs, USA); canaletas 2 a 6: RNA total extraído com o método fenol (Brasileiro & Carneiro, 1998).

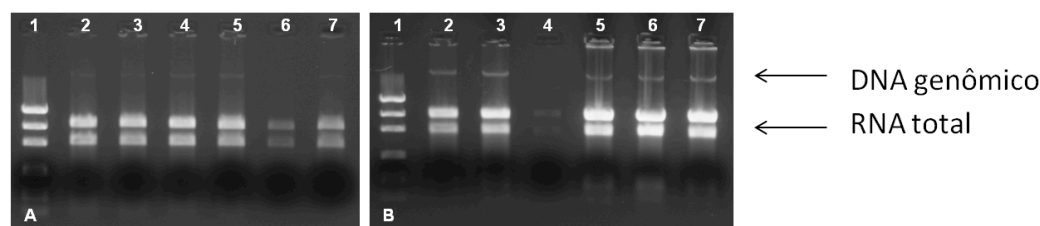


Figura 30: Análise da integridade das amostras de RNA de *A. oryzae* extraído usando o método de Brasileiro & Carneiro (1998). A). Canaleta 1: Marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen); 2-7: RNA total de *A. oryzae* 36 horas pós inóculo, cultivado em MM com glicose, cultura semi-sólida. B). Canaleta 1: Marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen); ; 2-7: RNA total de *A. oryzae* 36 horas pós inóculo, cultivado em MM com bagaço de cana de açúcar, cultura líquida.

Quantificação do RNA total de *A. oryzae* foi, também, avaliada por meio de absorção U.V. usando espectrofotometria, medida a 260 e 280nm pelo NanoDrop ND-1000 spectrophotometry (Thermo Scientific, Waltham, USA). Resultados mostraram que, em relação à integridade da região rRNA 18S e 28S, as mostras possuíam boa qualidade quanto à pureza do RNA. A figura 31 exemplifica a quantificação, por meio do NanoDrop ND-1000 spectrophotometry, do RNA total de *A. oryzae* cultivado em cultura líquida, em meio mínimo e com bagaço de cana de açúcar como única fonte de carbono, por 36 horas. A extração do RNA total de *A. oryzae* foi conduzida de acordo com o método de Brasileiro & Carneiro (1998).

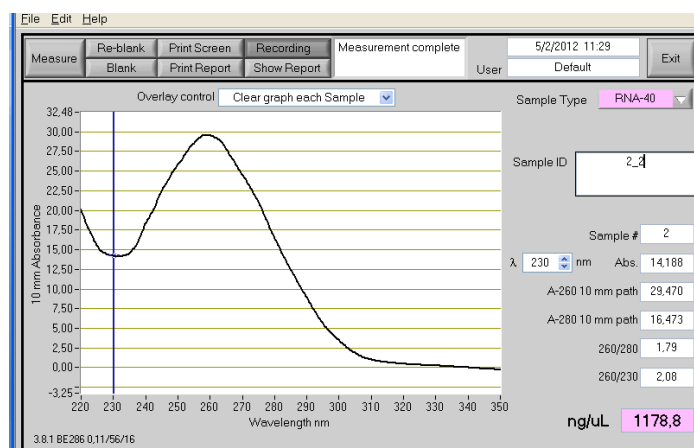


Figura 31: Espectro de absorvância do RNA total observado usando espectrofotometria NanoDrop ND-1000 spectrophotometry. RNA total foi extraído de *A. oryzae* usando o método de Brasileiro & Carneiro (1998), 36 horas pós inóculo, cultivado em MM com bagaço de cana de açúcar, cultura líquida. OD A260/A280 = 1.79; OD A260/A230 = 2.08.

A integridade das amostras de RNA selecionados para análises por Illumina RNAseq foi verificada por meio do uso do sistema de *Agilent 2100 Bioanalyzer / RNA LabChip® kits system* (Agilent Technologies) (figura 32). Essa abordagem permite a quantificação com precisão do RNA, avaliação da qualidade e determinação da integridade do RNA ribossomal 28S e 18S, trabalhando a partir do mínimo de 10ng de RNA. Esse sistema também gera um número de integridade do RNA (RIN) (Schroeder et al., 2006), o qual leva em conta o traço

electroforético completo. O software que gera a escala do algoritmo RIN é usado para classificar RNA total eucariótico, com 1 representando o perfil mais degradado e 10 representando RNA intácto.

Após enriquecidas as 16 bibliotecas de cDNA, as 8 bibliotecas geradas a partir de RNA de *A. oryzae* cultivado em meio líquido e semi-sólido com o bagaço de cana como fonte de carbono foram sequenciados no canal 1 do flowcell. As 8 bibliotecas geradas a partir de RNA dos tratamentos controle de *A. oryzae* cultivado em meio líquido e semi-sólido, com a glicose usada como única fonte de carbono, foram sequenciados no canal 2 do flowcell (tabela 10).

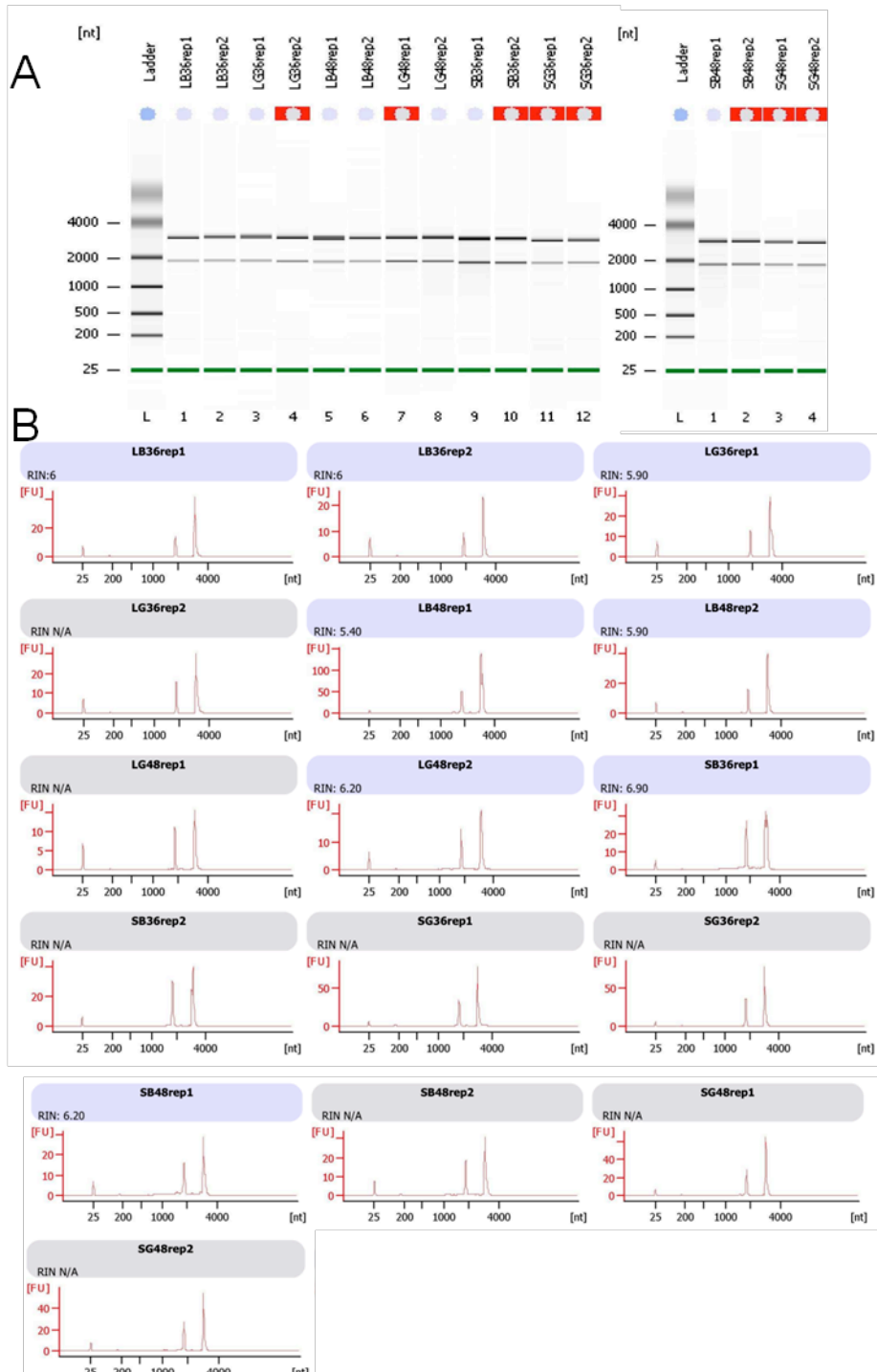


Figura 32: Avaliação da integridade de RNA total de *A. oryzae* pelo Bioanalyzer (Agilent Technologies). Um total de 16 amostras de RNA total representam os tratamentos encaminhados para sequenciamento. Cada tratamento foi conduzido em duplicata: *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana, cultura líquida, 36 horas; *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana, cultura líquida, 48 horas; *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana, cultura semi-sólida, 36 horas; *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana, cultura semi-sólida, 48 horas; *A. oryzae* cultivado em glicose, cultura líquida, 36 horas; *A. oryzae* cultivado em glicose, cultura líquida, 48 horas; *A. oryzae* cultivado em glicose, cultura semi-sólida, 36 horas; *A. oryzae* cultivado em glicose, cultura semi-sólida, 48 horas; A: Separação electroforética das amostras de RNA total pelo Bioanalyzer. O caneleta L corresponde ao marcador de tamanho de RNA e as caneletas numeradas a amostras de RNA total de *A. oryzae*. As duas bandas intensas correspondem ao rRNA 28S e 18S. B: Os picos correspondem a intensidades de fluorescência medidos durante a electroforese das amostras, com o eixo Y mostrando unidades de fluorescência e o eixo X mostrando tamanhos dos fragmentos de RNA em nucleotídeos.

Tabela 10: Integridade e cálculos de concentração para cada das 16 amostras de RNA total de *A. oryzae* selecionada para análise do transcrito por meio de RNAseq Illumina. O canal de sequenciamento Illumina segue de acordo com os substratos de cultivo. Amostras cultivadas em bagaço de cana com sequenciamento no canal 1 e amostras cultivadas em glicose com sequenciamento no canal 2.

Canal 1						Canal 2					
Organismo	Amostra	Conc. Amostra (ng/ul)	260/280	260/230	RIN	Organismo	Amostra	Conc. Amostra (ng/ul)	260/280	260/230	RIN
<i>A. oryzae</i> , bagaço, tempo1, cultura líquida	LB36rep1	226	1,99	1,16	6	<i>A. oryzae</i> , glicose tempo1, cultura líquida	LG36rep1	168	1,99	1,56	5,9
<i>A. oryzae</i> , bagaço, tempo1, cultura líquida (rep.bio)	LB36rep2	134	1,96	2,68	6	<i>A. oryzae</i> , glicose, tempo1, cultura líquida (Rep.Bio)	LG36rep2	201	1,99	1,06	N/A
<i>A. oryzae</i> , bagaço, tempo2, cultura líquida	LB48rep1	220	1,98	1,59	5,4	<i>A. oryzae</i> , glicose, tempo2, cultura líquida	LG48rep1	212	1,97	1,68	N/A
<i>A. oryzae</i> , bagaço, tempo2, cultura líquida (Rep.Bio)	LB48rep2	181	1,92	1,46	5,9	<i>A. oryzae</i> , glicose, tempo2, cultura líquida (Rep.Bio)	LG48rep2	327	1,98	2,83	6,2
<i>A. oryzae</i> , bagaço, tempo1, cultura semi-sólida	SB36rep1	68	1,96	1,13	6,9	<i>A. oryzae</i> , glicose, tempo1, cultura semi-sólida	SG36rep1	143	2,06	1,74	N/A
<i>A. oryzae</i> , bagaço, tempo1, cultura semi-sólida (Rep.Bio)	SB36rep2	57	1,99	1,3	N/A	<i>A. oryzae</i> , glicose, tempo1, cultura semi-sólida (Rep.Bio)	SG36rep2	153	1,98	1,5	N/A
<i>A. oryzae</i> , bagaço, tempo2, cultura semi-sólida	SB48rep1	66	1,93	1,22	6,2	<i>A. oryzae</i> , glicose, tempo2, cultura semi-sólida	SG48rep1	116	1,96	1,51	N/A
<i>A. oryzae</i> , bagaço, tempo2, cultura semi-sólida (Rep.Bio)	SB48rep2	57	1,91	1,19	N/A	<i>A. oryzae</i> , glicose, tempo2, cultura semi-sólida (Rep.Bio)	SG48rep2	160	1,88	1,09	N/A

6.3.3 Estatísticas das sequências

O método RNAseq de Illumina para a análise de transcrito gera informação absoluta, o qual pode ser aplicada ao perfil de expressão gênica. Em *A. oryzae*, essa técnica foi aplicada para investigar a variação da expressão de genes sob o tempo em resposta a fontes de carbono contrastantes. 16 bibliotecas de cDNA foram sequenciadas, gerando um total de 634.255.527 sequências lidas, com o comprimento entre 75 - 85 pb, totalizando 83,82 Gb de dados brutos.

Tabela 11 mostra dados estatísticos, por biblioteca de cDNA, da qualidade das leituras do sequenciamento RNA-Seq Illumina antes e depois do processamento das leituras. Cada biblioteca gerou, depois do processamento, uma média de 4.3 Gbases de informações de leituras e entre 50 à 60 milhões de sequências. Resultados estatísticos mostraram que a porcentagem de sequências com qualidade FASTQ GTE30 antes e depois do processamento não sofreram grandes alterações.

Tabela 11: Resumo dos dados estatísticos em relação ao número de dados gerados (Gbases), número de sequências lidas (milhões), porcentagem de sequências com qualidade FASTQ GTE30 e a média do valor de qualidade FASTQ GTE30 a partir dos dados de RNAseq para cada biblioteca de cDNA de *A. oryzae*.

Flow Cell	Canal	Nome da amostra	Antes do processamento				Depois do processamento			
			Número em Gbases por biblioteca	Sequências (Milhões)	Porcentagem de sequências com qualidade FASTQ 30	Média do valor de qualidade FASTQ	Número em Gbases por biblioteca	Sequências (Milhões)	Porcentagem de sequências com qualidade FASTQ 30	Média do valor de qualidade FASTQ
BD14DYACXX	1	LB36rep1	6.58	65.8	79.58	32.17	5.46	63.61	80.77	34.94
BD14DYACXX	1	LB36rep2	5.46	54.6	79.05	32.02	4.52	52.69	80.59	34.86
BD14DYACXX	1	LB48rep1	5.13	51.3	79.58	32.17	4.26	49.59	80.68	34.90
BD14DYACXX	1	LB48rep2	5.19	51.9	79.66	32.19	4.31	50.16	80.75	34.93
BD14DYACXX	1	SB36rep1	4.78	47.8	79.8	32.24	3.98	46.24	80.73	34.89
BD14DYACXX	1	SB36rep2	4.56	45.6	79.49	32.14	3.79	44.09	80.63	34.86
BD14DYACXX	1	SB48rep1	5.35	53.5	79.12	32.04	4.42	51.51	80.38	34.81
BD14DYACXX	1	SB48rep2	5.07	50.7	78.96	32.01	4.18	48.80	80.30	34.75
BD14DYACXX	2	LG36rep1	5.11	51.1	77.21	31.46	4.15	48.73	80.19	34.60
BD14DYACXX	2	LG36rep2	5.18	51.8	77.63	31.58	4.22	49.50	80.34	34.67
BD14DYACXX	2	LG48rep1	5.45	54.5	77.31	31.48	4.42	51.92	80.39	34.76
BD14DYACXX	2	LG48rep2	5.61	56.1	77.57	31.57	4.57	53.57	80.23	34.61
BD14DYACXX	2	SG36rep1	4.38	43.8	77.17	31.44	3.56	41.73	80.07	34.56
BD14DYACXX	2	SG36rep2	5.18	51.8	76.86	31.36	4.20	49.41	79.92	34.53
BD14DYACXX	2	SG48rep1	4.79	47.9	74.98	30.77	3.79	45.04	79.72	34.66
BD14DYACXX	2	SG48rep2	6	60	76.47	31.24	4.84	56.92	79.82	34.47

6.3.4 Análise de qualidade das sequências

Analisando todas as leituras de sequências, dados métricos coletados durante o alinhamento das sequências por biblioteca de cDNA. Os dados estão apresentados por bibliotecas e categorias, onde a categoria *par* representam as sequências lidas em ambos os sentidos, e categoria *não par* representam as sequências lidas em apenas um sentido. Os dados métricos obtidos mostraram que o sequenciamento, em sua totalidade, foi de alta qualidade, não havendo perdas de informação.

O total de sequências foi igual para o total de sequências PF, que passaram pelo filtro de qualidade Illumina, onde o total de sequências PF de alta qualidade alinhadas ao genoma de referência foi similar ao número total de sequências PF. A média de sequências de alta qualidade não alinhadas, calculada pelo número médio de sequências não alinhadas versus o número de leituras na sequência de referência que foram alinhados à referência com alta qualidade, revelou baixo número de sequências não alinhadas. Resultado semelhante para a taxa de erro de sequências PF de alta qualidade, calculada pela porcentagem de bases que não alinharam ao genoma de referência de *A. oryzae* RIB40 em alinhamento de leituras PF de alta qualidade.

A taxa InDel de sequências PF, calculada pelo número de eventos de inserção e deleção por 100 bases alinhadas, também foi baixo. O tamanho médio das sequências variou entre 85 à 75 pares de base. A variação de tamanho das sequências foi dentro do esperado, uma vez que o kit usado para o sequenciamento gera aproximadamente 105 pares de bases, e devido o uso de adaptadores, *barcoding*, em ambos os sentidos de leitura, entre 20 à 30 bases são perdidas na leitura.

Dados métricos mostraram que não houve leitura de adaptadores. Também mostraram porcentagens abaixo de 0,000949 % para a formação de leituras quiméricas. Resultados métricos mostram que o sequenciamento dos transcritos de *A. oryzae* cultivado em meios de cultura líquido e semi-sólido, usando o bagaço de cana, ou a glicose como única fonte de carbono, foi de alta qualidade. Não havendo perdas de informações devido à qualidade do sequenciamento (tabela 12).

Tabela 12: Resumo do número de sequências mapeadas a partir dos dados de RNAseq para cada das 16 biblioteca de cDNA de *A. oryzae* cultivado em meios de cultura líquido e semi-sólido, usando o bagaço de cana, ou a glicose como única fonte de carbono, em dois momentos distintos. A tabela segue linhas de informações por biblioteca de cDNA.

Biblioteca cDNA	Categoria	Total de sequencias	Total de sequencias PF	Total de sequencias PF de alta qualidade alinhadas	Média de sequencias PF de alta qualidade não alinhadas	Taxa de erro de sequencias PF de alta qualidade	Taxa INDEL de sequencias PF	Tamanho médio das sequencias
LB36rep1	Par	46678370	46678370	43908288	5	0,086446	0,002632	85,444147
LB36rep1	Não par	1402081	1402081	1186489	4	0,068395	0,002638	75,320917
LB36rep2	Par	40865755	40865755	38910188	5	0,08306	0,002627	85,415794
LB36rep2	Não par	1268373	1268373	1092108	4	0,067382	0,002587	75,285871
LB48rep1	Par	37379857	37379857	35375871	6	0,087791	0,002529	85,51828
LB48rep1	Não par	1106733	1106733	941933	4	0,070184	0,002465	75,189337
LB48rep2	Par	37727581	37727581	35932607	6	0,089175	0,00257	85,544727
LB48rep2	Não par	1108163	1108163	949957	4	0,071336	0,002556	75,346866
LG36rep1	Par	37601043	37601043	35174428	5	0,081176	0,002608	84,992098

LG36rep1	Não par	1539426	1539426	1294343	4	0,06671	0,002496	75,396985
LG36rep2	Par	38447679	38447679	36194071	5	0,081583	0,002602	85,1329
LG36rep2	Não par	1506609	1506609	1277050	4	0,067608	0,002501	75,560629
LG48rep1	Par	41298377	41298377	37747093	3	0,061543	0,002115	85,030303
LG48rep1	Não par	1795398	1795398	1516962	2	0,045559	0,00186	75,632299
LG48rep2	Par	41412420	41412420	38810501	5	0,079749	0,002791	85,102226
LG48rep2	Não par	1654847	1654847	1382713	3	0,063567	0,002697	75,360578
SB36rep1	Par	34729871	34729871	32773877	6	0,089898	0,002597	85,576199
SB36rep1	Não par	978969	978969	829356	4	0,071452	0,002579	75,277284
SB36rep2	Par	33390197	33390197	31158449	5	0,086975	0,002653	85,549448
SB36rep2	Não par	1010551	1010551	843523	4	0,067735	0,00254	75,400892
SB48rep1	Par	36498385	36498385	34830850	5	0,090426	0,002699	85,513919
SB48rep1	Não par	1223700	1223700	1027005	4	0,067352	0,002636	75,090435
SB48rep2	Par	33256887	33256887	32152969	5	0,090165	0,002821	85,318289
SB48rep2	Não par	1116654	1116654	962383	4	0,070059	0,002778	74,902086
SG36rep1	Par	32961949	32961949	30994729	4	0,080487	0,002878	85,072357
SG36rep1	Não par	1345343	1345343	1103759	3	0,06122	0,002889	75,195158
SG36rep2	Par	38724034	38724034	36396417	4	0,080487	0,002768	84,876767
SG36rep2	Não par	1583406	1583406	1312374	3	0,062542	0,002724	74,997151
SG48rep1	Par	38389970	38389970	34664551	0	0,024469	0,000961	84,379753
SG48rep1	Não par	2106615	2106615	1828630	0	0,01938	0,000805	75,285441
SG48rep2	Par	42222596	42222596	40074749	4	0,077294	0,002541	84,868477
SG48rep2	Não par	1923688	1923688	1625789	3	0,056832	0,002385	75,010188

6.3.5 Análise dos genes expressos por biblioteca de cDNA

Considerando que o genoma de referência de *A. oryzae* RIB40 possui 12.074 genes codantes de proteína (Machida et al., 2005), um total de mais de sete mil genes foram representados por biblioteca de cDNA. No tratamento de *A. oryzae* BLU37 cultivado em meio líquido com bagaço de cana de açúcar pré-tratado, com tempo de cultivo de 36h (LB36) foram identificados 7.122 genes e em 48h (LB48) foram identificados 7.126 genes. Nos tratamentos com cultivos líquidos com glicose, à 36h (LG36) e à 48h (LG48) foram identificados 7.126 genes em cada tratamento. Nos tratamentos em cultivo em meio semi-sólido bagaço de cana de açúcar pré-tratado, nos tempo de cultivo de 36h (SB36) e 48h (SB48) também foram identificados 7.126 genes em cada tratamento. Nos tratamentos com cultivo em meio semi-sólido com glicose, nos tempo de cultivo de 36h (SG36) e 48h (SG48) foram identificados 7.126 e 7.123 genes, respectivamente.

A homogeneidade dos resultados refletem na alta qualidade do mRNA sequenciado, na qualidade dos dados e na alta cobertura oferecida pelo sistema Hi-seq Illumina. Para a identificação dos genes presentes nos dados de sequenciamento do transcrito de *A. oryzae* BLU37 para cada biblioteca de cDNA, foram utilizados como base os modelos gênicos do genoma de referência de *A. oryzae* RIB40 com o intuito de obter uma ampla cobertura entre as diferenças e similaridades dos dados do transcrito.

A partir do total de genes obtidos por biblioteca de cDNA, uma análise global envolvendo comparações entre os tratamentos foi realizada e mostrada graficamente na forma de HeatMap usando parametros estatísticos pvalue < 0,01. Comparações entre os níveis de expressão medido em log2FoldChange entre tratamentos com bagaço de cana-de-

açúcar e tratamentos com glicose estão representados nos tons de azul e vermelho. Os tons de azul representam expressão negativa e os tons de vermelho expressão positiva dos tratamentos com bagaço de cana em relação aos tratamentos com glicose. A análise mostrou que os dados agruparam-se de acordo com o formato do meio líquido ou semi-sólido, independente do tempo de cultivo. Entretanto, há grupos de genes induzindo ou reprimindo de acordo com o formato do meio de cultivo, onde quando o formato do meio de cultivo muda, a expressão também muda. E também há grupos que independem do formato do meio, sendo muito induzidos ou reprimidos exclusivamente de acordo com a fonte de carbono. Outros grupos possuem a expressão gênica influenciada pela mudança de tempo (figura 33).

Uma segunda análise em forma de HeatMap comparando somente os tratamentos com bagaço de cana ou somente os tratamentos com glicose foi realizada. Resultados mostraram que a expressão gênica foi influenciada pelo tempo ou formato do meio de cultura, independente da fonte de carbono usada. Houve a formação de grupos de genes induzidos ou reprimidos quando o meio foi alterado e grupos de genes que são tempo-dependentes (figuras 34 e 35).

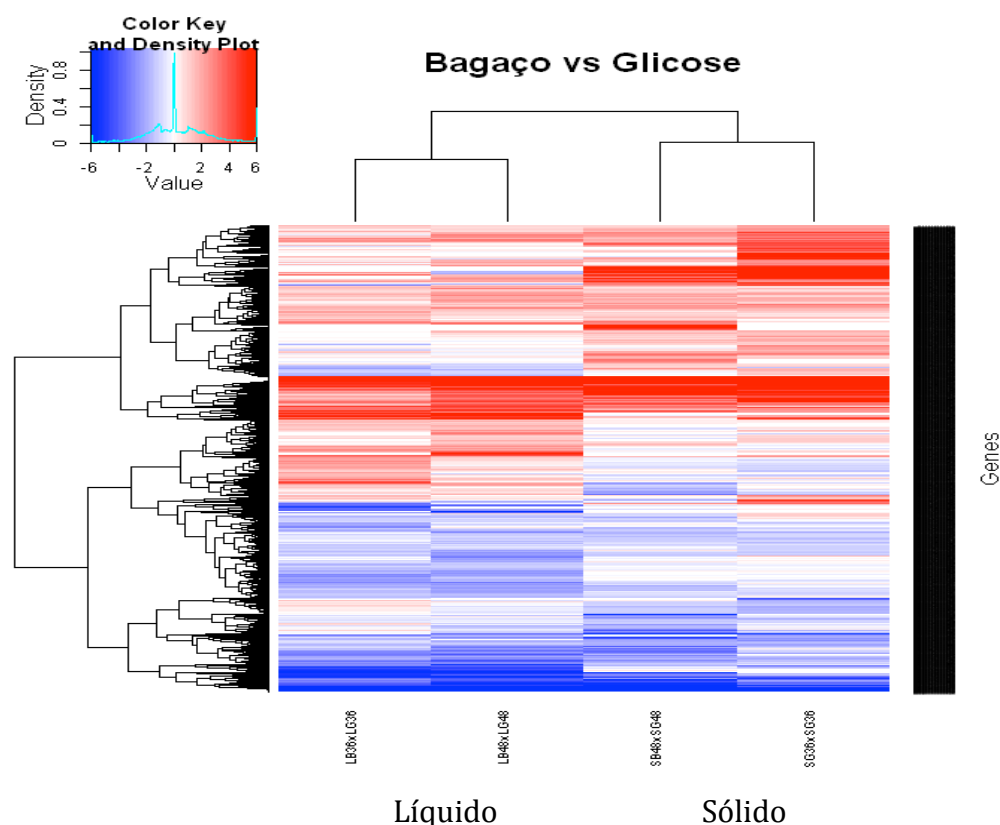


Figura 33: Heatmap dos genes expressos nos tratamentos de *A. oryzae* LB36, LG36, LB48, LG48, SB36, SG36, SB48 e SG48. As comparações foram avaliadas de acordo com os valores de log2FoldChange de acordo com a fonte de carbono usada em cada tratamento. Padj aplicado < 0,01.

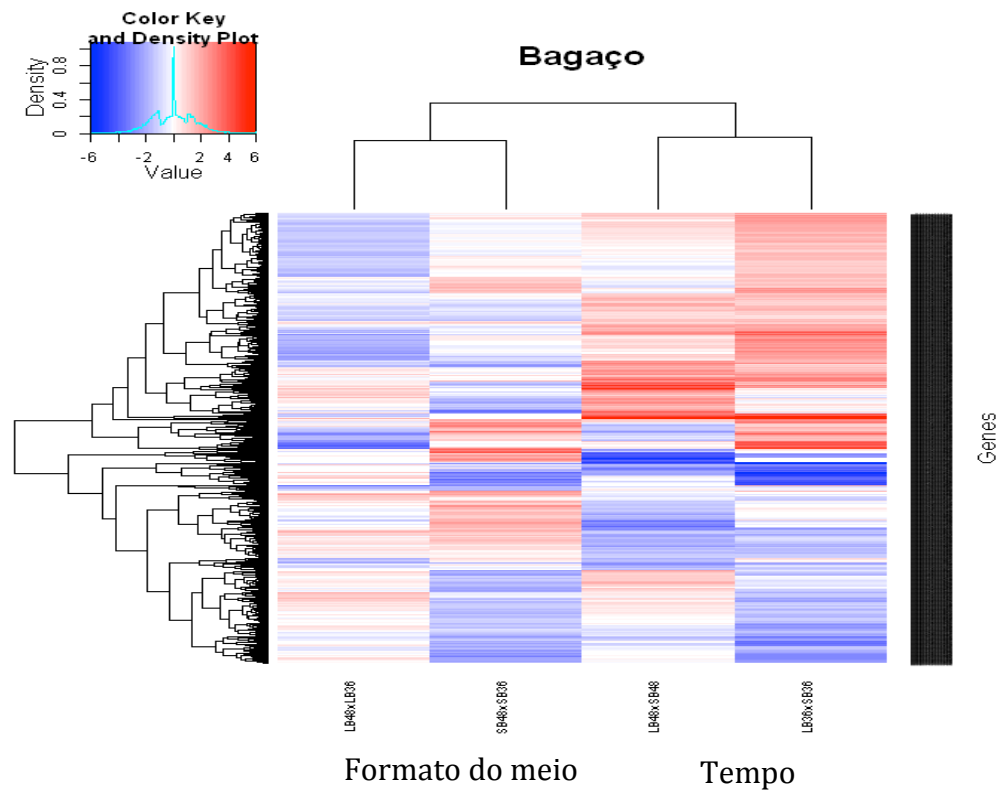


Figura 34: Heatmap dos genes expressos nos tratamentos de *A. oryzae* LB36, LB48, SB36, SB48. As comparações foram avaliadas de acordo com os valores de log2FoldChange de cada tratamento com bagaço de cana. Padj aplicado < 0,01.

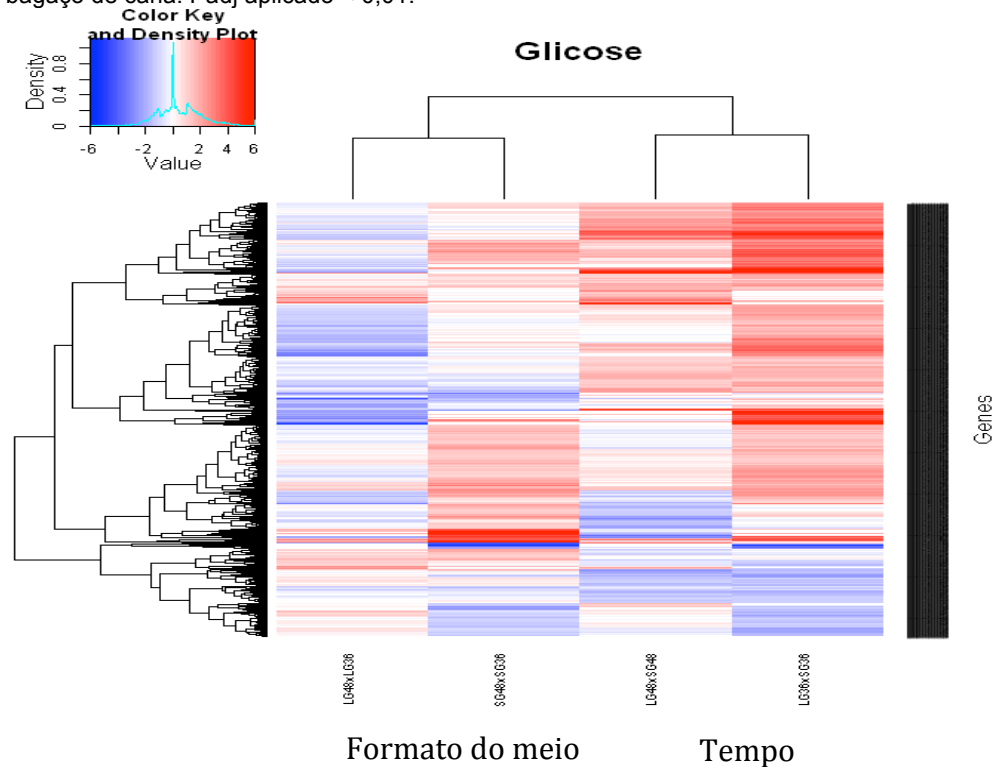


Figura 35: Heatmap dos genes expressos nos tratamentos de *A. oryzae* LG36, LG48, SG36, SG48. As comparações foram avaliadas de acordo com os valores de log2FoldChange de cada tratamento com glicose. Padj aplicado < 0,01.

6.3.6 Análise da expressão de genes CAZy de *A. oryzae* cultivado sob diferentes tratamentos

6.3.6.1 Caracterização de genes codificantes de enzimas CAZy

De acordo com o banco de dados *Carbohydrate-Active Enzymes* (CAZy) (<http://www.cazy.org/>) (Cantarel et al., 2009), um total de 114 famílias CAZy foram identificadas nos tratamentos de *A. oryzae* BLU37. A família de glicosil hidrolases (GH) foi a mais diversa apresentando um total de 62 famílias. Seguida por 30 famílias de glicosil transferase (GT), 9 famílias de módulos de ligação ao carboidrato (CBM), 8 famílias de carboidrato esterase (CE) e 5 famílias de polissacarídeo liase (PL). As famílias CAZy identificadas não variaram entre as oito bibliotecas de cDNA analisadas.

As famílias CAZy identificadas usando parâmetros estatísticos $\text{padj} < 0,01$ e $\log_2\text{FoldChange} < -5$ e > 5 , as famílias GH1, 10, 105, 11, 12, 13, 15, 16, 24, 25, 27, 28, 3, 31, 35, 36, 43, 5, 51, 53, 6, 61, 62, 67, 7, 71, 78, 93, 95 foram encontradas. Famílias CE 1, 12, 16, 4, 5, 8 e PL1, 3, 9 também foram identificadas entre os tratamentos com bagaço de cana em comparação com os tratamentos com glicose. Famílias CBM 14 e 32 foram identificadas somente no tratamento SB48, entretanto, genes pertencentes às famílias de glicosil hidrolases e módulos de ligação ao carboidrato foram identificados em todos os tratamentos (LB36, LB48, SB36 e SB48) como a GH61, CBM1. Genes relacionados a expressão de quitinase como os da família GH18 foram identificados em todos os tratamentos com bagaço de cana com regulação reprimida em mais de 5 vezes em comparação com os tratamentos com glicose (anexo 3).

Genes que codificam famílias de enzimas CAZy e fatores de transcrição diferencialmente expressos foram analisados para os oito tratamentos de *A. oryzae* BLU37. A partir da análise de aproximadamente 7.120 genes para cada tratamento, os resultados foram semelhantes. Os genes que codificam enzimas da família glicosil hidrolase (GH) são os mais presentes com cerca de 2,57% de genes em cada tratamento. Genes que codificam enzimas das famílias de carboidrato esterases (CE), polissacarídeos liases (PL), glicosil transferases (GT) e módulos de ligação ao carboidrato (CBM), estiveram presentes em menor porcentagem com cerca de 0,29%, 0,19%, 1,25%, 0,09%, respectivamente. Genes que codificam fatores de transcrição representam cerca de 2,33% e genes com anotações preditas ou não anotados representaram cerca de 93,34% do total de genes presentes em cada tratamento.

Baseado nos dados de agrupamento dos genes que representam famílias CAZy, fatores de transcrição e genes não anotados, gráficos de dispersão foram montados (figura 36). Genes GH, CMB, CE, GT e PL são representados por pontos amarelos, verde, vermelho, laranja e azul, respectivamente. Genes que codificam fatores de transcrição são representados por pontos roxos e genes não anotados por pontos cinza. A análise que consistiu em comparações entre dois tratamentos por gráfico, destacou genes diferencialmente expressos com provável participação na hidrólise de carboidratos. A análise

da expressão diferencial de genes CAZy entre os tratamentos de *A. oryzae* BLU37, usando parâmetros estatísticos de $p_{adj} < 0,01$ e $\log_2\text{FoldChange} < -10$ ou > 10 , resultou na presença de genes das famílias GH e CE somente em comparações entre tratamentos com bagaço de cana e glicose.

Nos tratamentos LB36 x LG36 o gene que codifica a endoxilanase, identificador AO090001000111, da família GH11 teve a sua expressão 10 vezes aumentada no tratamento LB36 em comparação com o tratamento LG36, semelhante foi visto para os genes da xiloglucana específica endo- β -1,4-glucanase (AO090026000102) GH12 11 vezes mais expresso; endo- β -1,4-xilanase (AO090103000423) GH10 12 vezes mais expresso; xilanase (AO090120000026) GH11 13 vezes mais expresso. As celobiohidrolase, identificadores AO090001000348 e AO090038000439, GH7, 6, foram 10 e 11 vezes mais expressas, respectivamente. Os genes da exoarabinase (AO090011000141) GH93 e α -N-arabinofuranosidase (AO090701000885) GH62 foram 11 vezes mais expressos. A endoglucanase (AO090023000787) GH61 foi 10 vezes mais expressa, e o feruloil esterase (AO090701000884) CE1 foi 14 vezes mais expresso (figura 36A).

Os genes observados com expressão diferencial entre os tratamentos com bagaço de cana e glicose foram semelhantes, entretanto com níveis de expressão diferentes. Comparações entre os tratamentos LB48 e LG48 mostram níveis de expressão mais elevados quando comparado com os tratamentos LB36 e LG36. Genes que codificam a Endoxilanase (AO090001000111) GH11, xiloglucana específica endo- β -1,4-glucanase (AO090026000102) GH12, endo- β -1,4-xilanase (AO090103000423) GH10, xilanase (AO090120000026) GH11, tiveram a sua expressão aumentada em 11, 14, 14, 15 vezes, respectivamente. As celobiohidrolase (AO090001000348, AO090012000941 e AO090038000439) GH7, 7 e 6 a expressão foi 11, 10 e 12 vezes maior no tratamento com bagaço de cana, respectivamente. A endoglucanase (AO090023000787) GH61 foi 11 vezes mais expressa. Os genes da exoarabinase (AO090011000141) GH93, α -N-arabinofuranosidase (AO090701000885) GH62, arabinofuranosidase (AO090701000886) GH43, tiveram a sua expressão aumentada 13, 12, 10 vezes, respectivamente (figura 36B).

Na análise dos tratamentos SB36 e SG36, os genes da β -xilosidase (AO090005000986) GH3, xiloglucana específica endo- β -1,4-glucanase (AO090026000102) GH12, endo- β -1,4-xilanase (AO090103000423) GH10, xilanase (AO090120000026) GH11, Acetil xilana esterase (AO090011000745) CE1, tiveram expressão 12, 10, 12, 15, 14 vezes aumentada. As celobiohidrolases (AO090001000348, AO090038000439) GH7, 6 expressaram 10X mais no bagaço. Os genes que codificam para atividade α -L-fucosidase (AO090005000382) GH95, β -galactosidase (AO090012000135) GH3, exopoligalacturonase (AO090026000784) GH28, exopoligalacturonase (AO090102000011) GH28, α -N-arabinofuranosidase (AO090103000120) GH3, α -N-arabinofuranosidase (AO090701000885) GH62, arabinofuranosidase (AO090701000886) GH43, pectinaesterase (AO090011000745) CE8 tiveram a sua expressão aumentada em 10, 12, 11, 13, 13, 12, 13 vezes, respectivamente (figura 36E).

A análise comparativa entre os tratamentos SB48 e SG48 apresentou expressão aumentada em 10 vezes no tratamento SB48 dos genes β -xilosidase (AO090005000986) GH3, endo- β -1,4-xilanase (AO090103000423) GH10, xilanase (AO090120000026) GH11, α -N-arabinofuranosidase (AO090701000885) GH62 e feruloil esterase (AO090701000884) CE1. A β -galactosidase (AO090012000135) GH3 expressou 13 vezes mais no SB48 do que no SG48 (figura 36F).

Análise comparativa entre os tratamentos LB36 x LB48, LG36 x LG48, SB36 x SB48, SG36 x SG48, SB36 x LB36, SB48 x LB48, SG36 x LG36, SG48 x LG48 não resultaram em níveis de expressão igual ou acima de 10 vezes, revelando que os genes diferencialmente expressos estão relacionados com a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Uma segunda análise usando o parâmetro estatístico $\text{padj} < 0,01$ e $\text{log2FoldChange} < -5$ ou > 5 revelou cerca de 104 genes CAZy regulados positivamente identificados entre os tratamentos com bagaço de cana em comparação com os tratamentos com glicose. 23 genes CAZy foram identificados em quatro tratamentos com regulação positiva acima de 5 vezes quando comparado com os tratamentos com glicose. Um total de 21 e 15 genes CAZy foram identificados em três e dois tratamentos, respectivamente. 45 genes CAZy foram exclusivos de um tratamento (figura 37) (anexo 3 e 4).

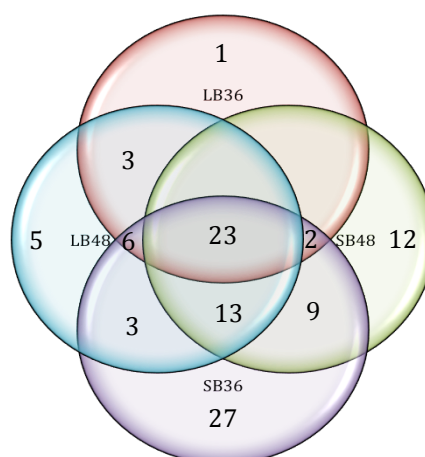


Figura 37: Diagrama de Venn mostrando a distribuição do número de genes CAZy com expressão e co-expressão diferencial, com regulação positiva, de acordo com cada tratamento. Círculo vermelho contém os genes CAZy com expressão diferencial no tratamento em cultivo líquido com 36 horas após inóculo. Círculo azul contém os genes CAZy com expressão diferencial no tratamento em cultivo líquido com 48 horas após inóculo. Círculo roxo contém os genes CAZy com expressão diferencial no tratamento em cultivo semi-sólido com 36 horas após inóculo. Círculo verde contém os genes CAZy com expressão diferencial no tratamento em cultivo semi-sólido com 48 horas após inóculo.

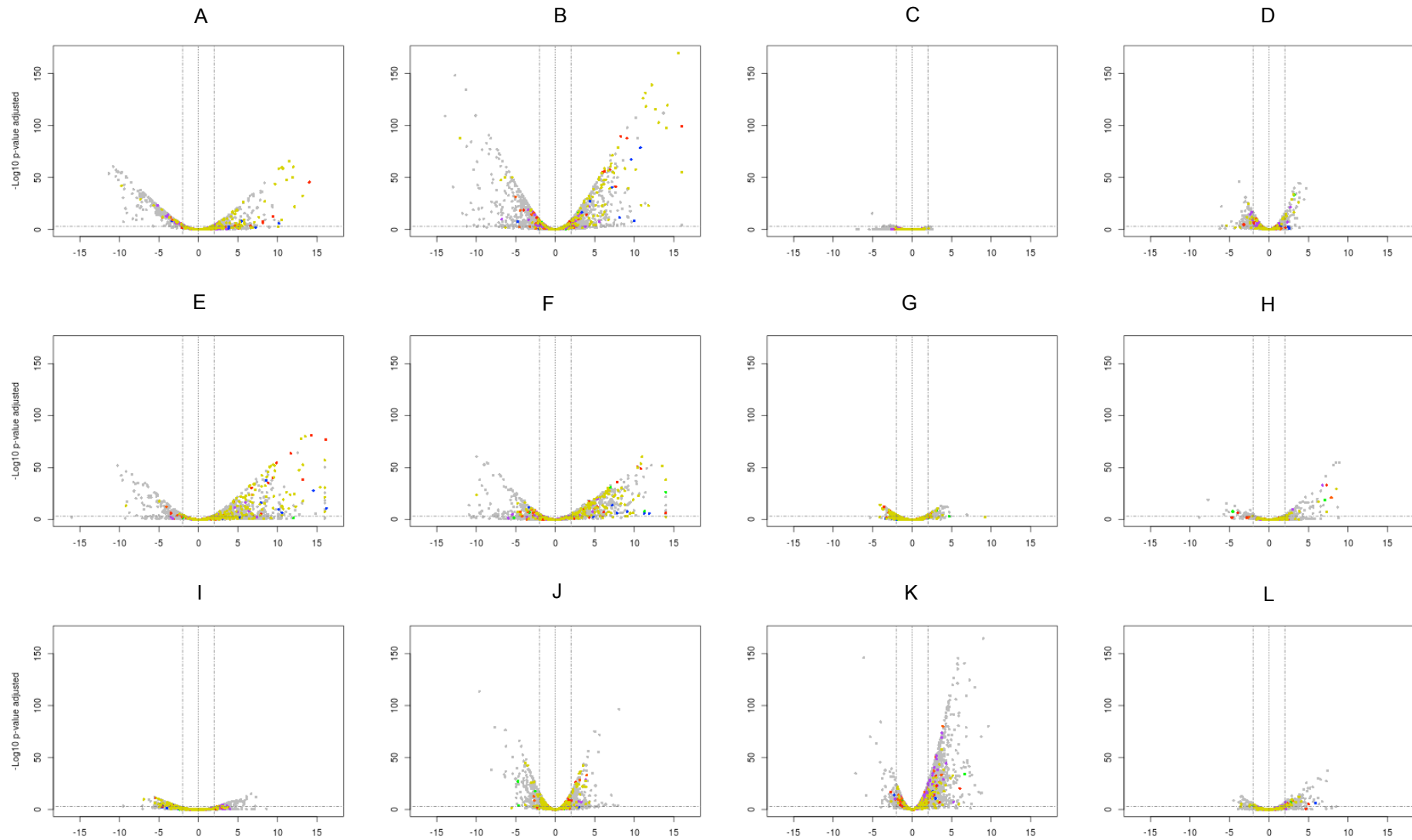


Figura 36: Análise comparativa de dispersão dos genes relacionados a famílias CAZy, fatores de transcrição e não anotados. A: LB36 x LG36; B: LB48 x LG48; C: LB36 x LB48; D: LG36 x LG48; E: SB36 x SG36; F: SB48 x SG48; G: SB36 x SB48; H: SG36 x SG48; I: SB36 x LB36; J: SB48 x LB48; K: SG36 x LG36; L: SG48 x LG48. Cultural líquida (L), cultura semi-sólida (S), suplementado com bagaço de cana (B), suplementado com glicose (G), cultivo por 36h (36), cultivo por 48h (48). Pontos amarelos: genes da família CAZy PL, pontos roxos: fatores de transcrição, pontos cinzas: genes não anotados.

6.3.9.4 Fatores de transcrição

A partir do banco de dados *Fungal Transcription Factor Database* (<http://fffd.snu.ac.kr/index.php?a=view>), uma análise usando os parâmetros estatísticos de p value ajustado $< 0,01$ e $\log_2\text{FoldChange} < -2$ ou > 2 , 44 genes pertencentes à cinco famílias de fator de transcrição, foram encontrados (anexo 5 e 6)

A análise comparativa entre os oito tratamentos, quatro tratamentos com bagaço e quatro tratamentos com glicose, usando parâmetros estatísticos $\text{padj} < 0,01$ e $\log_2\text{FoldChange} < -5$ e > 5 identificou dois genes relacionados a fatores de transcrição. O gene AO090023000362 da família Zn2Cys6 e o AO090005001041 da família C2H2 zinc finger tiveram a sua expressão aumentada em 5 e 7 vezes nos tratamentos LB48 e SB36, respectivamente. Entretanto, dois genes da família bHLH relacionados a reprodução do fungo nos tratamentos LB36, LB48 e um gene da família Zn2Cys6 no tratamento SB48 tiveram a sua expressão reprimida em 5 vezes (anexo 5 e 6).

Dois fatores de transcrição AO090038000234 e AO090038000233 induzidos por maltose, foram reprimidos em cinco e seis vezes, respectivamente, em comparação entre os tratamentos LB36 e SB36. Análise comparativa entre os tratamentos com glicose mostrou que o gene AO090005001041, um fator de transcrição ortólogo do gene *BrlA*, também teve a expressão aumentada de cinco a seis vezes nos tratamentos LG36 e SG36, e SG48 e SG36, respectivamente. A partir das análises comparativas dos níveis de expressão entre os oito tratamentos, o gene *XlnR*, responsável pela regulação de genes celulolítico e xilanolítico, mostraram níveis de expressão não significativos.

7 DISCUSSÃO

7.1 Confirmação da posição taxonômica do *A. oryzae* BLU37

Aspergillus seção *Flavi* é um taxon que inclui espécies com a cabeça de conídios amarelo-verde a marrom e escleródio escuro. Entretanto, a classificação dentro dessa seção é difícil, com consideráveis divergências de caracteres morfológicos, resultando em variabilidade genética intra e interespecífica entre os membros dessa seção (Kumeda and Asao, 1996; Klich & Pitt, 1988). A partir da região consenso do isolado *A. oryzae* BLU37, a análise BLASTn apresentou homologias com oito espécies do grupo de *Aspergillus* seção *Flavi*, incluindo *A. oryzae*. Entretanto análise *RefSeqGene Blast* confirmou a posição taxonômica da região rDNA ITS analisada com *A. oryzae* RIB40. Apesar da difícil resolução taxonômica de diversas espécies na seção *Flavi*, características morfológicas em conjunto com a análise molecular de regiões como, rDNA ITS, β -tubulina e calmodulina, têm sido usadas para inferir as relações filogenéticas dentro dessa seção (Kumeda and Asao, 2001; Frisvad et al., 2005; Pildain et al., 2008; Varga et al., 2011).

6.2 Perfil da atividade enzimática *A. oryzae* BLU37 cultivado em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e glicose

Xilana pode compreender entre 25-30% do peso seco da parede celular da planta e representa, depois da celulose, uma fonte de conversão em açúcares fermentáveis e combustíveis (Filho, 1998). Esses polissacarídeos são ramificados e compostos com ligações β -1,4 com monômeros de D-xilose e cadeias laterais contendo grupos acetil, glucurônico, metilglucurônico, arabinofuranosil, ferúlico e cumárico (Lee et al., 1993; Filho, 1998; Medeiros et al., 2003). Esses substituintes influenciam nas propriedades química e estrutural dos polissacarídeos, o que influenciando na degradação enzimática da xilana (Viikari et al., 1994; Collins et al., 2005). Xilanases são diversamente aplicadas em todos os setores industriais na produção de produtos como, papel, alimentos, bebidas, têxteis e ração animal (Subramaniyan & Prema, 2002; Polizeli et al., 2005). Também existe potencial para sua utilização na produção de etanol a partir de resíduos agroindustriais (Beg et al., 2001). Xilanases são conhecidas por serem produzidas por uma diversidade de táxons de fungos e bactérias. Fungos filamentosos fazem parte do grupo de micro-organismos atrativos para a produção de xilanases devido a sua habilidade de crescimento em diversos substratos (Wong et al., 1988; Dekker, 2003). Xilanases comerciais são produzidas por bactérias tais como espécies de membros do gênero *Bacillus*, em conjunto com os fungos de diversos gêneros tais como, *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Talaromyces* (Polizeli et al, 2005., Li et al, 2000). Membros do gênero *Aspergillus* são também utilizados para a produção de xilanases (e.g. Dekker & Richards, 1976., Medeiros et al, 2003). Um estudo

usando a estirpe *A. oryzae* BLU37 cultivado em resíduo do algodão pré-tratado purificou e caracterizou a xilanase Xyl-O1 de baixo peso molecular com atividade ótima a 50°C e pH 6,0. Resultados sugerem que a Xyl-O1 pertence ao grupo de xilanases com o mecanismo de atividade endógena (Duarte et al., 2012).

Com base nos resultados dos perfil de atividade celulolítica e hemicelulolítica de *A. oryzae* BLU37 no tratamento com bagaço de cana, a cinética de produção de xilanases mostrou ser mais expressiva em relação à cinética de produção de CMCases, FPases e pectinases. Relatos comparativos de enzimas holocelulolíticas entre fungos filamentosos *Aspergillus* e *Trichoderma* revelam que fungos do gênero *Aspergillus* possuem um grande espectro de produção de celulasas e hemicelulasas quando em comparação com fungos do gênero *Trichoderma*, os quais são potenciais secretores de celulasas (Stricker et al., 2008; Brink & Vries, 2011). Estudos mostram que *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus* e *A. oryzae*, quando cultivados em fontes de carbono ricas em hemicelulose, como o bagaço de cana-de-açúcar, são eficientes na produção de enzimas xilanolíticas (Souza et al., 2011; Tamayo et al., 2008; Siqueira et al., 2010).

A conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis dependem da ação sinérgica de celulasas e hemicelulasas. Quando fungos filamentosos produzem uma grande quantidade de enzimas de degradam a biomassa, são controlados pela repressão catabólica do carbono (CCR), que basicamente controla a assimilação do carbono. O fator de transcrição *CreA*, atua como mediador da repressão CCR, que se liga a regiões promotoras de genes celulolíticos e hemicelulolíticos de *Trichoderma reesei* (Portnoy et al., 2011) e *Aspergillus nidulans* (Cubero & Scazzocchio, 1994). A produção de celulase, induzida por celulose, pode ser reprimida pelo produto final, a glicose hidrolisada. O perfil da atividade enzimática do secretoma de *A. oryzae* no tratamento com glicose mostrou cinéticas de produção muito próximas de 0 UI. mL⁻¹, indicando que a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas foram reprimidas na presença de glicose. A medida que a concentração de glicose presente no tratamento vai diminuindo pelo consumo do fungo, a cinética de produção de celulasas e hemicelulasas vai aumentando.

6.3 Análise da expressão gênica diferencial por biblioteca de cDNA

Estudos elucidando a expressão gênica diferencial de fungos filamentosos sob tratamentos específicos têm sido descritos pela literatura. Wang et al (2010) em trabalho com RNA-Seq de *A. oryzae*, revelou em análise do transcrito comparativo entre tratamentos de estresse do retículo endoplasmático e cultivo em meios de cultura semi-sólido e líquido, 4.628 genes diferencialmente expressos entre cultivo em cultura semi-sólida e líquida. Análises de Gene Ontology (GO) revelaram que genes com maior ativação em cultura semi-sólida foram os envolvidos principalmente na ligação do RNA, ribossomos, atividade da helicase ATP-dependente, tradução de proteína, condensamento da proteína, atividade da proteína transportadora e membrana interna mitocondrial. Análises da via metabólica KEGG

indicaram que genes com maior ativação em cultura semi-sólida foram localizados especificamente nas vias do ribossomo, replicação do DNA, fosforilação oxidativa e no ciclo TCA, enquanto genes com maior ativação em cultura líquida foram associados principalmente à via de sinalização MAPK, interações SNARE no transporte vesicular, proteolases mediadas por ubiquitina e lisossomo. A expressão diferencial de genes envolvidos na biossíntese de micotoxinas em *A. flavus* NRRL3357 de acordo com a temperatura também permitiu a quantificação de 80% dos genes do fungo, incluindo 1.153 genes diferencialmente expressos entre crescimento as 30°C e 37°C (Yu et al., 2011). Na análise de todos os genes diferencialmente expressos desse estudo, foram observados grupos de genes que foram induzidos ou reprimidos de acordo com o tempo de cultivo, o formato do meio de cultura e fonte de carbono usada.

Uma análise inicial da estirpe de *A. oryzae* BLU37, realizada em estudo comparativo do secretoma de cultivos em bagaço de cana como única fonte de carbono em estado sólido e líquido, revelou que o secretoma a partir de cultivos em estado sólido é mais diverso em relação ao de cultivos líquido. Entretanto, cultivos líquido apresentam maior abundância de determinados grupos enzimáticos. Análise do secretoma por meio de espectrometria de massas (LC-MS/MS) a partir do cultivo em estado sólido, identificou 47 proteínas distintas com 18 dessas pertencentes à família GH (Pinto, 2012). A visão global do comportamento do *A. oryzae* BLU37 sob os diferentes tratamentos corrobora com os achados da literatura de que o *A. oryzae* altera a sua expressão gênica em resposta à diferentes condições de cultivo.

6.3.1 Análise da expressão diferencial de genes CAZY

Utilizando o banco de dados Carbohydrate-Active Enzymes (CAZY) (<http://www.cazy.org/>) (Cantarel et al., 2009) um total de 202 enzimas putativas que degradam polissacarídeos foram identificados no genoma de *A. oryzae* RIB40, representando 76 famílias de enzimas. Essa anotação do genoma do fungo prediz uma diversidade de arranjos de genes que codificam enzimas CAZY. Cinco classes principais estão envolvidas na decomposição da parede celular das plantas, chamadas de Glicosil Hidrolases (GH), Carboidrato Esterases (CE), Glicosil Transferases (GT), Polissacarídeos Liases (PL) e Módulos de Ligação ao Carboidrato (CBM).

Enzimas pertencentes à família GH são conhecidas pela catálise da hidrólise de ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos, já enzimas da família GT são responsáveis pela biossíntese de dissacarídeos oligo e polissacarídeos. Elas catalisam a transferência de unidades de açúcar do doador ativo para o aceptor de moléculas específico, formando ligações glicosídicas. Enzimas da família PL realizam a clivagem da cadeia de polissacarídeos que contem ácidos urônicos, liberando resíduos de ácido urônicos insaturados. Enzimas da família CE catalisam a acetilação –N ou –O de sacarídeos substituídos. Duas classes de substratos são consideradas para as CEs, aqueles que o

açúcar funciona como ácido como, a pectina metil esterase, e aqueles que o açúcar tem o comportamento de álcool como a xilana acetilada.

A análise da expressão diferencial dos genes que codificam enzimas CAZy revelaram um total de 2,57% genes GH, 0,29% genes CE, 0,19% genes PL, 1,25% genes GT e 0,09% genes CBM. Os genes que codificam enzimas GH foram os mais presentes e apresentaram grande diversidade de famílias GH com 62 famílias, seguido por 30 famílias GT, 9 famílias de CBM, 8 famílias de CE e 5 famílias de PL. Resultados conferem uma grande diversidade na expressão de genes que codificam enzimas lignocelulolíticas.

De acordo com a classificação CAZy, as famílias GH 1, 3, 6, 7 representam as enzimas com atividade celulósica. As celulasas são representadas pelas β -1,4-glucosidases (EC 3.2.1.21) encontradas nas famílias GH1 e 3, as β -1,4-endoglucanase (EC 3.2.1.4) encontrada na família GH7, as celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) encontradas nas famílias GH6 e 7, α -glucosidase (EC 3.2.1.20) da família GH13, β -1,3(4)-endoglucanase (EC 3.2.1.6) da família GH16, β -1,3-endoglucanase (EC 3.2.1.39) da família GH81. (de Brink & de Vries, 2011). A análise de transcritômica do *A. oryzae* BLU37 sob diferentes tratamentos, mostrou genes das famílias GH6 e 7 com níveis acima de 10 vezes mais expressos nos tratamentos LB36, LB48 e SB36 em comparação com os tratamentos com glicose. Genes da família GH3 também foram detectados níveis elevados de expressos. Estudos da análise de sete *Aspergilli* que possuem o genoma sequenciado, apresentaram entre três e cinco genes que codificam celobiohidrolases. Dois desses genes são típicos das famílias CAZy GH6 e GH7. As análises revelaram duas celobiohidrolases, Cbh1 e CelD. Estudo mostra que a Cbh1 possui um domínio de ligação ao carboidrato que se liga a celulose e aumenta a especificidade, diferente da CelD que não possui. A Cbh1 mostrou ser mais estável a inativação por temperatura menos sensível a inibição por glucose quando comparada com a CelD. Entretanto, em atuação conjunta, ambas as enzimas apresentam uma forte sinergia de hidrólise em resposta à substratos celulósicos (Segato et al., 2012). Um gene da família GH61, CBM1 precursor de uma endoglucanases teve a sua expressão aumentada em mais de 5 vezes nos tratamentos com bagaço de cana-de-açúcar.

Genes da família GH responsáveis pela hidrólise da hemicelulose também tiveram a sua expressão diferencial identificada nos tratamentos de *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar em comparação com os tratamentos de *A. oryzae* cultivado em glicose. O nível de expressão dos genes da família GH10 e 11 foram os mais expressivos com regulação positiva de até 15 vezes entre os tratamentos. Dentre as enzimas hemicelulósicas identificadas está a β -1,4-endoxilase (EC 3.2.1.8) encontradas nas famílias GH10 e 11. Diferenças nas estruturas do domínio catalítico das endoxilases (GH 10 e 11), resultam na especificidade dessas enzimas aos substratos. Endoxilases (GH10) possuem ampla especificidade ao substrato diferente das endoxilases (GH11). Além de hidrolisarem cadeias lineares 1,4-ligado a resíduos de D-xilose, as endoxilases (GH10) hidrolisam cadeias principais de xilana com alto grau de substituições. São importantes para a degradação completa de xilanas substituídas, diminuindo a necessidade de enzimas

acessórias (Pollet et al., 2010).

A degradação completa da hemicelulose depende da hidrólise das substituições presentes na cadeia principal da hemicelulose. Monômeros como a D-galactose, D-xilose, L-arabinose e D-ácido galacturônico são as substituições mais frequentemente encontradas. Nesse estudo, α -xilosidase (EC 3.2.1.177) encontrada na família GH31, teve a expressão gênica aumentada quando na presença do bagaço de cana de açúcar. Essa enzima libera resíduos de D-xilana com ligações α presentes na cadeia principal da xiloglucana. Todas as α -xilosidase possuem grande especificidade aos resíduos com ligação α -xilose, mas diferem no tipo de hidrólise glicosídica. Enzimas de *A. niger* atuam nas p-nitrofenil- α -D-xulanopiranosideo, isoprimeverose e oligossacarídeos derivados de xiloglucana. α -xilosidase I de *A. flavus* também atuam nesses três substratos, entretanto a α -xilosidase II só atua na p-nitrofenil- α -D-xulanopiranosideo. α -xilosidase I possui produção constitutiva, enquanto a α -xilosidase II possui produção da enzima somente quando o fungo é induzido pela xilose (Yoshikawa et al., 1993).

A expressão diferencial do gene α -1,2-L-fucosidase (EC 3.2.1.63) encontrado na família GH95 foi identificada somente nos tratamentos com bagaço de cana de açúcar. α -fucosidases (GH95) são conhecidas pela a hidrólise de resíduos de L-fucose da xiloglucana. Estudos com *A. niger*, *A. nidulans* têm relatado a presença de α -fucosidases na presença da biomassa lignocelulósica (Souza et al., 2011; Saykhedkar et al., 2012).

As enzimas α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) da família GH51, arabinoxilana arabinofuranohidrolase (EC 3.2.1.55) da família GH62, Exoarabinase (EC 3.2.1.-) da família GH93, também tiveram a expressão gênica diferencial identificada nesse estudo. As enzimas α -arabinofuranosidase (GH51) e arabinoxilana arabinofuranohidrolase (GH62) hidrolisam a arabinose-substituída xiloglucana e (arabino-) xilana encontrados na L-arabinose, resíduo comum da hemicelulose e pectina. Duas arabinofuranosidases de *A. niger* uma apresentando atividade específica por ligações α -1,3-ligado à resíduos de arabinose terminal, e a outra por α -1,2-, α -1,3- e α -1,5-ligado à resíduos de arabinose terminal (174 e 34). Arabinoxilana arabinofuranohidrolases atuam especificamente nas ligações α -1,2- ou α -1,3- dos resíduos de L-arabinose da arabinoxilana, mas também atua nas substituições adjacentes de resíduos de D-xilose (Verbruggen et al., 1998). Em conjunto com α -arabinofuranosidase e arabinoxilana arabinofuranohidrolase atua sinergicamente a Exoarabinase (GH93) liberando resíduos de arabinose terminal. Em estudo do proteoma extracelular de *A. nidulans* cultivado em sorgo, foi encontrada uma exoarabinase (GH93) (Saykhedkar et al., 2012).

Resíduos de L-arabinose são indutores da expressão da α -arabinofuranosidase e arabinoxilana arabinofuranohidrolase. Estudo da expressão de duas arabinofuranosidase (*abfA* e *abfB*) indicaram que o L-arabitol é o responsável pela regulação da expressão gênica e indução extracelular de arabinofuranosidase em *A. nidulans* (de Vries et al., 1994). Também foi demonstrado que L-arabinose controla o sistema regulatório da expressão do

gene β -1,4-endogalactanase (*galA*) (GH53) em *A. niger* (de Vries et al., 2002), sugerindo que a regulação da produção dessas enzimas são reguladas pela presença de L-arabinose e L-arabitol.

Enzimas que liberam resíduos de D-galactose, identificadas nesse estudo, são as α -1,4-galactosidases (EC 3.2.1.22) encontradas nas famílias GH27 e 36. α -galactosidase (GH27) possuem atividade α -N-acetilgalactosaminidase, enquanto α -galactosidase (GH36) são ativas contra mono e oligossacarídeos como, melibiose e rafinose (Ademark et al., 2001).

α -glucuronidase (EC 3.2.1.139) da família GH67 também foi identificada pela sua expressão gênica diferencial positiva nos tratamentos com bagaço de cana de açúcar. Essas enzimas liberam resíduos de D-ácido galacturônico da hemicelulose. α -glucuronidase (GH67) possuem especificidade a curtos oligossacarídeos e são encontradas exclusivamente dentro do grupo dos ascomicetos (Chong et al., 2011). α -glucuronidase (água) de *A. niger* revelou a presença de quatro sítios de ligação putativos de *creA* e um sítio para *xlnR* na região do promotor, indicando que *creA* e *xlnR* possuem grande influência na regulação desse gene (de Vries et al., 2002a).

β -1,4-endogalactanase (EC 3.2.1.89) da família GH53 foram identificadas, nesse estudo, na hidrólise de cadeias laterais da galactana presente na pectina. O produto liberado dessa hidrólise inicial por *A. niger* é a D-galactotriose e D-galactotetraose, entretanto incubação prolongada também resulta na liberação de galactobiose e galactose. É conhecido que β -1,4-endogalactanase de *A. niger* age sinergicamente com ramnogalacturonanas de *Aspergillus* (de Vries et al., 2002b).

A enzima α -amilase (EC 3.2.1.1) da família GH13 também foi identificada com expressão diferencial positiva somente nos tratamentos de *A. oryzae* utilizando o bagaço de cana de açúcar como única fonte de carbono. Genes que expressam enzimas amilolíticas são comumente regulados por *AmyR*. *AmyR* é induzido pela presença de maltose, um dissacarídeo presente no amido (Carlsen & Nielsen, 2001). Em *A. oryzae* e *A. nidulans*, *AmyR* mostrou ativar a expressão de glucoamilase, α -amilase e α -glucosidase na presença de amido ou maltose (Petersen et al., 1999). Entretanto, um segundo sistema de indução, diferente do sistema de indução *AmyR*, pode atuar na expressão de enzimas amilolíticas. Entretanto, genes em *A. niger* e *A. oryzae* regulados por *AmyR*, podem ser induzidos em cultivos com baixos níveis de D-glucose, a medida que a sua expressão aumenta durante o período de cultivo. Assim como a D-glucose tem se mostrado agir como repressor, por meio da proteína catabólica repressora de carbono, *CreA*, os níveis de expressão dos genes amilolíticos parecem estarem balanceados entre a indução do *AmyR* e a repressão por *CreA*. (de Vries et al., 2012). de Vries et al. (1999) mostrou efeito similar para D-xilose e o regulador de enzimas xilanolíticas e celulolíticas, *XlnR*, no qual uma alta concentração de D-xilose resultou na redução da expressão de genes xilanolíticos mediada pela repressão do *CreA*.

Outra enzima da família GH identificada com expressão diferencial positiva, presente somente nos tratamentos de *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana de açúcar, é a β -N-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52) da família GH20. Essa enzima possui função de quitinase. Quitinases, além das lipases e peptidases, contribuem no remodelamento da parede celular durante a germinação celular, crescimento e morfogêneses. Enzimas com função de quitinase catalisam a quebra da quitina, um polímero linear encontrado com insetos, crustáceos e parede celular de fungos consistindo de β -1,4-ligado N-acetilglucosamina (Chipman et al., 1967). Análise proteômica de enzimas lignocelulósicas secretadas por *A. nidulans* cultivado em sorgo e *Phanerochate chrysosporium* cultivado em palha de milho, feno, bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo e lascas de madeira, revelaram a presença de quitinases entre as enzimas lignocelulósicas (Saykhedkar et al., 2012; Adav et al., 2012). Estudo da repressão da autólise e conidiogêneses de *Emmericella nidulans* revelou que a repressão mediada por glicose, do fator de transcrição da esporulação (*brlA*), contribuiu para a regulação negativa da conidiogêneses. Embora o repressor *CreA* tenha tido papel importante na regulação da autólise por meio da repressão de genes que codificam hidrolases autolíticas como a quitinase (*ChiB*), a produção da atividade de quitinase também foi afetada negativamente pela regulação negativa da expressão de *brlA* (Emri et al., 2006).

Assim como as quitinases, as lisozimas representam uma classe importante de enzimas que hidrolisam polissacarídeos. A expressão diferencial positiva da lisozima (EC 3.2.1.17) encontradas na família GH24, foi identificada somente nos tratamentos usando o bagaço de cana de açúcar como única fonte de carbono. As lisozimas possuem a função de hidrólise de peptídeoglucanos presente na parede celular de bactérias, hidrolisando ligações β -1,4-ligado a resíduos de ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina (Chipman et al., 1967). A semelhança química entre os dois substratos de quitina e lisozima, levam ao fato que algumas lisozimas podem também hidrolisar a quitina, porém menos eficiente que a hidrólise com seu substrato natural. Entretanto, ambas as enzimas não apresentam similaridades entre as suas sequências de aminoácido (Wohlkonig et al., 2010).

Para degradação completa da hemicelulose, todas as substituições na cadeia principal da hemicelulose devem ser liberadas. Esse processo envolve além da atividade de enzimas das famílias GH, atividade de enzimas das famílias CE. Genes das famílias CE1 e 8 tiveram seu nível de expressão aumentado em mais de 13 vezes nos tratamentos LB36, SB48 e SB36 em comparação com os tratamentos LG36, SG48 e SG36. Genes pertencentes as famílias CE12 e CE16 também apresentaram expressão aumentada em mais de 5 vezes nos tratamentos com bagaço de cana. Essas famílias CE1, 12 são conhecidas por codificarem enzimas como as acetilxilana esterases (EC 3.1.1.72). Assim como genes da família CE16 com função predita à acetilesterases (EC 3.1.1.6). Genes da família CE8 possuem atividades de pectina metilesterases (EC 3.1.1.11).

Acetilxilana esterases são conhecidas por hidrolisarem o acetil da xilose O-2 ou O-3 da cadeia principal da xilana. A acetilxilana esterase, pertencente ao grupo de enzimas

acessórias, é muito ativa em substratos poliméricos e importante para a degradação eficiente da cadeia principal da xilana pelas endoxilanases. Acetilxilana esterase de *A. niger* possui forte ação sinérgica com as endoxilanases I, II e III, resultando no aumento da liberação de xilose, quando sob lascas de madeira pré-tratada (Kormelink et al., 1993). Acetilesterases estão ativas em diversos carboidratos acetil ésteres. As pectinas acetilesterases liberam resíduos de acetil de regiões lisas da cadeia de pectina, agindo sinergicamente com pectinas metiltransferases e pectinas liase. Outra enzima acetilesterase é a ramnogalacturonana acetilesterase (de Vries, 2001).

A degradação completa da pectina envolve duas classes de enzimas pertencentes às famílias GH e PL. Nesse estudo, foram identificados três famílias de polissacarídeo liases com expressão aumentada em mais de 5 vezes nos tratamentos de *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar. As famílias CAZy identificadas foram a PL1, a pectina liase (EC 4.2.2.10) e a PL1, 3 e 9 de pectato liase (EC 4.2.2.2). A pectina e o pectato liases ambos liberam resíduos de D-ácido galacturônico de dentro de regiões menos densas da pectina. Apesar de liberarem o mesmo resíduo, ambas as liases apresentam diferenças importantes em seus sítios ativos. A pectina liase atua preferencialmente em substratos com altos níveis de metil esterificação e possui pH ótimo alcalino (pH5,5). Já o pectato liase atua em substratos com baixo nível de esterificação e possui pH ótimo básico (pH8,5) (Mayans et al., 1997).

6.3.2 Fatores de transcrição e controle da expressão gênica em fungos

Fatores de transcrição (TFs) são conhecidos por estarem envolvidos nas vias de transdução de sinais, como uma ligação final entre o fluxo de um sinal e a expressão do gene alvo. Relativamente, pouco se conhece sobre os TFs de fungos, com os bancos de dados como, TRANSFAC (Wingender et al., 2000) e MycoPath (<http://www.biobase-international.com/pages/>) mostrando que os seus números são reduzidos em TFs de fungos em comparação aos eucariotos superiores. Shelest (2008), sugere que essa baixa abundância pode indicar tanto a visão de que a complexidade crescente dos organismo requer TFs (Amoutzias et al., 2007), ou que os TFs de fungos ainda não foram elucidados. Identificação computacional de TFs é normalmente realizada por comparações pareadas como, alinhamentos e análises BLAST, ou usando abordagens de modelo como, Hidden Markov Model (HMMs) e modelos baseado em alinhamento do domínio (Wilson et al., 2008).

Em *Aspergillus*, um fator transcricional importante é o *XlnR*. Inicialmente identificado como um fator de transcrição de genes xilanolíticos de *Aspergillus niger*, regula a produção de diversas enzimas xilanolíticas e celulolíticas como as endoglucanases e celobiohidrolases (Noguchi et al., 2009). Em *A. oryzae*, genes que codificam a endoxilanase, *xynF1*, *xynG1* e *xynG2*, o gene da β -xilosidase, *xyIA*, genes da endoglucanase, *celA* e *celB*, e genes da celobiohidrolase *celC* e *celD*, são controlados pelo *XlnR* (Marui et al., 2002). Apesar da *celA* (AO090026000102), *celB* (AO090010000314), *celD* (AO090012000941), *xyIA*

(AO090005000986), *xynG1* (AO090001000111), *xynG2* (AO090120000026) e *xynF1* (AO090103000423) apresentarem níveis de expressão elevado, acima de 10 vezes, em comparações entre tratamentos com bagaço e com glicose, os níveis de expressão do gene *xlnR* não foi significativo.

Shelest (2008) reportou a presença de 12 super famílias de domínios de ligação-DNA e 37 domínios PFAM de ligação-DNA de fungos, com base em buscas na literatura e análise da base de dados DBD, que contém sequências específicas de TFs ligação-DNA para todos os proteomas de domínio público (Wilson et al., 2008). Foram identificadas domínios TF de ligação-DNA de famílias PFAM composta por: domínio *APSES* (PF02292), *bZIP TF 1* (PF00170), *Basic region leucine zipper 2* (PF07716), *TFIIH C1-like domain* (PF07975), *CCAAT-binding TF (CBF-B/NF-YA) subunit B* (PF02045), *CP2 TF* (PF04516), *DDT domain* (PF02791), *Putative FMN-binding domain* (PF04299), *Fork head domain* (PF00250), *Fungal-specific TF domain* (PF04082), *Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain* (PF00172), *GATA zinc finger* (PF00320), *GRF zinc finger* (PF06839), *Helix-loop-helix DNA-binding domain* (PF00010), *Homeobox domain* (PF00046), *HSF-type DNA-binding* (PF00447), *Helix-turn-helix* (PF01381), *Bacterial regulatory HTH proteins, AraC family* (PF00165), *Helix-turn-helix, Psq domain* (PF05225), *Mating-type protein MAT α 1* (PF04769), *MIZ zinc finger* (PF02891), *Myb-like DNA-binding domain* (PF00249), *NDT80/PhoG-like DNA-binding family* (PF05224), *NF-X1-type zinc finger* (PF01422), *CCR4-Not complex component, Not1* (PF04054), *PAS fold* (PF00989), *RFX DNA-binding domain* (PF02257), *SART-1 family* (PF03343), *SGT1 protein* (PF07093), *SRF-type TF (DNA-binding and dimerization domain)* (PF00319), *STE-like TF* (PF02200), *TEA/ATTS domain family* (PF01285), *YL1 nuclear protein* (PF05764), *BED zinc finger* (PF02892), *Zinc finger, C2H2 type* (PF00096), *Zinc finger, C5HC2 type* (PF02928) e *Zinc knuckle* (PF00098).

As doze super famílias de proteínas de ligação-DNA de fungos compreende *C2H2* e *C2HC zinc fingers* (Superfamily ID 57667), *DNA-binding domain of Mlu1-box-binding protein MBP1* (54616), *Glucocorticoid receptor-like (DNA-binding domain)* (57716), *Helix-loop-helix DNA-binding domain* (47459), *Homeodomain-like* (46689), *Lambda repressor-like NA-binding domains* (47413), *Nucleic acid-binding proteins* (50249), *p53-like TFs* (49417), *SRF-like* (55455), *Winged helix DNA-binding domain* (46785), *Zinc domain TFs* conservado em leveduras reguladas por cobre (57879), e *Zn2/Cys6 DNA-binding domain* (57701).

A partir desses achados, um número de domínios específicos de fungos foram identificados, sendo o mais abundante deles a super família 57701 (PFAM 00172) do grupo de zinco. Essa classe é multifuncional, envolvida no metabolismo de açúcar e aminoácidos, gliconeogêneses, respiração, síntese de vitaminas, ciclo celular, remodelagem da cromatina, utilização de nitrogênio, proliferação do peroxissomo, resposta pleiotrópica a drogas e resposta a estresse (MacPherson et al., 2006). O domínio do fator de transcrição específico de fungos (PF04082) também é abundante, com atividade multifuncional no metabolismo de açúcar, metabolismo de amino ácidos, gliconeogêneses, repiração, catabolismo de ácidos graxos, assimilação de nitratos, entre outros (Shelest, 2008). Trabalhos anteriores têm

descrito o envolvimento do fator de transcrição conservado XlnR/XYR1 na regulação da expressão de celulases e hemicelulases em *Aspergilli* e *Hypocrea jecorina* (Gielkens et al., 1999; Stricker et al., 2008; van Peoj et al., 1998). Coradetti et al. (2012) também identificou recentemente dois fatores de transcrição (clr-1 and clr-2) em *Neurospora crassa* que são necessários para a degradação da celulose, com homólogos presentes em outras espécies de ascomicetos, que são conhecidos por serem degradadores da parede celular de planta.

Os processos de produção de biocombustível celulósico são encarados como um gargalo no processo de hidrólise da celulose em glicose. Com ação sinérgica das celulases e um repertório de outras enzimas, os polissacarídeos da parede celular das plantas são degradados. As celulases de fungos tendem a serem amplamente aplicadas nos futuros métodos de produção de biocombustíveis de segunda geração. Um entendimento dos mecanismos regulatórios envolvidos, também é fundamental para o aumento da especificidade e produtividade enzimática (Coradetti et al., 2012). A caracterização e análise baseada na expressão de TFs induzida pela lignocelulose pelo *A. oryzae* BLU37 contribui para o entendimento da complexa rede de ativadores transcricionais envolvidos nas atividades enzimáticas da celulose e hemicelulose em fungos.

7 CONCLUSÃO

Atualmente os fungos são a principal fonte de enzimas hidrolíticas para conversão, em escala industrial, de resíduos lignocelulolíticos em açúcares fermentáveis usados na produção de biocombustível de segunda geração. As celulasas e hemicelulasas mais estudadas e utilizadas são aquelas de espécies fúngicas dentro do Genero *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*. O objetivo principal desse estudo foi examinar o transcrito do isolado *A. oryzae* BLU37, um fungo originalmente isolado de resíduos agroindustriais e previamente caracterizado como um candidato promissor para produção de enzimas hidrolíticas em fontes lignocelulósicas. A abordagem de sequenciamento de próxima geração RNA-Seq Illumina foi apropriada não somente para confirmação dos modelos de genes na sequência genômica completo de *A. oryzae* RIB40, como também para permitir um alta cobertura para análise acurada da expressão gênica diferencial. Mapeamento dos dados das sequências expressas no genoma completo também permite a identificação de pontos de começo e fim da transcrição, novos genes e exons, e padrões de splicing alternativo.

Em termos de análise da expressão gênica, além da caracterização de genes que codificam enzimas hidrolíticas, e em conjunto com informações da expressão diferencial quando cultivado em diferentes fontes de carbono, essa análise transcritômica global também permitiu a identificação da expressão de TFs induzidos ou reprimidos pela lignocelulose em *A. oryzae* BLU37. A hidrólise de lignocelulose em açúcares fermentáveis é atualmente visto como um gargalo no processo de produção de biocombustível de segunda geração. Atualmente, a regulação da expressão de enzimas celolíticas e hemicelulolíticas em fungos filamentosos é apenas parcialmente entendida. Um aumento no nosso conhecimento de mecanismos regulatórios envolvidos é fundamental para modificar a especificidade e produtividade de enzimas. A caracterização de TFs em *A. oryzae* BLU37 contribui para o nosso entendimento da rede de ativadores transcricionais envolvidos na atividade de enzimas celulósicas e hemicelulósicas nesse fungo. Esse estudo também contribui para o entendimento da complexidade do transcrito de *A. oryzae*, a fundamental importância para a aplicação, a longo prazo, desse fungo no desenvolvimento de biocombustíveis de segunda geração.

8 TRABALHOS EM ANDAMENTO E PERSPECTIVAS

Visando o alcance do objetivo final desse projeto, análises de categorização funcional para cada gene diferencialmente expresso, classificando de acordo com os termos GO dentro das funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares entre os tratamentos de *A. oryzae* BLU37 cultivado em culturas líquida e semi-sólida com bagaço de cana-de-açúcar e glicose por 36h e 48h, estão em andamento. Análises bioinformática quanto a interação e comportamento de potenciais genes celulolíticos e hemicelulolíticos em vias metabólicas KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) serão realizadas, assim como a seleção de gene celulolíticos e hemicelulolíticos para o desenho de *primers* específicos e a validação desse estudo por qRT-PCR. Após a identificação de genes promissores para a depolimerização da biomassa vegetal, construtos de levedura (*saccharomyces cerevisiae*) serão realizados com o objetivo de otimizar a fermentação nos processos de bioconversão do etanol. O conhecimento funcional de genes e vias regulatórias de *A. oryzae* envolvidos na degradação de resíduos agroindustriais como o bagaço da cana-de-açúcar, poderão contribuir para o avanço industrial por meio de novas linhagens de leveduras capazes de catalisar a hidrólise da parede celular vegetal e fermentar o açúcar liberado.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABE, K., GOMI, K., HASEGAWA, F., MACHIDA, M. 2006. Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopathologia*. 162(3): 143-53.
2. ADEN A, RUTH M, IBSEN K, JECHURA J, NEEVES K, et al. 2002. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. NREL/TP-510-32438.
3. AGBOR, V. B., CICEK, N., SPARLING, R., BERLIN, A., LEVIN, D. B. 2011. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology advance*. 29(6): 675-85.
4. AMOUTZIAS, G.D., VERON, A.S., WEINER, J., ROBINSON-RECHAVI, M., BORNBERG-BAUER, E., OLIVER, S.G., ROBERTSON, D.L. 2007. One billion years of bZIP transcription factor evolution: conservation and change in dimerization and DNA-binding site specificity. *Molecular biology and evolution*. 24: 827-835.
5. ANDERSEN, M.R., VONGSANGNAK, W., PANAGIOTOU, G., MARGARITA, P.S., LEHMANN, L., AND NIELSEN, J. 2008. A trispecies *Aspergillus* microarray advancing comparative transcriptomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105: 4387-4392.
6. ANGEL SILES LOPEZ, J., LI, Q., THOMPSON, I.P. 2010. Biorefinery of waste orange peel. *Critical reviews in biotechnology*. 30(1):63-69.
7. ARONESTY E. 2011. ea-utils: "Command-line tools for processing biological sequencing data"; <http://code.google.com/p/ea-utils>
8. Available from: <http://www.distill.com/worldethanolproduction.htm>; 2001.
9. AVGERINOS, G.C., WANG, D.I.C. 1983. Selective delignification for fermentation of enhancement. *Biotechnology Bioengineering*. 25:67-83.
10. BANERJEE, G., SCOTT-CRAIG, J.S., WALTON, J.D. 2010. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. *Bioenergy Research*. 3:82-92.
11. BATTAGLIA, E., BENOIT, I., VAN DEN BRINK, J., WIEBENGA, A., COUTINHO, P.M., HENRISSAT, B., DE VRIES, R.P. 2011. Carbohydrate-active enzymes from the zygomycete fungus *Rhizopus oryzae*: a highly specialized approach to carbohydrate degradation depicted at genome level. *BMC Genomics*. 12:38.
12. BERG, C. 2008. World bioethanol production, the distillery and bioethanol network. Brazilian Ministry of Agriculture, Sugarcane and Agroenergy, 2008. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Cana-de-Açúcar e Agroenergia-MAPA. See also: <www.agricultura.gov.br>.
13. BERKA, R. M., GRIGORIEV, I. V., OTILLAR, R., SALAMOV, A., GRIMWOOD, J., REID, I., ISHMAEL, N., et al. 2011. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nature biotechnology*. 29(10): 922-7.
14. BOHLE, K., JUNGEBLAUD, A, GÖCKE, Y., DALPIAZ, A, CORDES, C., HORN, H., & HEMPEL, D. C. 2007. Selection of reference genes for normalisation of specific gene quantification data of *Aspergillus niger*. *Journal of biotechnology*. 132(4): 353-8.
15. BRINK, J. V. D., VRIES, R. P. D. 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology*. 1477-1492.
16. BUCKERIDGE, M. S. & DE SOUZA, A. P. 2014. Breaking the "Glycomic Code" of Cell Wall Polysaccharides May Improve Second-Generation Bioenergy Production from Biomass. *BioEnergy Research*, 7(4), 1065-1073.
17. CERQUEIRA LEITE, R.C., LEAL, M.R.L.V.L., CORTEZ, L.A.B., GRIFFIN, W.M., SCANDIFFIO, M.I.G., 2009. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? *Energy*. 34: 655-661.
18. CHAMALAUN-HUSSEY, N. (1996). Characterization of DNA-binding by the CreA protein of *Aspergillus nidulans*. PhD thesis, The university of Adelaide, Department of Genetics.
19. CHANDEL AK, CHAN E, RUDRAVARAM R, NARASU ML, RAO LV, RAVINDRA P. 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and molecular biology reviews*. 2:14e32.
20. CHOW, T. H. C., SOLLITTI, P., MARMUR, J. 1989. Structure of the multigene family of Mal loci in *Saccharomyces*. *Molecular & General Genetics*. 217: 60-69.
21. CONESA, A., GOTZ, S., GARCIA-GOMEZ, J.M., TEROL, J., TALON, M., ROBLES, M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. 21:3674-3676.

22. CORADETTI, S.T., CRAIG, J.P., XIONG, Y., SHOCK, T., TIAN, C., GLASS, N.L. 2012. Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi. *PNAS* 109: 7397-7402.
23. CORTEZ, L.A.B., LORA, E.E.S., GÓMEZ, E.O., 2008. *Biomassa para Bioenergia*. UNICAMP, Campinas.
24. COUTINHO, P.M., ANDERSEN, M.R., KOLENOVA, K., VANKUYK, P.A., BENOIT, I., GRUBEN, B.S., TREJO-AGUILAR, B., VISSER, H., VAN SOLINGEN, P., PAKULA, T., SEIBOTH, B., BATTAGLIA, E., AGUILAR-OSORIO, G., DE JONG, J.F., OHM, R.A., AGUILAR, M., HENRISSAT, B., NIELSEN, J., STALBRAND, H., DE VRIES, R.P. 2009 Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal genetics and biology*.46 (Suppl 1):S161–S169.
25. CUBERO, B.; SCAZZOCCHIO, C. 1994. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CRE-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO Journal*. 13: 407–415.
26. DASHTBAN, M., SCHRAFT, H., QUIN, W. 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. *International journal of sciences*. 5: 578-595.
27. DELMAS, S., PULLAN, S.T., GADDIPATI, S., KOKOLSKI, M., MALLA, S., BLYTHE, M.J., IBBETT, R., CAMPBELL, M., LIDDELL, S., ABOOBAKER, A., TUCKER, G.A., ARCHER, D.B. 2012. Uncovering the genome-wide transcriptional responses of the filamentous fungus *Aspergillus niger* to lignocellulose using RNA sequencing. 1. *PLoS Genetics*. 8(8):e1002875.
28. DIAS, F.M., VINCENT, F., PELL, G., PRATES, J.A., CENTENO, M.S., TAILFORD, L.E., FERREIRA, L.M., FONTES, C.M., DAVIES, G.J., GILBERT, H.J. 2004. Insights into the molecular determinants of substrate specificity in glycoside hydrolase family 5 revealed by the crystal structure and kinetics of *Cellvibrio mixtus* mannosidase 5A. *The Journal Biological Chemistry*. 279(24):25517–25526.
29. DUARTE, G., MOREIRA, L., GÓMEZ-MENDOZA, D., SIQUEIRA, F. G. D., BATISTA, L., AMARAL, L., RICART, C., et al. 2012. Use of Residual Biomass from the Textile Industry as Carbon Source for Production of a Low-Molecular-Weight Xylanase from *Aspergillus oryzae*. *Applied Sciences*. 2(4): 754-772.
30. FRISVAD, J.C., SKOUBOE, P., SAMSON, R.A. 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp.nov. *Systematic and Applied Microbiology*. 28: 442–453.
31. GÁMEZ, S., GONZÁLEZ-CABRIALES, J.J., RAMÍREZ, J.A., GARROTE, G., 2006. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of food engineering*. 74: 78–88.
32. Gene Ontology Consortium. 2008. The Gene Ontology project in 2008. *Nucleic Acids Research*. 36: D440-444.
33. GIELKENS, M. 1999. A molecular analysis of (hemi)-cellulose degradation by *Aspergilli*. Ph.D. thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
34. GIELKENS, M.M., DEKKERS, E., VISSER, J., DE GRAAFF, L.H. 1999. Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. *Applied and environmental microbiology*. 65:4340–4345.
35. GODET, M., MUNAUT, F. 2010. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. *FEMS microbiology letters*. 304(2): 157-68.
36. GOLDEMBERG, J., 2007. Ethanol for a sustainable energy future. *Science*. 315: 808–810.
37. HAMELINCK, C.N., HOOIJDONK, G., FAAIJ, A.P.C. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenerg*. 28:384e410.
38. HENDRICKS, A.T., ZEEMAN, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*. 100:10–8.
39. JACOBSEN, S.E., WYMAN, C.E., 2002. Xylose monomer and oligomer yields for uncatalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose at varying solids concentration. *Industrial & engineering chemistry research*. 41: 1454–1461.
40. Joint FAO/WHO Committee on Food Additives (JEC- FA), 1989. Specifications for identity and purity of certain food additives. JECFA 35th session. Rome.

41. JORGENSEN, H., VIBE-PEDERSEN, J., LARSEN, J., FELBY, C. 2007. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnology Bioengineering*. 96(5):862–870.
42. KHANAL, S.K. 2008. *Anaerobic biotechnology for bioenergy production. Principles and Application* Willey and Blackwell. 161–86.
43. KIM, S., DALE, B.E. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*. 26:361e75.
44. KLICH, M.A., 2002. *Identification of Common Aspergillus Species*. Centraalbureau voor Schimmelcultuur, The Netherlands.
45. KUMEDA, Y., ASAO, T. 1996. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 2947–2952.
46. KUNJETI, S.G., EVANS, T.A., MARSH, A.G., GREGORY, N.F., KUNJETI, S., MEYERS, B.C., KALAVACHARLA, V.S., DONOFRIO, N.M. 2012. RNA-Seq reveals infection-related global gene changes in *Phytophthora phaseoli*, the causal agent of lima bean downy mildew. *Molecular Plant Pathology*.13(5):454-66.
47. LI R, YU C, LI Y, LAM TW, YIU SM, KRISTIANSSEN K, WANG J: SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics* 2009, 25:1966-1967.
48. Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 449-467. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.pecs.2012.03.002
49. LÓPEZ-ERRASQUÍN, E., VÁZQUEZ, C., JIMÉNEZ, M., & GONZÁLEZ-JAÉN, M. T. (2007). Real-Time RT-PCR assay to quantify the expression of *fum1* and *fum19* genes from the Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of microbiological methods*, 68(2), 312–7. doi:10.1016/j.mimet.2006.09.007.
50. LYND, L.R., WEIMER, P.J., ZYL, W.H.V., PRETORIUS, I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*.66:506–77.
51. MACHIDA, M. 2002. Progress of *Aspergillus oryzae* genomics. *Advances in applied microbiology*. 51: 81–106.
52. MACHIDA, M., ASAI, K., SANO, M., TANAKA, T., KUMAGAI, T., TERAJ, G., KUSUMOTO, K.-I., et al. 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*. 438(7071): 1157-61.
53. MACHIDA, M., ASAI, K., SANOM, TANAKA, T., KUMAGAI, T., TERAJ, G., KUSUMOTO, K., ARIMA, T., AKITA, O., KASHIWAGI, Y., ABE, K., GOMIK, HORIUCHI, H., KITAMOTO, K., KOBAYASHI, T., TAKEUCHI, M., DENNING, D.W., GALAGAN, J.E., NIERMAN, W.C., YU, J., ARCHER, D.B., BENNETT, J.W., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T.E., FEDOROVA, N.D., GOTOH, O., HORIKAWA, H., HOSOYAMA, A., ICHINOMIYA, M., IGARASHI, R., IWASHITA, K., JUVVADI, P.R., KATO, M., KATO, Y., KIN, T., KOKUBUN, A., MAEDA, H., MAEYAMA, N., MARUYAMA, J., NAGASAKI, H., NAKAJIMA, T., ODA, K., OKADA, K., PAULSEN, I., SAKAMOTO, K., SAWANO, T., TAKAHASHI, M., TAKASE, K., TERABAYASHI, Y., WORTMAN, J.R., YAMADA, O., YAMAGATA, Y., ANAZAWA, H., HATA, Y., KOIDE, Y., KOMORI, T., KOYAMA, Y., MINETOKI, T., SUHARNAN, S., TANAKA, A., ISONO, K., KUHARA, S., OGASAWARAN, KIKUCHIH. 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*. 428: 1157–1161.
54. MACPHERSON, S., LAROCHELLE, M., TURCOTTE, B. 2006. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*. 70: 583–604.
55. MAEDA H, SANO M, MARUYAMA Y, TANNO T, AKAO T, TOTSUKA Y, ENDO M, SAKURADA R, YAMAGATA Y, MACHIDA M, AKITA O, HASEGAWA F, ABE K, GOMI K, NAKAJIMA T, IGUCHI Y. 2004. Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence Tags (ESTs). *Applied Microbiology Biotechnology*. 65: 74–83.
56. MAEDA, H., SANO, M., MARUYAMA, Y., TANNO, T., AKAO, T., TOTSUKA, Y., ENDO, M., et al. 2004. Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. *Applied microbiology and biotechnology*. 65(1), 74-83.

57. MCKELVEY, S. M., MURPHY, R. 2010. Analysis of wide-domain transcriptional regulation in solid-state cultures of *Aspergillus oryzae*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 37(5), 455-69.
58. MORTAZAVI, A., WILLIAMS, B.A., MCCUE, K., SCHAEFFER, L., WOLD, B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*. 5:621–628.
59. MU, D., SEAGER, T., SURESH, R.A.O. P., ZHAO, F. 2010. Comparative life cycle assessment of lignocellulosic ethanol production: biochemical versus thermochemical conversion. *Environmental management*. 46:565e78.
60. OSHLACK, A., ROBINSON, M.D., YOUNG, M.D. 2010. From RNA-seq reads to differential expression results. *Genome Biology*. 11: 220.
61. PÉREZ, J., MUÑOZ-DORADO, J., DE LA RUBIA, T., MARTÍNEZ, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*. 5: 53-63.
62. PILDAIN, M.B., FRISVAD, J.C., VAAMONDE, G., CABRAL, D., VARGA, J., SAMSON, R.A. 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 725–735.
63. PINTO, A.C.T. 2012. Caracterização do secretoma de *Aspergillus oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília.
64. PITT, J.I., HOCKING, A.D. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Chapman and Hall, Cambridge.
65. PORTNOY, T.; MARGEOT, A.; LINKE, R.; ATANASOVA, L.; FEKETE, E.; SÁNDOR, E.; HARTL, L.; KARAFFA, L.; DRUZHININA, I.S.; SEIBOTH, B.; et al. 2011. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: A master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics*. 12: 269.
66. REMARKS, C., READING, F. 1997. *Aspergillus oryzae*. *Food Microbiology*.
67. RIBEIRO, S. G., LOHUIS, H., GOLDBACH, R., PRINS, M. 2007. Tomato Chlorotic Mottle Virus Is a Target of RNA Silencing but the Presence of Specific Short Interfering RNAs Does Not Guarantee Resistance in Transgenic Plants. 81(4): 1563-1573.
68. RIDLEY, B.L., O'NEILL, M.A., MOHNEN, D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 57(6):929–967.
69. SALAZAR, M., VONGSANGNAK, W., PANAGIOTOU, G., ANDERSEN, M.R., AND NIELSEN, J. 2009. Uncovering transcriptional regulation of glycerol metabolism in *Aspergilli* through genome-wide gene expression data analysis. *Molecular Genetics Genomics*. 282:571–586.
70. SARKAR, N., GHOSH, S. K., BANNERJEE, S., & AIKAT, K. 2012. Bioethanol production from agricultural wastes : An overview. *Renewable Energy*. 37(1): 19-27.
71. SCHELLER, H.V., ULVSKOV, P. 2010. Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*. 61:263–289.
72. SCHROEDER, A., MUELLER, O., STOCKER, S., SALOWSKY, R., LEIBER, M., GASSMANN, M., LIGHTFOOT, S., MENZEL, W., GRANZOW, M., RAGG, T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7:3.
73. SHELEST, E. 2008. Transcription factors in fungi. *FEMS microbiology letters*. 286: 145-51.
74. SIQUEIRA, FÉLIX GONÇALVES DE. 2010. Resíduos agroindustriais com potencial para a produção de holocelulases de origem fúngica e aplicações biotecnológicas de hidrolases. Tese (doutorado), Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular.
75. SOCCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. D. S., MEDEIROS, A. B. P., KARP, S. G., BUCKERIDGE, M., RAMOS, L. P., PITARELO, A. P., et al. 2010. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource technology*, 101(13): 4820-5.
76. STRICKER, A. R., MACH, R. L., GRAAFF, L. H. D. 2008. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases- encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Applied Microbiology*, 211-220.
77. STRICKER, A.R., MACH, R.L., DE GRAAFF, L.H. 2008. Regulation of transcription of cellulases and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Applied Microbiology Biotechnology*. 78:211–220.
78. SUANTHIE, Y., COUSIN, M. A., WOLOSHUK, C. P. 2009. Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Journal of Stored Products Research*. 45(2), 139–145.

79. SUN, Y., CHENG, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*. 83:1e11.
80. TAHERZADEH, M.J., KARIMI, K. 2007. Acid based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*. 2(3):472e99.
81. TAIZ, LINCOLN; ZEIGER, EDUARDO. 2010. *Plant Physiology*; Fifth edition.
82. TAMANO, K., SANO, M., YAMANE, N., TERABAYASHI, Y., TODA, T., SUNAGAWA, M., KOIKE, H., et al. 2008. Transcriptional regulation of genes on the non-syntenic blocks of *Aspergillus oryzae* and its functional relationship to solid-state cultivation. *Fungal genetics and biology : Fungal Genetics and Biology*. 45(2): 139-51.
83. TRAPNELL, C., PACHTER, L., SALZBERG, S.L. 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*. 25:1105-1111.
84. TRAPNELL, C., WILLIAMS, B.A., PERTEA, G., MORTAZAVI, A., KWAN, G., VAN BAREN, M.J., SALZBERG, S.L., WOLD, B.J., PACHTER, L. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature biotechnology*. 28:511-515.
85. VAN PEIJ, N.N., GIELKENS, M.M., DE VRIES, R.P., VISSER, J., DE GRAAFF, L.H. 1998. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Applied Environmental Microbiology* 64:3615–3619.
86. VONGSANGNAK, W., NOOKAEW, I., SALAZAR, M., & NIELSEN, J. 2010. Analysis of genome-wide coexpression and coevolution of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *Omics : a journal of integrative biology*. 14(2):165-75.
87. VONGSANGNAK, W., OLSEN, P., HANSEN, H., KROGSGAARD, S. & NIELSEN, J. 2008. Improved annotation through genome-scale metabolic modeling of *Aspergillus oryzae*. *BMC Genomics*. 9: 245.
88. WANG, B., GUO, G., WANG, C., LIN, Y., WANG, X., ZHAO, M., GUO, Y., et al. 2010. Survey of the transcriptome of *Aspergillus oryzae* via massively parallel mRNA sequencing. *Nucleic acids research*. 38(15): 5075-87.
89. WANG, Z., GERSTEIN, M., SNYDER, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews Genetics*. 10: 57–63.
90. WINGENDER, E., CHEN, X., HEHL, R., KARAS, H., LIEBICH, I., MATYS, V., MEINHARDT, T., PRUSS, M., REUTER, I., SCHACHERER, F. 2000. TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Research*. 28: 316–319.
91. WONG, D. 2008. Enzymatic deconstruction of backbone structures of the ramified regions in pectins. *Protein Journal*. 27(1):30–42.
92. WYMAN, C.E. 2007. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends Biotechnology*. 25: 153–157.
93. XU, H., GAO, Y., & WANG, J. 2012. Transcriptomic analysis of rice (*Oryza sativa*) developing embryos using the RNA-Seq technique. *PloS one*. 7(2): e30646.
94. YU, J., FEDOROVA, N. D., MONTALBANO, B. G., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T. E., BENNETT, J. W., & NIERMAN, W. C. 2011. Tight control of mycotoxin biosynthesis gene expression in *Aspergillus flavus* by temperature as revealed by RNA-Seq. *FEMS microbiology letters*. 322(2), 145-9.
95. YU, J., PROCTOR, R.H., BROWN, D.W., ABE, K., GOMI, K., MACHIDA, M., HASEGAWA, F., NIERMAN, W.C., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T.E. 2004. Genomics of economically significant *Aspergillus* and *Fusarium* species. In *Applied Microbiology Biotechnology, An International Series, Vol. 4, Fungal Genomics*.: 249–283.
96. ZHANG, Y.I.P., LYND, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. *Biotechnology Bioengineering*. 88, 797–824.

10 ANEXOS

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results 						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Aspergillus tamarii strain ATL GRD119 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	1059	1059	100%	0.0	100%	JX110981.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus tamarii culture-collection NRRL:427 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	1059	1059	100%	0.0	100%	HQ340111.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus tamarii 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), culture collection CCF-CZE>:107	1059	1059	100%	0.0	100%	FR733817.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus tamarii strain SRRC 1088 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	1059	1059	100%	0.0	100%	AY373870.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus tamarii strain UWFP.534 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	1059	1059	100%	0.0	100%	AY213635.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus tamarii isolate A4S3_D1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	1053	1053	100%	0.0	99%	JX501411.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus tamarii 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spa	1053	1053	100%	0.0	99%	JF901808.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus tamarii 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), culture collection CCF-CZE>:1602	1051	1051	100%	0.0	99%	FR733819.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone cldi1r1004_C08 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed s	1048	1048	100%	0.0	99%	JN660479.1
<input type="checkbox"/> Fungal sp. FD-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spac	1042	1042	100%	0.0	99%	HM101049.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus pseudotamarii strain SK53 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	1042	1042	100%	0.0	99%	DQ467987.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus pseudotamarii strain KY38 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	1042	1042	100%	0.0	99%	DQ467986.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus pseudotamarii strain 443 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	1042	1042	100%	0.0	99%	DQ467983.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus pseudotamarii strain SK16 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	1042	1042	100%	0.0	99%	DQ467984.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus tamarii isolate UPM A16 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	1037	1037	100%	0.0	99%	HM116372.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus pseudotamarii strain TK31 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	1031	1031	100%	0.0	99%	DQ467985.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus tamarii strain UFGD_BI09 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	1016	1016	100%	0.0	99%	JX501757.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus parasiticus strain A-3352 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	1005	1005	100%	0.0	98%	JQ318518.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus aff. parasiticus A20 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	1005	1005	100%	0.0	98%	JN246089.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus parasiticus culture-collection NRRL:3386 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	1005	1005	100%	0.0	98%	HQ340110.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus sp. 1 PR-2010 culture-collection MUM:10.205 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	1005	1005	100%	0.0	98%	HQ340105.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus parasiticus culture-collection MUM:10.201 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RN	1005	1005	100%	0.0	98%	HQ340102.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus oryzae strain KCCM60241 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	1005	1005	100%	0.0	98%	HQ285609.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus parasiticus strain NRRL 502 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and in	1005	1005	100%	0.0	98%	AY373859.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus sojae strain ATCC 14895 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	1005	1005	100%	0.0	98%	AY373867.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus sojae strain KCCM60354 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	1002	1002	100%	0.0	98%	HQ285620.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus parasiticus strain KCCM35079 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and	1002	1002	100%	0.0	98%	HQ285604.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus nomius culture-collection UOAH/CPF+GRC>:12657 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos	987	987	100%	0.0	98%	KC253960.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus nomius strain KS2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	987	987	100%	0.0	98%	DQ467992.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus nomius strain KS10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	987	987	100%	0.0	98%	DQ467991.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus flavus strain PTN-25 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	983	983	100%	0.0	98%	KF589305.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus flavus strain F52 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trans	983	983	100%	0.0	98%	KF574925.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus oryzae strain 13/5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	983	983	100%	0.0	98%	KF154416.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus oryzae strain 13/6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	983	983	100%	0.0	98%	KF154415.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus flavus strain PW2954 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal:	983	983	100%	0.0	98%	KF562197.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus flavus strain PW2952 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal:	983	983	100%	0.0	98%	KF562195.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus parvisclerotigenus strain AfC36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	983	983	100%	0.0	98%	KC964102.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus parvisclerotigenus strain AfC35 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	983	983	100%	0.0	98%	KC964101.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus flavus strain IHB F 1218 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	983	983	100%	0.0	98%	KF475897.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus flavus strain MGK1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	983	983	100%	0.0	98%	KC911645.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus flavus strain F-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trans	983	983	100%	0.0	98%	KC146411.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus flavus strain NRRL 62477 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	983	983	100%	0.0	98%	JX292092.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus oryzae strain FUJX 001 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	983	983	100%	0.0	98%	JX878609.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus flavus strain SGE22 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	983	983	100%	0.0	98%	JX232269.1

Trabalho apresentado no V Congresso Brasileiro de Biotecnologia, realizado no Guarujá-SP, nos dias 28 de outubro a 1 de novembro de 2012.

Analysis of the *Aspergillus oryzae* transcriptome in relation to enzymatic degradation of sugarcane bagasse

Midorikawa GEO¹, Noronha EF¹, Ferreira Filho EX¹, Togawa RC², Silva Jr O², Miller RNG¹

¹*Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília, DF, Brasil*

²*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte, Brasília, DF, Brasil*

Fungi are an important source of hydrolytic enzymes for industrial scale-based conversion of lignocellulose residues to fermentable sugars for application in second generation biofuel production. The principal objective of our study was to examine the transcriptome in *Aspergillus oryzae* BLU37, a promising fungal strain for hydrolytic enzyme production on lignocellulose sources. *A. oryzae* spore suspensions at a final concentration of 1×10^8 sporos/mL were used to inoculate semi-solid and liquid media cultures containing a minimal medium plus specific carbon source [glucose 0.5% (w/v); pre-treated sugarcane bagasse (pH 7.0) 1% (w/v)]. Liquid and semi-solid cultures were incubated at 28°C over a time-course of 36 h and 48 h, totaling eight distinct treatments, each carried out in duplicate. Following total RNA isolation from harvested fungal mycelia, messenger RNA isolation, full-length enriched cDNA library preparation and Illumina RNAseq (www.illumina.com) was carried out in collaboration with Eurofins MWG Operon (Alabama, USA). Sequencing was conducted in two channels of a double flowcell using the Illumina HiSeq2000 system, with paired-end sequencing (2 X 100 bases) performed using TruSeq RNA Chemistry v3. Quality-trimmed reads were mapped to the *A. oryzae* RIB40 genome (National Research Institute of Brewing Stock Culture ATCC-42149), with alignment conducted according to TopHat, employing a mismatch allowance of 3 bases and seed length 21. Mapped reads were assembled with Cufflinks. The CarbohydrateActive Enzyme database (CAZy - <http://www.cazy.org/>) was employed in order to identify all glycoside hydrolases (GHs), polysaccharide lyases (PLs) and carbohydrate esterases (CEs) expressed by *A. oryzae* under growth condition treatments. A total of 68.67 Gbases of quality-trimmed sequence data was generated from 16 sequenced cDNA libraries, with an average of 50.2 million reads per library and a mean read length of 80.34 bp. In excess of 80% of reads mapped to individual exons or exon-exon junctions on the *A. oryzae* RIB40 genome sequence. Ongoing analysis of differentially expressed genes through QRT-PCR will contribute to our understanding of the complexity of the *A. oryzae* transcriptome, of fundamental importance for long term employment of this fungus in second generation biofuel development.

Caracterização do transcrito de *Aspergillus oryzae* cultivado em bagaço de cana de açúcar

Midorikawa, G.E.O.¹, Noronha, E.F.¹, Ferreira Filho, E.X.¹, Miller, R.N.G.¹

¹Departament de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, Brasil

*glaucaemy@gmail.com

Palavras chaves: *Aspergillus oryzae*, bagaço de cana, transcrito.

INTRODUÇÃO

Aspergillus oryzae é um fungo filamentosso promissor como fonte de enzimas lignocelulolíticas aplicadas na produção de biocombustíveis a partir da biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana. O presente projeto tem como objetivo a caracterização do transcrito diferencial em *A. oryzae* durante o cultivo em fontes de carbono de glicose e bagaço de cana, em sistemas de cultivo líquido e semi-sólido. Para a caracterização do transcrito por meio de sequenciamento massal Illumina mRNA-seq, foram feitas inicialmente curvas de produção das enzimas xilanase e endoglucanase para a identificação da fase log de crescimento. Seleccionadas através de análise de bioinformática *in silico*, *primers* para uso em qRT-PCR foram desenhados para genes potencialmente constitutivos em *A. oryzae*, aplicáveis em validação futuro de expressão de genes candidatas envolvidos em hidrólise de fontes de carbono.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação da fase log de crescimento de *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana 0,5% e glicose 1% foi realizada por meio da curva de produção enzimática de xilanase e endoglucanase de acordo com o método DNS (Miller, 1959). A fase log de produção de xilanase em culturas de *A. oryzae* que utilizam fontes de carbono como bagaço de cana, glicose, ocorre durante as primeiras 48h pós inóculo (gráfico 1).

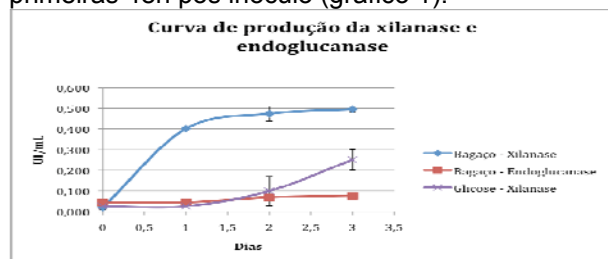


Gráfico 1: Curva de produção da xilanase e endoglucanase em extratos de *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana e glicose por 3 dias, analisadas com intervalos de 24h.

A extração do RNA total de *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana e glicose foi realizada de acordo com o método fenol (Brasileiro & Carneiro, 1998)

nos tempos de 36 e 48h pós inóculo. As amostras foram armazenadas em RNASTable (Biomatrix), e enviadas para o sequenciamento massal, Illumina mRNA-seq no Eurofins MWG Operon, EUA. A qualidade do RNA total foi determinada pelo bioanalyzer Agilent 2100 e kit RNA LabChip (gráfico 2).

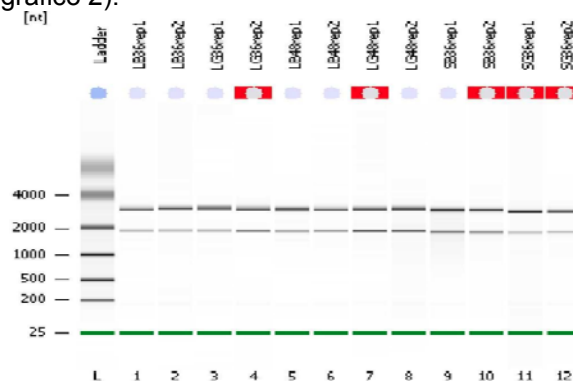


Gráfico 2: Electroforese do RNA total das amostras de *A. oryzae* em cultivo líquido e semi-sólido com 36 e 48h pós inóculo

Os *primers* potencialmente constitutivos em *A. oryzae* foram desenhados por meio do programa Primer3 Plus a partir dos números de acesso do NCBI para actina (NW_001884660.1), β -tubulina (AP007169.1) e rDNA 18S (AP007172.1).

CONCLUSÃO

Com o intuito de identificação e validação de genes envolvidos na regulação de produção de enzimas lignocelulolíticas de *A. oryzae* cultivado em bagaço de cana, a fase log de produção de xilanase foi determinada. O protocolo de extração de RNA total de *A. oryzae* foi estabelecido para sequenciamento massal e *primers* para genes constitutivos foram desenhados.

AGRADECIMENTOS

UnB, CAPES, FAPDF.

REFERÊNCIAS

¹ Brasileiro, A. C. M.; Carneiro, V. T. C. (ED.). Manual de Transformação Genética de Plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. P. 75-92.

² MILLER G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31:426–428, 1959.



BIOMASS PROGRAM
Biofuels, Biopower, Bioproducts
www.biomass.energy.gov

supported by DOE Biomass

T99
Conference Dates: April 28 – May 01, 2014
Analysis of the *Aspergillus oryzae* transcriptome in relation to enzymatic degradation of sugarcane bagasse
Location: Clearwater Beach, FL

Tuesday, April 29, 2014

Exhibit/Poster Hall, lower level (Hilton Clearwater Beach)

G.E.O. Midorikawa¹, E.F. Noronha¹, Ferreira Edivaldo¹, R.C. Togawa² and R.N.G Miller¹,
(1)Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil, (2)Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil

36th Biotech_fuels and chemicals_2014.pdf

Fungi are an important source of hydrolytic enzymes for industrial scale-based conversion of lignocellulose residues to fermentable sugars for application in second generation biofuel production. The principal objective of our study was to examine the transcriptome in *Aspergillus oryzae* BLU37, a promising fungal strain for hydrolytic enzyme production on lignocellulose sources. *A. oryzae* spore suspensions at a final concentration of 1×10^8 spores/mL were used to inoculate semi-solid and liquid media cultures containing a minimal medium plus specific carbon source [glucose 0.5% (w/v); pre-treated sugarcane bagasse (pH 7.0) 1% (w/v)]. Cultures were incubated at 28°C over a time-course of 36 h and 48 h, totaling eight distinct treatments carried out in duplicate. Following total RNA isolation from harvested fungal mycelia, messenger RNA isolation, full-length enriched cDNA library preparation and Illumina RNAseq (www.Illumina.com) was carried out by Eurofins MWG Operon (Alabama, USA). Quality-trimmed reads were mapped to the *A. oryzae* RIB40 genome (National Research Institute of Brewing Stock Culture ATCC-42149). The CarbohydrateActive Enzyme database (CAZy - <http://www.cazy.org/>) identified 202 genes belonging to CAZy families expressed by *A. oryzae* under liquid growth condition treatment with statistically significant differences in expression ($p_{adj} < 0.01$). A total of 44 genes belonging to five transcription factors families were also identified according to the Fungal Transcription Factor Database (FTFD - <http://ftfd.snu.ac.kr>). Ongoing analysis of differentially expressed genes through QRT-PCR will contribute to our understanding of the complexity of the *A. oryzae* transcriptome, for long term employment of this fungus in second generation biofuel development.

See more of: Poster Session II (Tuesday): Adv. Biofuels; Biofuels/Bioproducts; Bioprocessing/Reactor Design; Microbial Sci & Tech.

See more of: General Submissions