

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE
Aspergillus SEÇÃO *Nigri* POR TAXONOMIA
POLIFÁSICA E DESCRIÇÃO DE DUAS
NOVAS ESPÉCIES DO GÊNERO**

DAIANI MARIA DA SILVA

2009

DAIANI MARIA DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Aspergillus* SEÇÃO *Nigri* POR
TAXONOMIA POLIFÁSICA E DESCRIÇÃO DE DUAS NOVAS
ESPÉCIES DO GÊNERO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Daiani Maria da.

Identificação de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* por taxonomia polifásica e descrição de duas novas espécies do gênero / Daiani Maria da Silva. – Lavras : UFLA, 2009.

76 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Taxonomia polifásica. 2. *Aspergillus*. 3. Seção *Nigri*.
4. Seção *Flavi*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 579.5657012

DAIANI MARIA DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Aspergillus* SEÇÃO *Nigri* POR
TAXONOMIA POLIFÁSICA E DESCRIÇÃO DE DUAS NOVAS
ESPÉCIES DO GÊNERO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 27 de Fevereiro de 2009

Dr. Eduardo Alves UFLA

Dr. Hilário Antônio de Castro UFLA

Prof Dr Luís Roberto Batista
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços.

Albert Einstein

Aos meus Pais, Conceição e José Afonso.
Ao meu irmão Cristian.
Ao meu namorado Willian.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao Mestre Jesus pelo dom da Vida, pela Saúde, pela Força, pelo amparo e pela proteção, os quais, mesmo com todas as dificuldades, permitiram que eu conseguisse chegar ao final da realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais queridos, Conceição e José Afonso, pelo sacrifício que fizeram por mim, enfrentando dificuldades e deixando seus próprios sonhos para que eu realizasse o meu. Pelo amor, pelo carinho, pelas palavras de conforto e incentivo, que me ajudaram a continuar sempre. Que Deus os recompense por tudo...

Ao meu querido irmão Cristian pelo carinho.

Ao meu namorado Willian pelo amor, pelo companheirismo, pela compreensão, pela paciência e por estar sempre ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Luís Roberto Batista pela orientação, pelos esclarecimentos, pelos incentivos, amizade e confiança.

À Prof.^a Maria Helena, da Universidade Estadual de Londrina, pela ajuda, pela confiança e pelo apoio na realização de parte deste trabalho.

A Daniele Sartori, da Universidade Estadual de Londrina, pela imensa ajuda, pela atenção, pelo carinho e pela amizade durante o período em que estive na Universidade.

Aos colegas do laboratório de Micotoxinas e Micologia do DCA, Bibiane, Érika, Guilherme, Fabiana Couto, Michelle, Josiane, Fabiana, Camila e Rosilane, pelo carinho, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Em especial à colega e amiga Elisângela, que muito me auxiliou, por sua amizade e dedicação e pelo seu carinho.

Aos colegas do laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia, Janine, Juliano e Edinho, pelo carinho e pela atenção, e em especial a Sara, que me ajudou em um dos momentos mais difíceis. Obrigada!

Ao professor Eduardo Alves, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela atenção durante a realização de parte deste trabalho.

A Elô e ao Renato, do laboratório de Microscopia Eletrônica, pelo carinho e pela ajuda.

Aos funcionários do DCA, Ângela, Denise, Eloísa, Tuca, Ana Lúcia, Sr. Miguel, Cleuza, Tina, Joana e Senhor Piano, pelas horas de descontração e pelo carinho.

À secretária da Pós-graduação do Departamento de Biologia, Magda, pela atenção durante estes dois anos.

Ao Guilherme Prado, da Fundação Nacional Ezequiel Dias – FUNED – BH, pela doação dos padrões das micotoxinas.

À Universidade Federal de Lavras e aos Departamentos de Biologia, Ciência dos Alimentos e Fitopatologia, que permitiram o uso de reagentes e equipamentos.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Lopes Ferreira e sua equipe e ao Projeto do CNPq “Estrutura das Comunidades Cavernícolas da Caatinga Brasileira”.

Ao laboratório Genoma, da Universidade Estadual de Londrina, pelo uso de reagentes e equipamentos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia pela oportunidade de realizar o curso.

A CAPES pelo apoio financeiro através da concessão da Bolsa de Estudos durante o curso

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
Resumo Geral	i
General Abstract	ii
Capítulo 1: Gênero <i>Aspergillus</i> : importância econômica e taxonomia.....	1
1 Introdução Geral	1
2 Referencial Teórico.....	3
2.1 Importância econômica do gênero <i>Aspergillus</i>	3
2.2 Morfologia e classificação do gênero <i>Aspergillus</i>	4
2.3 Micotoxinas produzidas por fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	8
2.4 Taxonomia Polifásica	11
3 Referências Bibliográficas.....	15
Capítulo 2: Taxonomia Polifásica para a identificação de uma nova do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i>	20
Resumo	20
Abstract.....	21
1 Introdução	22
2 Material e Métodos	24
2.1 Isolados	24
2.2 Morfologia e características fisiológicas	25
2.3 Crescimento e produção de ácido em meio de cultura CREA (Creatine Sucrose Ágar)	26
2.4 Determinação do potencial ocratoxigênico das espécies identificadas.....	26
2.5 Extração, sequenciamento e análise molecular.....	26
2.5.1 Obtenção de micélio para a extração de DNA Genômico	26
2.5.2 PCR do Gene β -tubulina	27
2.5.3 Sequenciamento do Gene β -tubulina	27
2.5.4 Análise das sequências.....	28
2.6 Preparo das amostras para análise de microscopia eletrônica de varredura..	28
3 Resultados e Discussão	29
3.1 Morfologia das colônias.....	29
3.2 Ornamentação dos conídios	34
3.3 Crescimento e produção de ácido em meio de cultura CREA (Creatine Sucrose Ágar)	37

3.4 Avaliação do potencial ocratoxigênico	40
3.5 Caracterização molecular para distinguir espécies de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i>	40
4 Descrição morfológica de uma nova espécie de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i>	44
5 Conclusões	48
Referências Bibliográficas	50
Capítulo 3: <i>Aspergillus gruticola</i> sp nov, nova espécie do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i> isolado de caverna no Brasil	53
Resumo	53
Abstract	54
1 Introdução	55
2 Material e Métodos	56
2.1 Material	56
2.2 Métodos	56
2.2.1 Análise morfológica	56
2.3 Determinação do potencial aflatoxigênico	57
2.4 Crescimento e produção de ácido em meio de cultura CREA (Creatine Sucrose Ágar)	57
2.5 Preparo das amostras para análise de microscopia eletrônica de varredura	57
2.6 Extração, sequenciamento e análise molecular	58
2.6.1 Obtenção de micélio para a extração de DNA Genômico	58
2.6.2 PCR do Gene β -tubulina	58
2.6.3 Sequenciamento do Gene β -tubulina	58
2.6.4 Análise das sequências	59
3 Resultados e Discussão	60
3.1 Análise morfológica e fisiológica	60
3.2 Caracterização molecular para distinguir espécie de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i>	64
4 Descrição morfológica de <i>Aspergillus gruticola</i> sp nov Batista, Silva, Fungaro, Sartori	68
5 conclusões	72
Agradecimentos	73
Referências Bibliográficas	74

RESUMO GERAL

SILVA, Daiani Maria. **Identificação de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* por taxonomia polifásica e descrição de duas novas espécies do gênero.** 2009. 76 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

As espécies do gênero *Aspergillus* representam um gênero de grande importância econômica pois são utilizados em processos industriais e por serem responsáveis pela deterioração de alimentos e produção de micotoxinas. A identificação da maioria das espécies do gênero *Aspergillus* tem sido problemática devido à variabilidade dos caracteres fenotípicos. A Taxonomia Polifásica tem sido utilizada para a classificação e identificação das espécies pertencentes ao gênero, principalmente na descrição de novas espécies. Os objetivos deste estudo foram promover a identificação de espécies da Seção *Nigri*, que possui uma das mais complexas e confusas do gênero, e a descrição de um isolado da Seção *Flavi* utilizando a Taxonomia Polifásica. Os isolados foram analisados utilizando dados morfológicos, fisiológicos, imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura e dados moleculares com o sequenciamento do gene β -tubulina. Os resultados demonstraram que a Taxonomia Polifásica é eficiente na identificação das espécies. Uma nova espécie da Seção *Nigri* está sendo proposta, denominada de *Aspergillus caveniger*, baseada principalmente nas características morfológicas. Uma nova espécie *A. gruticola*, pertencente à Seção *Flavi*, também foi diferenciada por morfologia, fisiologia e sequenciamento do gene β -tubulina. Este estudo demonstra que a Taxonomia Polifásica é um método seguro para a identificação e diferenciação de espécies do gênero *Aspergillus*.

Palavras-chave: Taxonomia Polifásica, *Aspergillus*, Seção *Nigri*, Seção *Flavi*

Comitê orientador: Dr. Luís Roberto Batista – UFLA (Orientador)

GENERAL ABSTRACT

SILVA, Daiani Maria. **Identification of species of *Aspergillus Nigri* Section by polyphasic taxonomy and description of two new species of the genus.** 2009. 76 p. Dissertation (Master of Science in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil.

Aspergillus stands for a genus of great economic importance for being utilized in industrial processes and for being responsible for the deterioration of foods as well as the production of mycotoxins. The identification of most of the species of the genus *Aspergillus* has been troublesome due to the variability of the phenotypic characteristics. Recently, Polyphasic Taxonomy has been used in the identification and classification of the species belonging to the genus, especially in the description of new species. The objective of this study were to promote the Identification of species of the *Nigri* Section, which possesses one of the most complex and confuses of the genus and the Description of an isolate of the *Flavi* Section utilizing Polyphasic Taxonomy. The isolates were studied by using morphologic and physiologic data, images generated from scanning electronic microscopy and molecular data with the sequencing of β -tubulin gene. The results showed that Polyphasic Taxonomy is efficient in species identification. A new species from the *Nigri* Section is being proposed, named *Aspergillus* sp, based mainly upon by its morphological characteristics. A new species *A. gruticola*, belonging to the *Flavi* Section was also distinguished through the morphology, physiology and sequencing of β -tubulin gene. This study shows that Polyphasic Taxonomy is a safe method for the identification and differentiation of species of the genus *Aspergillus*.

Key words: Taxonomy Polyphasic, *Aspergillus*, *Nigri* Section, *Flavi* Section

Guidance Committee: Dr Luís Roberto Batista – UFLA (Major Professor)

CAPÍTULO I

GÊNERO *Aspergillus* : IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E TAXONOMIA

1 INTRODUÇÃO GERAL

As espécies do gênero *Aspergillus* são fungos onipresentes capazes de colonizar uma vasta variedade de substratos. Poucos fungos são tão importantes quanto os membros deste gênero. *Aspergillus* representa um gênero de grande importância econômica e algumas espécies são responsáveis pela deterioração de alimentos e produção de micotoxinas. As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário de algumas espécies de fungos que, quando ingeridas por animais, incluindo o homem, podem causar alterações prejudiciais à saúde. As espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* são capazes de produzir micotoxinas de grande importância econômica, em especial as aflatoxinas, as ocratoxinas A e a patulina. Alguns países estão adotando limites máximos nos níveis de micotoxinas presentes nos alimentos a fim de proteger a saúde de consumidores.

Membros pertencentes à Seção *Nigri* formam um subgrupo do gênero *Aspergillus* e são distribuídos mundialmente, podendo se desenvolver em uma vasta variedade de substratos. Várias espécies desta Seção são utilizadas na indústria de fermentação de diferentes ácidos orgânicos e enzimas hidrolíticas. *A. niger* é a espécie desta Seção reportada mais frequentemente, possui “Status” GRAS (“Generally Regarded as Safe”) pela “Food And Drug Administration” e é amplamente utilizada em processos biotecnológicos (Abarca et al., 2004).

A taxonomia da Seção *Nigri* ainda não está totalmente esclarecida provavelmente porque durante muitos anos a classificação foi essencialmente baseada em critérios morfológicos, sendo as diferenças entre as espécies muito

sutis. Em decorrência disso, nos últimos anos a adição de novos métodos, incluindo análises de extrólitos, e o uso de ferramentas moleculares baseadas em PCR vêm sendo aplicados em questões taxonômicas do gênero *Aspergillus*. (Geiser et al., 2007). A Taxonomia Polifásica tem como objetivo a integração dos diferentes tipos de dados e informações (fenotípicas, genéticas e filogenéticas) sobre o microrganismo, indicando uma taxonomia de consenso. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram identificar espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* utilizando a Taxonomia Polifásica e descrever duas novas espécies do gênero.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância Econômica do gênero *Aspergillus*

As espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* devido a sua importância econômica são utilizadas em diversos processos nas indústrias alimentícia, de bebidas e farmacêutica e na produção de enzimas e ácidos orgânicos (Baker & Benneth, 2008).

Um número de antibióticos, antitumores e agentes antifúngicos tem sido derivado de metabólitos de algumas espécies de *Aspergillus*. Exemplos disso são a lovastantina, produzida por espécies de *A. terreus*, comercialmente utilizada para auxiliar na diminuição das taxas de colesterol, e a droga anti-Candida, cilofungina, que é uma droga semi-sintética derivada da modificação química de echinocandina B, produzida por espécies de *Emericella nidulans/ rugulosa* (Klich, 2002).

O maior impacto econômico positivo do gênero *Aspergillus* tem sido a valorização na produção de enzimas e ácidos por um número de espécies deste gênero. Dois dos mais importantes produtos industriais produzidos por espécies de *Aspergillus* são a amilase e o ácido cítrico (Abarca et al., 2004).

As espécies de *A. niger* têm uma grande importância na indústria alimentícia, pois são amplamente utilizadas na produção biotecnológica de ácidos orgânicos como o ácido cítrico e o ácido glucônico (Abarca et al., 2004). O ácido cítrico é um ácido orgânico bastante utilizado pela indústria alimentícia como acidulante de alimentos e bebidas, como doces, sucos de frutas, geléias, gelatinas, refrigerantes, entre outros. Na indústria farmacêutica, o ácido cítrico é usado para preservar sangue armazenado, e na indústria de cosméticos, é usado como antioxidante. O ácido cítrico envolve, também, outras aplicações industriais, como a produção de detergentes, galvanoplastia e o curtimento de

couro (Baker & Bennett, 2008). Além da produção de ácidos orgânicos, *A. niger* é também um importante produtor de enzimas como pectinase, protease, amiloglucosidase, catalase e glucosidase. A espécie de *A. aculeatus* é utilizada no processamento de alimentos e, hoje, muitas enzimas disponíveis no mercado utilizadas para contribuir no sabor e cor de alguns produtos são derivadas destas espécies (Pariza & Jonson, 2001).

Apesar dos aspectos econômicos positivos relacionados às espécies de *Aspergillus*, muitas espécies estão associadas à contaminação e à degradação de produtos alimentares. Muitos alimentos são susceptíveis ao crescimento destes fungos devido a condições inadequadas de secagem, armazenamento e transporte às quais são expostos. Em condições de pouca umidade, por exemplo, algumas espécies de *Aspergillus* são altamente dominantes e possuem capacidade de contaminar vários alimentos e rações. O aspecto mais importante envolvendo a deterioração de alimentos por espécies de *Aspergillus* é a produção de micotoxinas, que são metabólitos secundários tóxicos prejudiciais à saúde de animais e humanos. Estima-se que 25% dos alimentos consumidos mundialmente estão contaminados com micotoxinas (Kamei & Watanabe, 2005; Niessen et al., 2005; Russell & Paterson, 2006).

2.2 Morfologia e classificação do gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* representa um anamorfo de ascomicetos pertencente à ordem *Eurotiales*, ou seja, caracteriza-se pela produção de esporos assexuais (Klich & Pitt, 1988). A coloração das colônias é a característica principal macroscópica para a diferenciação das Seções de *Aspergillus*. Eles possuem vários tons de verde, amarelo, marrom, branco, preto e cinza (Klich, 2002). As espécies pertencentes a esse gênero tipicamente produzem um conidióforo, asseptado e com a base normalmente em forma de “T” ou “L”, comumente chamada de “célula pé”, conectada a uma hifa vegetativa. O

conidióforo estende-se a partir da célula pé e pode continuar a se estender por alguns milímetros de comprimento até chegar à vesícula, na qual as células conidiógenas métulas e fiálides são formadas. As vesículas podem ter várias formas características. Em algumas espécies o conídio é diretamente ligado às fiálides; essa característica pertence às espécies denominadas de unisseriadas. As fiálides produzem conídios enfileirados ou em cadeia, com diferentes pigmentação e ornamentação. Outras espécies apresentam estruturas especializadas que ficam entre a vesícula e as fiálides, designadas métulas, e a presença destas estruturas caracteriza estas espécies como bisseriadas (Raper & Fennell, 1965; Klich & Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989; Gams et al., 1998).

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* produzem células Hülle, que são células de paredes muito espessas e refringentes, cuja função ainda é desconhecida (Klich & Pitt, 1988).

No gênero *Aspergillus* algumas espécies são capazes de se reproduzir de forma sexuada. Estes estados teleomórficos ou de reprodução “meiótica” pertencem à família *Trichomataceae* dos *Ascomycota* e são caracterizados pela formação de ascos que contêm os ascósporos. Os ascos estão dentro do ascocarpo, geralmente um cleistotécio (Raper & Fennell, 1965; Klich & Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989).

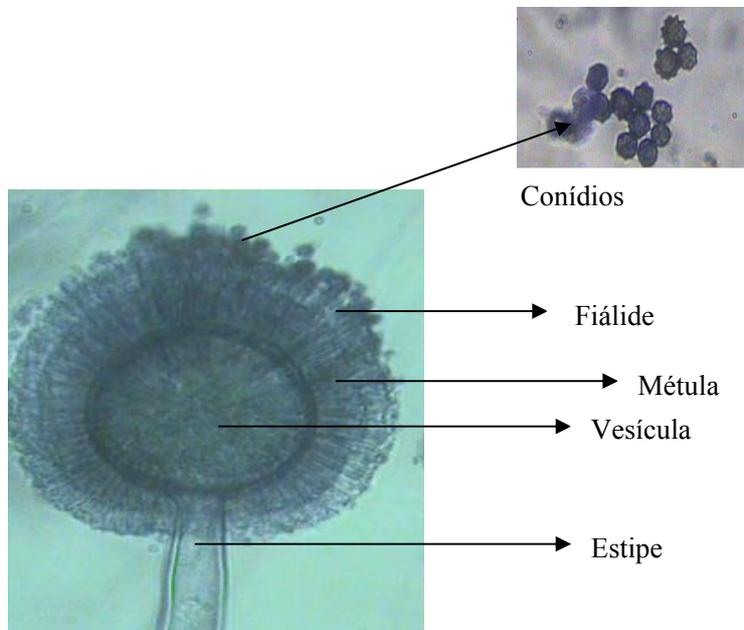


FIGURA 1 Tipos de ramificação em espécie de *Aspergillus bisseriatus*.

A classificação do gênero *Aspergillus* tem sido estudada por muitos taxonomistas. A primeira descrição deste gênero foi feita por Micheli (1729). Depois desta primeira descrição, muitas espécies foram descritas Church & Thom (1926) foram os primeiros a revisar o gênero *Aspergillus*, aceitando 69 espécies, divididas em 11 grupos, com base em características morfológicas. Thom & Raper (1945) incluíram 77 espécies no gênero, com 10 variedades em 14 grupos.

Raper & Fennell (1965) descreveram 132 espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* e as subdividiram em 18 grupos, com base em características culturais e morfológicas, que foram reclassificados em Seções pertencentes a seis subgêneros por Gams et al. (1985).

Embora muitas novas espécies de *Aspergillus* e a relação com seus teleomorfos tenham sido descritas, as espécies e variedades descritas desde 1965

foram criticamente revisadas, levando a algumas alterações quanto à classificação e à nomenclatura. Os conceitos de espécie são consideravelmente bem circunscritos, embora vários grupos sejam de identificação e classificação problemática.

Os problemas nomenclaturais foram devidos ao fato de Raper & Fennell (1965) terem recusado aderir ao código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN), a subdivisão do gênero foi baseada em grupos de espécies semelhantes, como por exemplo as espécies de *A. niger*, que eram referidas como pertencentes ao grupo de *A. niger*.

Peterson (2000) propôs eliminar três dos seis subgêneros estabelecidos por Gams et al. (1985), retendo 12 das 18 seções classificadas por Raper & Fennell (1965). Em 2000 estavam descritas 182 espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* (Pitt et al., 2000). Segundo Geiser et al. (2007), mais de 40 novas espécies descritas foram publicadas desde 2000, elevando o número total das espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* para aproximadamente 250 espécies. Segundo estes autores, essa classificação tem sido feita com base em características morfológicas, fisiológicas e moleculares, os quais ressaltam, ainda, que o número continuará a crescer à medida que novas espécies forem descobertas e novos conceitos, atribuídos. Klich (2002) propõe, em seu manual de identificação, as principais Seções pertencentes ao Gênero *Aspergillus* e suas características morfológicas em meios de cultura padronizados (Tabela 1).

TABELA 1 Classificação do Gênero *Aspergillus* e suas principais características Klich (2002).

Subgênero	Seção	Principais Características
------------------	--------------	-----------------------------------

<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	Unisseriado, xerofílico, crescimento em CY20S>CY25, conídios verde/cinza
	<i>Restricti</i>	Estritamente anamórfico, crescimento lento
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	Conídio cinza-verde para verde-azul
	<i>Cervini</i>	Conídio laranja claro para laranja-cinza
<i>Ornati</i>		Unisseriado, conídio verde-cinza, verde-amarelo ou marrom-oliva
<i>Clavati</i>	<i>Clavati</i>	Unisseriado, vesículas predominantemente clavada, conídio cinza/verde
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	Estipe curta e castanha, conídio verde, células Hülle, ascósporos vermelho púrpura
	<i>Flavipedes</i>	Estipe hialina para marrom pálido, conídio branco
	<i>Versicolores</i>	Estipe hialina para marrom, conídio verde, verde cinza ou verde azul
	<i>Usti</i>	Estipe marrom, conídio vermelho escuro, marrom/oliva
	<i>Terrei</i>	Estipe hialina, conídio laranja-marrom
<i>Circumdati</i>	<i>Candidi</i>	Conídio branco ou quase branco
	<i>Circumdati</i>	Predominantemente bisseriado, conídio amarelo ou ochraceus
	<i>Cremeri</i>	Conídio marrom, amarelo ou azul-verde
	<i>Flavi</i>	Conídio verde/amarelo para oliva/marrom
	<i>Nigri</i>	Estipe com paredes lisas, conídio preto ou próximo do preto
	<i>Sparsi</i>	Conídio cinza pálido para oliva
	<i>Wentii</i>	Conídio amarelo/marrom ou oliva marrom

2.3 Micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*

As espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* são capazes de produzir micotoxinas de grande importância econômica, em especial as aflatoxinas, as ocratoxinas A (OTA) e a patulina. Recentemente, a produção de fumonisina B2 foi relatada em espécies de *A. niger* (Castellá et al., 2002; Moss, 2002; Frisvad et al., 2007).

A OTA é uma importante micotoxina produzida naturalmente por algumas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neopetromyces* e *Petromyces*

(Frisvad & Samson, 2000; Bennett & Klich, 2003). Esta micotoxina é considerada nefrotóxica, imunotóxica, genotóxica e teratogênica e tem sido classificada pela IARC (International Agency for Research on Cancer) como possível carcinogênica para humanos (grupo 2B) (IARC, 1993).

A OTA foi inicialmente identificada em espécies de *A. ochraceus* pertencentes à Seção *Circumdati*, em 1965, por um experimento conduzido por Merwe et al. (1965). A partir desta descoberta, vários estudos confirmaram a presença desta toxina em alimentos, o que despertou a atenção de vários pesquisadores e organizações alimentares. Posteriormente, outras espécies pertencentes à Seção *Circumdati* foram relatadas como produtoras de OTA: *A. elegans*, *A. auricomus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum* e *A. sulphureus*, *A. insulicola* (Batista et al., 2003) e *A. elegans* (Nasser et al., 2003). Samson et al. (2004) descreveram oito novas espécies pertencentes à Seção *Circumdati* produtoras de OTA: *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. westerdijkiae*, *A. sulphureus* e *Neopetromyces muricatus*.

Na Seção *Nigri*, *A. carbonarius* é considerada a principal espécie envolvida na produção de OTA, principalmente em espécies isoladas de uvas e seus derivados (Esteban et al., 2006). Ueno et al. (1991) relatam que a espécie *A. foetidus*, pertencente à Seção *Nigri*, apresenta capacidade para produzir OTA. A produção de OTA tem sido relatada em outra espécie da Seção *Nigri*, nomeada *A. japonicus* (Dalcero et al., 2002; Battilani et al., 2003), mas esta confirmação ainda é controversa, pois outros autores não confirmam a produção de OTA por esta espécie (Parenicová et al., 2001).

Samson et al. (2004) relataram outras espécies da Seção *Nigri* que não são produtoras de OTA, tais como *A. tubingensis*, *A. ellipticus*, *A. aculeatus*, *A. costaricensis* e *A. piperis*. Estes mesmos autores descreveram duas novas espécies da seção *Nigri* capazes de produzir OTA: *A. sclerotioniger* e *A. lacticoffeatus*, ambas isoladas de café.

Outras micotoxinas de grande importância produzida pelo gênero *Aspergillus* são as aflatoxinas. Inicialmente as aflatoxinas foram isoladas pelas espécies de *A. flavus*. Após estudos, alguns autores relataram que nem todas as linhagens de *A. flavus* são produtoras de aflatoxina, e a maioria das linhagens de *A. parasiticus* são potencialmente produtoras de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, enquanto *A. flavus* produzem somente aflatoxinas B1 e B2. Estudos recentes confirmam outras espécies pertencentes a esta Seção que são capazes de produzir aflatoxinas, como *A. bombycis*, *A. nomius* e *A. pseudotamari*, e *A. ochraceoroseus* (Seção *Circumdati*) e *Emericella venezuelensis*, as quais são encontradas em menor frequência (Bennett & Klich, 2003; Peterson et al., 2001). Em um recente trabalho, Pildain et al. (2008), descreveram duas novas espécies pertencentes à Seção *Flavi*, *A. minisclerotigenes* e *A. arachidicola*, produtoras de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

As aflatoxinas são denominadas B1, B2, G1 e G2, sendo a aflatoxina B1 considerada a forma mais tóxica das aflatoxinas. Para algumas espécies de animais, como os ratos, a aflatoxina B1 é um dos mais conhecidos metabólitos carcinogênicos (Moss, 2002). As aflatoxinas, devido à sua alta toxicidade, podem trazer sérios riscos à saúde humana e de animais, pois possuem propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e imunossupressoras (Nordin & Luchese, 1998).

A exposição humana às micotoxinas pelo consumo de alimento contaminado é questão de saúde pública no mundo todo. Programas de monitoramento dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas são essenciais para garantir segurança à saúde dos consumidores. Os níveis de micotoxinas nos alimentos podem flutuar grandemente e variar de ano para ano mediante as condições para o crescimento de fungos. Quando presentes em níveis elevados na dieta alimentar, podem levar a problemas agudos de saúde e até à morte.

O JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants - Comissão do Codex Alimentarius sobre Contaminantes e Aditivos de Alimentos) tem proposto recomendações quanto aos níveis máximos admissíveis de micotoxinas em alimentos. Para a maior parte das micotoxinas, os dados disponíveis são insuficientes para permitir uma avaliação pela JECFA. No entanto, algumas micotoxinas já foram avaliadas: aflatoxina M1, DON, fumonisinas, OTA, toxina HT2 e T-2, patulina e zearalenona (Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants - JECFA, 2001).

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas sobre as quais existem dados suficientes para permitir a realização de uma avaliação dos níveis máximos toleráveis nos alimentos previstos na legislação, e esse limite estabelecido para as aflatoxinas é comparável ao de outros países, recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização para Alimentação e Agricultura (Food Agricultural Organization - FAO, 1998).

Em países europeus, de acordo com os dados recomendados pela FAO/WHO, a média total de ingestão de OTA foi estimada em 45µg/kg de peso corpóreo por semana, assumindo o peso corpóreo de 60µg/Kg. Devido aos dados toxicológicos em estudos com animais e à exposição humana, a União Européia tem recomendado que os níveis de OTA sejam inferiores a 5ng (kg por peso corpóreo) por dia (Bennett & Klich, 2003). No Brasil ainda não existe uma legislação específica para OTA.

Devido a grande importância da presença de micotoxinas em alimentos, a identificação correta destas espécies é essencial para garantir alimentos seguros. O uso da Taxonomia Polifásica pode dar mais confiabilidade na identificação das espécies.

2.4 Taxonomia Polifásica

A classificação do gênero *Aspergillus* tem sido estudada por muitos taxonomistas. A mais importante publicação deste gênero foi baseada em critérios fenotípicos (Raper & Fennell, 1965). A identificação das espécies de *Aspergillus* permanece problemática, devido à variabilidade das características fenotípicas, o que vem causando erros na literatura, especialmente na identificação de espécies produtoras de micotoxinas (Samson et al., 2006).

A taxonomia do gênero *Aspergillus* e seus teleomorfos têm sido recentemente re-investigados usando uma abordagem polifásica para examinar a variabilidade das espécies (Frisvad et al., 2004; Hong et al., 2006). A Taxonomia Polifásica tem como objetivo integrar diferentes tipos de dados e informações (micro e macromorfologia, fisiológica, produção de metabólitos e dados moleculares), sendo todos importantes e em princípio nenhum dos métodos particulares será o mais sobrenfatizado. Exemplos de novas classificações de espécies nas Seções *Circumdati*, *Flavi*, *Fumigati* e *Nigri* estão sendo apresentadas (Samson et al., 2006).

As ferramentas moleculares tais como REAL-TIME PCR, RFLP, RAPD, AFLP, sequência de RNA ribossomal e genes que codificam proteínas têm sido aplicados para questões taxonômicas (Geiser et al., 2007). Para o gênero *Aspergillus* dentre as sequências de β -tubulina 2 A, 2 B e 10 A e calmodulina (Frisvad et al., 2004; Samson et al., 2004).

Análises de extrólitos ou quimiotaxonomia, especialmente metabólitos secundários, têm sido testadas em um grande número de fungos e muitas vezes podem ser utilizadas para auxiliar na identificação das espécies (Larsen et al., 2001). Estas análises têm demonstrado que cada espécie de *Aspergillus* é caracterizada por um determinado perfil de metabólitos secundários (Samson et al., 2006).

Segundo Geiser et al. (2007) a descrição da morfologia, fisiologia e dados moleculares podem ser usados não só como fonte para a identificação, mas também para o entendimento da biologia dos fungos.

O estudo sobre a importância econômica de espécies do gênero *Aspergillus* por pesquisas polifásicas são inovadoras e estratégicas para o estudo da biodiversidade das populações/espécies (Perrone et al., 2007).

Muitos pesquisadores têm utilizado diferentes métodos para a classificação das espécies de *Aspergillus*. Varga et al. (2007) utilizaram a Taxonomia Polifásica através de métodos morfológicos, análises de extrólitos e dados moleculares baseados na sequência da região ITS, partes do gene β -tubulina e do gene calmodulina para examinar espécies da Seção *Clavati*. Os dados indicaram que *Aspergillus* Seção *Clavati* inclui 7 espécies, *A. clavatus* sinônimos: *A. apicalis*, *A. pallidus*, *A. giganteus*, *A. rhizopodus*, *A. longivesica*, *Neocarpenteles acanthosporus* e *A. clavatonanicus*. *Neocarpenteles acanthosporus* é o único teleomorfo conhecido desta Seção.

Houbraken et al. (2007) também utilizaram a Taxonomia Polifásica para clarificar a taxonomia de *Aspergillus* Seção *Usti*. Com base em dados químicos, moleculares e morfológicos, estes autores separaram *A. insuetus* de *A. ustus*, *A. insuetus* difere de *A. ustus* na produção de ácidos, e concluíram que a Seção *Usti* sensu strictu inclui oito espécies: *A. ustus*, *A. puniceus*, *A. granulatus*, *A. pseudodeflectus*, *A. calidoustus*, *A. insuetus* e *A. keveii*, juntamente com *Emericella heterothallica*.

A utilização da Taxonomia Polifásica tem contribuído de forma significativa para uma melhor identificação das espécies de *Aspergillus*, conforme relatado em muitos trabalhos, e tem se demonstrado também, uma técnica bastante importante para a descrição de novas espécies deste gênero. Nos últimos anos, novas espécies de *Aspergillus* vêm sendo descritas, e para a descrição destas espécies, muitos pesquisadores têm utilizado e recomendado o

uso da Taxonomia Polifásica a fim de não cometerem erros na classificação destas espécies, pois, em muitos casos, os taxonomistas têm dificuldades para determinar quais são as características que realmente definem uma espécie somente com a aplicação de critérios morfológicos. Para a descrição de novas espécies, Samson et al. (2007), além de caracteres morfológicos, utilizaram a combinação de outros caracteres incluindo sequências de DNA, caracteres fisiológicos e análises de extrólitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black *aspergilli*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 86, n. 1, p. 33-49, 2004.

BAKER, S. E.; BENNETH, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. **Mycology**, New Jersey, v. 26, p. 551, 2008.

BATTILANI, P.; PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; LANGUASCO, L.; GIORNI, P.; KOZAKIEWICZ, Z. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grow in Italy. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, p. 633-636, 2003.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, 2003.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

CASTELLÁ, G.; LARSEN, T. O.; CABAÑES, F. J.; SCHMIDT, H.; ALBARESI, A.; NIESSEN, L.; FABER, P.; GEISEN, R. Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 25, n. 1, p. 74-83, 2002.

CHURCH, M. B.; THOM, C. The *Aspergilli*. In: KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1926. 116 p.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; CHIACCHIERA, S. M.; PALACIO, G.; ROSA, C. A. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, Oxford, v. 19, p. 1065-1072, 2002.

ESTEBAN, A.; ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **Food Microbiology**, London, v. 23, p. 634-640, 2006.

FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION. **Expert committee on food additives**. Geneva: World Health Organization, 1998. CD-ROM.

FRISVAD, J. C.; FRANK, J. M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; SAMSON, R. A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, Denmark, v. 50, p. 23-43, 2004.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus *Circumdati*. In: SEIFERT, K. A.; GAMS, W.; CROUS, P. W.; SAMUELS, G. J. (Ed.). **Studies in mycology–molecular, morphology and classification: towards monophyletic genera in the Ascomycetes**. New Jersey: CBS, 2000. p. 201-207.

FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; SAMSON, R. A.; LARSEN, T. O.; THRANE, U. Fumonisin B2 Production by *Aspergillus niger*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Netherlands, v. 55, p. 9727-9732, 2007.

GAMS, W.; CHRISTENSEN, M.; ONIONS, A. H. S.; PITT, J. I.; SAMSON, R. A. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.). **Advances in *Aspergillus* and *Penicillium* systematics**. New York: Plenum, 1985. p. 55-62.

GAMS, W.; HOEKSTRA, E. S.; ATROOT, A. **CBS course of mycology**. 4. ed. Wageningen: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1998. 165 p.

GEISER, D. M.; KLICH, M. A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S. W.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 59, p. 1-10, 2007.

HONG, S. B.; GO, S. J.; SHIN, H. D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, Netherlands, v. 97, p. 1316-1329, 2006.

HOUBRAKEN, J.; DUE, M.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti*. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 59, p. 107-128, 2007.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CÂNCER. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of humans: some naturally occurring substances: food itens and constituents. **Heterocyclic Aromatic and Mycotoxins**, v. 56, p. 489-521, 1993.

JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS. **Safety evaluations on certain mycotoxins in food**. 2001. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecmono/v47je01.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2009.

KAMEI, K.; WATANABE, A. *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. **Medical Mycology Supplement**, Tokyo, v. 43, p. 595-599, 2005.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002. 116 p.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. North Ryde: [s.n.], 1988. 197 p.

KOZAKIEWICZ, Z. ***Aspergillus* species on stored products**. Washington: CABI, 1989. 188 p (Mycological Papers, 161).

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the Genus *Penicillium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 3630-3635, 2001.

MERWE, K. J. van der; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, D. B.; THERON, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, London, v. 205, n. 4976, p. 1112-1113, 1965.

MICHELI, P. A. Nova plantarum genera juxta Tournefortii methodum disposita. In: KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p.

MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food additive and contaminants**, Oxford, v. 13, p. 5-9, 2002.

NASSER, P. P.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R.; MERCER, J. R. Implicações do fungo *Aspergillus niger* var *niger* sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* seção *Circumdati* e produção de ochratoxina A. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p. 1172-1175, 2003.

NIESSEN, L.; SCHMIDT, H.; MUHLENCOUT, E.; FARBER, P.; GEISEN, R. Advances in the molecular diagnosis of ochratoxin A: producing fungi. **Food Additives and Contaminants**, Berlin, v. 22, p. 324-334, 2005.

NORDIN, N.; LUCHESE, R. H. Detecção de aflatoxina e zearalenona em milho (*Zeamays*), destinado a alimentação animal. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Porto Alegre, v. 32, n. 1, p. 35-39, 1998.

PARENICOVÁ, L.; SKOWBOE, P.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; ROSSEN, L.; SUYKERBUYK, M.; VISSER, J. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. **Applied Environmental Microbiological**, Denmark, v. 67, p. 5721-5727, 2001.

PARIZA, M. W.; JONSON, E. A. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for new century. **Regulation Toxicological Pharmacological**, v. 33, p. 173-186, 2001.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRLICH, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; SAMSON, R. A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycological**, Netherlands, v. 59, p. 53-66, 2007.

PETERSON, S. W. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Amsterdam: Harwood Academic, 2000. p. 323-355.

PETERSON, S. W.; ITO, Y.; HORN, B. W.; GOTO, T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, Tokyo, v. 93, p. 689-703, 2001.

PILDAIN, M. B.; FRISVAD, J. C.; VAAMONDE, G.; CABRAL, D.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Netherlands, v. 58, p. 725-735, 2008.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods of *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Amsterdam: Harwood Academic, 2000. p. 9-49.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams and Wilkins, 1965. 685 p.

RUSSEL, R.; PATERSON, M. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. **Process Biochemistry**, Lisboa, 2006.

SAMSON, R. A.; HONG, S. B.; FRISVAD, J. C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Medical Mycology**, Netherlands, v. 44, p. 133-148, 2006.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; FRANK, M. J.; FRISVAD, J. C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 50, p. 45-61, 2004.

SAMSON, R. A.; NOONIM, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black *aspergilli*. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 59, p. 129-145, 2007.

THOM, C.; RAPER, K. B. A manual of the *Aspergilli*. In: KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p.

UENO, Y.; KAWAMURA, O.; SUGIURA, Y.; HORIGUCHI, K.; NAKAJIMA, M.; YAMAMOTO, K.; SATO, S. Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi. **IARC Scientific Publications**, v. 115, p. 71-75, 1991.

VARGA, J.; DUE, M.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 59, p. 89-106, 2007.

CAPÍTULO 2

TAXONOMIA POLIFÁSICA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UMA NOVA DO GÊNERO *Aspergillus* SEÇÃO *Nigri*

RESUMO

Apesar de a taxonomia das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* ser considerada problemática, vários métodos têm sido propostos para auxiliar na classificação desta Seção. Com base na Taxonomia Polifásica utilizando caracteres morfológicos, fisiológicos e sequenciamento do gene β -tubulina, este trabalho objetivou diferenciar espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*. A identificação morfológica demonstrou-se útil para algumas espécies como *A. carbonarius*, apesar de não ter sido totalmente eficaz no esclarecimento de espécies relacionadas à *A. niger* Agregados. O isolamento das espécies da Seção *Nigri* em CREA permitiu diferenciar as espécies analisadas em grupos e auxiliou na diferenciação da espécie *Aspergillus* sp, que se caracterizou pela ausência de esporulação e produção de esclerócios. A MEV permitiu diferenciar as espécies em dois grupos distintos, um grupo que apresenta conídios com ornamentação equinulada e outro verrucoso. A produção de ocratoxina A (OTA) foi confirmada apenas nas espécies *A. carbonarius* e *A. niger*. O sequenciamento do gene β -tubulina foi eficiente para diferenciar a maioria das espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, com exceção de *Aspergillus* sp, que não pôde ser distinguida de *A. costaricensis*. Uma nova espécie da Seção *Nigri* isolada de uma caverna Brasileira é descrita neste estudo como *Aspergillus caveniger*. Esta espécie se assemelha morfológicamente a *A. costaricensis* pela baixa capacidade de esporulação e abundante produção de esclerócios, mas se diferencia morfológicamente pela ornamentação conidial e pelo tamanho das vesículas. Utilizando o gene β -tubulina não foi possível discriminar *Aspergillus caveniger* de *A. costaricensis*.

Palavras-chave: *Aspergillus*, Seção *Nigri*, Taxonomia Polifásica.

Comitê orientador: Dr. Luis Roberto Batista – UFLA (Orientador)

ABSTRACT

In spite of the taxonomy of the *Aspergillus* species of the *Nigri* Section being regarded as troublesome, number of methods have been proposed to aid in the classification of this Section. On the basis of Polyphasic Taxonomy by utilizing morphologic, physiologic characters and sequencing of β -tubulin gene, this work aimed to distinguish *Aspergillus* species *Nigri* Section. The morphologic identification proved useful for some species, such as *A. carbonarius* and *Aspergillus* sp, despite not having been totally effective in elucidating species related to the species of *A. niger*. The isolation of the species of the *Nigri* Section on CREA enabled to distinguish the *Aspergillus* sp species, which was characterized by the lack of sporulation and by the production of sclerotia. SEM allowed to distinguish the species into two distinct groups; one group presenting conidia with equinulate ornamentation, and the other verrucous. The production of O. chratoxin A (OTA) was only found in the *A. carbonarius* and *A. niger* species. The sequencing of β -tubulin gene was efficient in differing most of the *Aspergillus* species from the *Nigri* Section with the exception of *Aspergillus caveniger* species, which could not be distinguished from *A. costaricensis*. A new species from the *Nigri* Section isolated from a Brazilian cave is reported in this study. This species is morphologically similar to *A. costaricensis* for its low sporulation capacity and high sclerotia production, but it differs morphologically from *A. costaricensis* for its conidial ornamentation and size of vesicles. By utilizing β -tubulin gene, it was not possible to distinguish *Aspergillus caveniger* from *A. costaricensis*.

Key words: *Aspergillus* sp, Section *Nigri*, Taxonomy Polyphasic.

Guidance Committee: Dr. Luís Roberto Batista – UFLA (Major Professor)

1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* ou Black *Aspergillus* são mundialmente distribuídas e possuem capacidade de desenvolver em uma vasta variedade de substratos. Muitas espécies são capazes de causar deterioração de alimentos, embora algumas sejam utilizadas nas indústrias, em processos de fermentação, para a produção de ácidos orgânicos, como o cítrico e o glucônico, e enzimas hidrolíticas como lipases e amilases (Pitt & Hocking, 1997; Abarca et al., 2004). *A. niger* é uma das espécies amplamente utilizadas em processos biotecnológicos e a única que possui o “Status GRAS (“Generally Regarded As Safe”) pela “Food And Drug Administration”. No entanto, algumas espécies da Seção *Nigri* destacam-se pela produção de micotoxinas. A principal micotoxina relacionada a estas espécies é a ocratoxina A (OTA), que vem merecendo atenção mundial pelo risco que pode causar à saúde de animais e humanos (Bennett & Klich, 2003; Abarca et al., 2004).

As espécies produtoras de OTA podem estar presentes em vários alimentos, incluindo uvas e seus derivados, café e cacau, entre outros (Leong et al., 2007).

A taxonomia dos fungos pertencentes à seção *Nigri* constitui uma das mais confusas e complexas do gênero, pois as diferenças entre estas espécies são muito sutis e, por muito tempo, a identificação e a classificação destas espécies foram estudadas por meio de critérios morfológicos e culturais (Pitt & Hocking, 1997; Samson et al., 2004). A taxonomia dos *Aspergillus* Seção *Nigri* recentemente vem sendo re-investigada através da Taxonomia Polifásica, que utiliza diferentes métodos (morfológicos, fisiológicos, produção de metabólitos e importantes dados moleculares) com a finalidade de simplificar e tentar

esclarecer a confusa taxonomia desta seção. Para a descrição de novas espécies, as pesquisas polifásicas foram sugeridas como “Gold Standar”.

Este estudo teve como objetivo utilizar a Taxonomia Polifásica para identificar e classificar espécies pertencentes à Seção *Nigri*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados

Os isolados deste estudo foram obtidos na micoteca do Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG (Tabela 1).

TABELA 1 Isolados examinados neste estudo.

Espécie	Origem	Espécie	Origem
<i>A. aculeatus</i> (0128)	Caverna	<i>A. foetidus</i> (01159)	Caverna
<i>A. aculeatus</i> (01201)	Uva-passa	<i>A. foetidus</i> (01213)	Castanha
<i>A. aculeatus</i> (0113)	Caverna	<i>A. foetidus</i> (01296)	Castanha
<i>A. aculeatus</i> (01111)	Uva-passa	<i>A. foetidus</i> (01205)	Caverna
<i>A. aculeatus</i> (01114)	Uva-passa	<i>A. foetidus</i> (01140)	Uva-passa
<i>A. aculeatus</i> (01151)	Caverna	<i>A. foetidus</i> (01206)	Caverna
<i>A. carbonarius</i> (01130)	Caverna	<i>A. foetidus</i> (01168)	Uva-passa
<i>A. carbonarius</i> (01218)	Uva-passa	<i>A. foetidus</i> (01380)	Guaraná
<i>A. carbonarius</i> (01244)	Pimenta	<i>A. foetidus</i> (01284)	Castanha
<i>A. carbonarius</i> (0118)	Uva-passa	<i>A. foetidus</i> (01286)	Café
<i>A. carbonarius</i> (0121)	Uva-passa	<i>A. foetidus</i> (01242)	Guaraná
<i>A. carbonarius</i> (01238))	Uva-passa	<i>A. foetidus</i> (01269)	Avelã
<i>A. carbonarius</i> (0131)	Guaraná	<i>A. foetidus</i> (01282)	Cacau
<i>A. carbonarius</i> (0184)	Uva-passa	<i>A. japonicus</i> (01184)	Caverna
<i>A. carbonarius</i> (0187)	Uva-passa	<i>A. japonicus</i> (01148)	Caverna
<i>Aspergillus</i> sp (01162)	Caverna	<i>A. japonicus</i> (0125)	Caverna
<i>A. foetidus</i> (01236)	Guaraná	<i>A. japonicus</i> (01182)	Caverna
<i>A. foetidus</i> (01132)	Uva-passa	<i>A. japonicus</i> (01161)	Caverna
<i>A. foetidus</i> (01133)	Uva-passa	<i>A. niger</i> (01217)	Arroz
<i>A. foetidus</i> (01134)	Uva-passa	<i>A. niger</i> (01270)	Pistache
<i>A. foetidus</i> (01135)	Uva-passa	<i>A. niger</i> (01272)	Pistache
<i>A. foetidus</i> (01158)	Uva-passa	<i>A. niger</i> (0191)	Uva-passa
<i>A. foetidus</i> (0143)	Uva-passa	<i>A. niger</i> (01122)	Uva-passa
<i>A. foetidus</i> (01119)	Uva-passa	<i>A. niger</i> (01129)	Uva-passa
<i>A. foetidus</i> (01124)	Uva-passa	<i>A. niger</i> (01171)	Uva-passa
<i>A. foetidus</i> (01125)	Uva-passa	<i>A. niger</i> (01202)	Caverna
<i>A. foetidus</i> (0168)	Uva-passa	<i>A. niger</i> (0122)	Uva-passa
<i>A. foetidus</i> (01254)	Feijão	<i>A. niger</i> (0123)	Uva-passa
<i>A. foetidus</i> (01204)	Caverna	<i>A. niger</i> (01197)	Caverna
<i>A. foetidus</i> (01340)	Avelã	<i>A. niger</i> (01198)	Uva-passa
<i>A. foetidus</i> (01123)	Uva-passa	<i>A. niger</i> (01278)	Uva-passa

(...Continua...)

TABELA 1, Cont.

Espécie	Origem	Espécie	Origem
<i>A.niger</i> (0124)	Uva-passa	<i>A.niger</i> Agregado (0176)	Café
<i>A.niger</i> (0175)	Uva-passa	<i>A.niger</i> Agregado (01235)	Guaraná
<i>A.niger</i> (01209)	Castanha	<i>A.niger</i> Agregado (01239)	Uva-passa
<i>A.niger</i> (0115)	Uva-passa	<i>A.niger</i> Agregado (01172)	Uva-passa
<i>A.niger</i> (0105)	Uva-passa	<i>A.niger</i> Agregado (01147)	Guaraná
<i>A.niger</i> (0166)	Uva-passa	<i>A.niger</i> Agregado (0119)	Uva-passa
<i>A.niger</i> (0116)	Uva-passa	<i>A.niger</i> Agregado (01137)	Uva-passa
<i>A.niger</i> (0117)	Uva-passa	<i>A.niger</i> Agregado (01175)	Uva-passa
<i>A.niger</i> (0183)	Uva-passa	<i>A.niger</i> Agregado (01289)	Cacau
<i>A.niger</i> (01115)	Uva-passa	<i>A.niger</i> Agregado (01257)	Feijão
<i>A.niger</i> (01121)	Uva-passa	<i>A.niger</i> Agregado (01336)	Avelã
<i>A.niger</i> (01278)	Amêndoa	<i>A.niger</i> Agregado (0192)	Uva-passa
<i>A.niger</i> (01207)	Caverna	<i>A.niger</i> Agregado (01215)	Pistache
<i>A.niger</i> (01292)	Castanha	<i>A.niger</i> Agregado (01191)	Caverna
<i>A.niger</i> (0165)	Uva-passa	<i>A.niger</i> Agregado (01174)	Pistache
<i>A.niger</i> (01216)	Uva-passa	<i>A.niger</i> Agregado (01273)	Uva-passa
<i>A.niger</i> (01345)	Uva-passa	<i>A.niger</i> Agregado (0180)	Caverna
<i>A.niger</i> (01224)	Guaraná	<i>A.niger</i> Agregado (01219)	Pimenta
<i>A.niger</i> (01343)	Uva-passa	<i>A.tubingensis</i> (01248)	Uva-passa
<i>A.niger</i> (81)	Castanha	<i>A.tubingensis</i> (01196)	Uva-passa
<i>A.niger</i> (84)	Café	<i>A.tubingensis</i> (01176)	Uva-passa
<i>A.niger</i> (78)	Café	<i>A.tubingensis</i> (01200)	Uva-passa
<i>A.niger</i> (75)	Uva-passa	<i>A.tubingensis</i> (0102)	Uva-passa
<i>A.niger</i> (72)	Uva-passa	<i>A.tubingensis</i> (01144)	Uva-passa
<i>A.niger</i> (01208)	Amêndoa	<i>A.tubingensis</i> (01260)	Uva-passa
<i>A.niger</i> (01210)	Cacau	<i>A.tubingensis</i> (01233)	Uva-passa

2.2 Morfologia e características fisiológicas

Após a obtenção das culturas em Malt Extract Ágar (MA), os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultivo Czapeck Yeast Ágar (CYA), incubadas às temperaturas de 25 °C e 37 °C por 7 dias, Extrato de Malte (MEA) a 25 °C, em Otmeal Ágar CBS (OA) a 25 °C, e Czapeck Yeast Extract Agar com 20% de Sacarose (CY20S) a 25 °C por 7 dias. Após 7 dias de crescimento foram observadas as características morfológicas (macroscópicas e microscópicas) descritas conforme Klich (2002), Samson et al. (2004, 2007).

Para avaliação das características microscópicas foram retirados micélios dos fungos. Estes micélios foram lavados em álcool 50% para eliminar

o excesso de esporos. Em seguida, uma gota de corante azul de metila foi adicionada sobre a lâmina contendo o micélio. Posteriormente, uma lamínula foi colocada sobre o micélio e pressionada. A lâmina foi levada ao microscópio de luz para observação das seguintes características: comprimento do conidióforo, forma e tamanho dos conídios, vesículas, métulas e fiálides, textura dos conídios e do conidióforo.

2.3 Crescimento e produção de ácido em meio de cultura CREA (Creatine Sucrose Ágar)

A habilidade de crescimento e a produção de ácido das culturas foram testadas em meio Creatine Sucrose Ágar (CREA), conforme Frisvad et al. (2004) e Samson et al. (2004).

2.4 Determinação do potencial ocratoxigênico das espécies identificadas

Para a determinação do potencial toxigênico das espécies utilizou-se a metodologia de Plug Agar, descrita por Filtenborg & Frisvad (1980).

2.5 Extração, sequenciamento e análise molecular

2.5.1 Obtenção de micélio para a extração de DNA Genômico

No total, foram analisados 14 isolados pertencentes à Seção *Nigri*. Inicialmente foi realizada uma suspensão monospórica para cada isolado. Em seguida, os conídios de cada isolado foram inoculados em meio completo líquido (Pontecorvo et al., 1953) e incubados a 28 °C, por 24 horas, a 180 rpm. O DNA genômico foi extraído de acordo com Azevedo et al. (2000) e quantificado pelo método do fluorímetro (Dyna Quant, Pharmacia).

2.5.2 PCR do Gene β -tubulina

A amplificação do gene β -tubulina utilizou os primers Bt1a e Bt1b de acordo com Glass & Donaldson (1995). O volume final de cada reação foi 25 μ L, contendo 2,5 μ L de tampão (200 mM Tris-HCl, pH 8,4 – 500 mM KCl, 1 x concentrado), 2,0 μ L de dNTPs (2,5 mM), 1,5 μ L de cada um dos iniciadores (Invitrogen – 10 pmol μ L⁻¹), 1,0 μ L MgCl₂ (50 mM), 0,2 μ L Taq DNA polymerase (5 U μ L⁻¹), 2 μ L DNA (5 ng μ L⁻¹) e 14,3 μ L de água destilada. A mistura da reação foi colocada em um termociclador PTC – 100 (MJ Research, Inc.) programado para 35 ciclos após uma desnaturação inicial de 4 minutos a 92°C. A amplificação de cada ciclo consistiu de três etapas: desnaturação (92 °C, 40 s), anelamento (55 °C, 1 min e 30 s) e alongamento (72 °C, 2 min). Alongamento final a 72 °C por 5 min foi usado. A amplificação dos fragmentos foi realizada por gel de eletroforese em tampão TEB 1 x de acordo com Sambrook & Russel (2001). Os géis de agarose 1% foram tratados com brometo de etídio e as bandas, visualizadas em luz UV.

2.5.3 Sequenciamento do Gene β -tubulina

Os fragmentos do gene β -tubulina foram amplificados por PCR e sequenciados de acordo com Sanger et al. (1977). Para o sequenciamento foram utilizados 10 μ L do produto da reação, contendo 2,0 μ L do primer β -tubulina (Invitrogen – 3,0 μ mL⁻¹), 4,0 μ L de DYEnamic ET terminator (Amersham Biosciences) e 4,0 μ L do produto amplificado do rDNA (100 ng μ L⁻¹). A reação foi submetida ao termociclador Mastercycle gradient (Eppendorf), programado para executar 35 ciclos após desnaturação inicial (95 °C, 2 min.). Cada ciclo consistiu de três etapas: desnaturação (95 °C, 1 min.), anelamento (55 °C, 1 min) e alongamento (60 °C, 1 min). No final dos ciclos, houve uma etapa final de alongamento (60 °C, 5 min). O sequenciamento foi realizado em um

MegaBACE™ 1000 sequencer (Amersham Biosciences). As condições de eletroforese foram 2 Kv/60 s e 6 Kv/230 min, respectivamente.

2.5.4 Análise das sequências

A qualidade das sequências foi examinada por Phre/Phrap/Consel package. Para a identificação dos isolados, as sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas com as que já estão depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology e Information (NCBI), utilizando a ferramenta de pesquisa BLAST (Altschul et al., 1990).

2.6 Preparo das amostras para análise de microscopia eletrônica de varredura

Sete isolados representativos de cada espécie analisada neste trabalho, pertencente à Seção *Nigri* (Tab. 1), foram inoculados em CYA 25 °C por 5 dias. Após o período de incubação, discos das amostras foram imersos em solução fixativa (Karnovsky's modificado glutaraldeído 2,5% - paraformaldeído 2,5%, tampão cacodilato 0,05M) pH 7,2 por um período de 24 h. Em seguida, foram lavados em tampão cacodilato (três vezes de 10 min), pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora e lavados 3 vezes em água destilada, seguida da desidratação em uma série de acetona (25, 50, 75, 90 uma vez cada e 100% por três vezes). Depois as amostras foram levadas para o dessecador contendo sílica para completar a secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs*, com fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro em evaporador (BALZERS SCD 050) e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, diversas imagens para cada amostra.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Morfologia das colônias

Os isolados pertencentes à Seção *Nigri* se caracterizam por apresentar conídios de coloração marrom-escuros a negros, com estruturas dos conidióforos unisseriadas ou bisseriadas, vesículas esféricas e hifas hialinas ou levemente pigmentadas próximo ao ápice (Klich & Pitt, 1988).

As Figuras 1 e 2 apresentam as características de crescimento das espécies Seção *Nigri* estudadas em CYA e MEA 25 °C após 7 dias de cultivo. *Aspergillus* sp nov. pôde ser diferenciado devido à sua baixa capacidade de esporulação e à abundante produção de esclerócios, que se apresentam em formato ovalado e com coloração amarelo-laranja com tons de cinza. *Aspergillus* sp nov assemelha-se morfológicamente à espécie *A. costaricensis*, que também apresenta pouca capacidade de esporulação e produção abundante de esclerócios. Porém, *Aspergillus* sp pode ser diferenciada macroscopicamente de *A. costaricensis* através da coloração do micélio. *Aspergillus* sp exibe micélio branco, enquanto o micélio de *A. costaricensis* é amarelo. Outras diferenças entre estas duas espécies são a coloração do reverso em MEA 25 °C e a coloração dos esclerócios (Tabela 2 e 3).

A espécie *A. tubingensis* é uma espécie morfológicamente muito semelhante a *A. niger*, sendo difícil sua diferenciação através de dados morfológicos. Porém, neste estudo *A. tubingensis* pôde ser diferenciado através da produção de esclerócios, os quais apresentaram coloração branca para pink característica destas espécies, embora Samson et al. (2004) relatem que a produção de esclerócios por espécies de *A. tubingensis* nem sempre é observada. Estudos demonstram que outras espécies possuem capacidade de produzir estas estruturas, incluindo *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. aculeatus*, *A.*

costaricaensis, *A. piperis*, *A. sclerotioniger*, *A. aculeatinus* e *A. sclerotii carbonarius* (Samson et al., 2004, 2007). Porém, estas estruturas nunca foram observadas em espécies de *A. ibericus* (Serra, 2005).

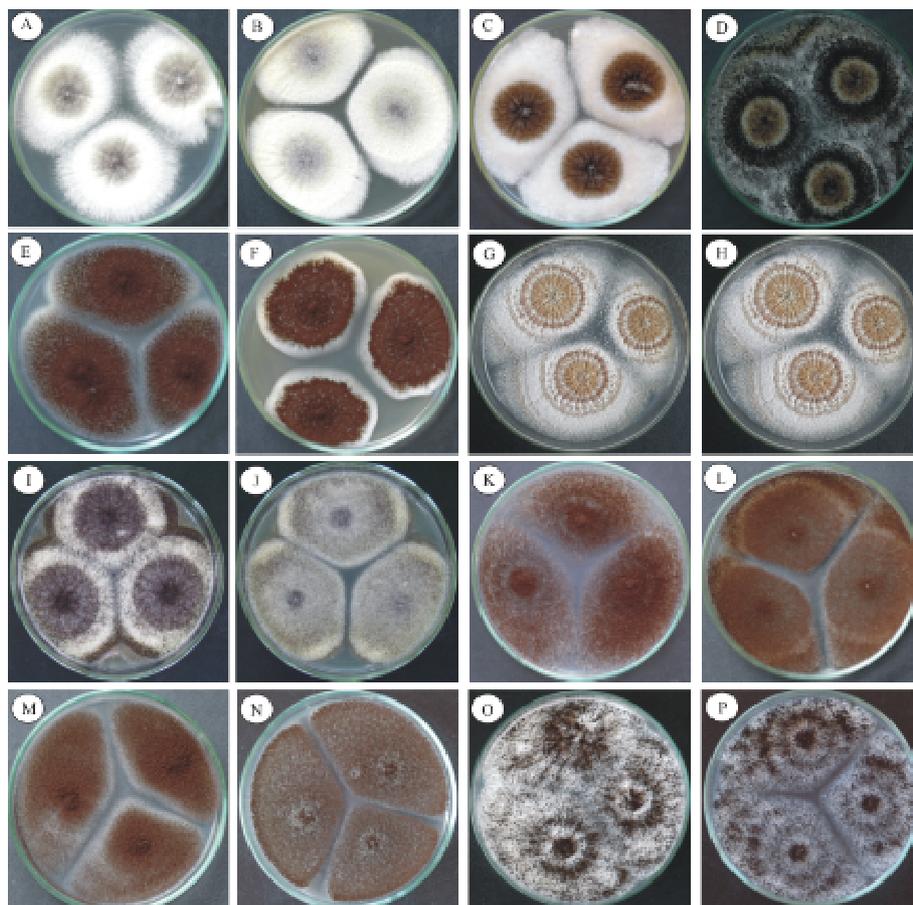


FIGURA 1 Morfologia das colônias de *Aspergillus* Seção *Nigri* em CYA e MEA 25°C após 7 dias. (A-B) *A. aculeatus*; (C-D) *A. carbonarius*; (E-F) *A. foetidus*; (G-H) *Aspergillus* sp; (I-J) *A. japonicus*; (K-L) *A. niger*; (M-N) *A. niger* Agregado; (O-P) *A. tubingensis*.

No entanto, os resultados descrevem também uma semelhança morfológica entre *Aspergillus níger* Agregado e *A. níger*, *A. tubingiensis* e *A. foetidus*. Morfologicamente as diferenças são sutis, conforme já observado por outros autores, como Samson et al. (2004). Em relação às espécies unisseriadas, incluindo *A. japonicus* e *A. aculeatus*, não puderam ser distinguidas somente por suas características morfológicas macroscópicas.

TABELA 2 Características macroscópicas das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*

Espécies	Colônia CYA25°C			Colônia MEA 25°C			Produção de esclerócios	Produção de OTA
	Diâmetro colônia	Cor	Reverso	Diâmetro da colônia	Cor	Reverso		
<i>A. aculeatus</i>	73-76	marrom escuro/tons de cinza	pálido	74-79	marrom escuro/tons de cinza	amarelo pálido	ausente	-
<i>A. carbonarius</i>	65-67	preto	incolor	51-57	preto	incolor	ausente	+
<i>A. foetidus</i>	62-65	marrom escuro para preto	tons de cinza para marrom ao centro	62-66	preto	incolor	ausente	-
<i>A. japonicus</i>	67-73	marrom escuro para tons de cinza	pálido para amarelo	64-70	marrom escuro para preto	incolor	ausente	-
<i>A. niger</i>	67-70	preto para marrom escuro	incolor para amarelo claro	53-69	preto	incolor	ausente	+
<i>A. niger</i> Agregado	65-69	marrom escuro para preto	amarelo pálido	64-68	marrom escuro para preto	amarelo claro	ausente	-
<i>A. tubingensis</i>	65-72	preto	pálido	56-57	preto	incolor	presente	-
<i>Aspergillus</i> sp	75-76	preto	creme	65-71	preto	incolor	presente (abundantes)	-
* <i>A. costaricensis</i>	63-78	Preto	amarelo pálido	26-62	Preto	amarelo	presente (abundantes)	-

**A. costaricensis*– listada na tabela para comparação das características de *Aspergillus* sp.

TABELA 3 Características microscópicas das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*

Espécies	Diâmetro conídios (µm)	Textura conídios	Forma conídios	Diâmetro vesícula (mm)	Ornamentação conídios (MEV)
Unisseriadas					
<i>A. aculeatus</i>	4-5	espinhosos	elipsoidal	31-60	equinulado
<i>A. japonicus</i>	4-5	espinhosos	subglobosos/globoso	16-33	equinulado
Bisseriadas					
<i>A. carbonarius</i>	7-10	rugosos	globoso	49-85	verrucoso
<i>A. foetidus</i>	4-5	delicadamente espinhosos/liso	globoso	34-69	-
33 <i>A. niger</i>	3-5	finamente rugosos/rugoso	globoso/ elipsoidal	20-73	verrucoso
<i>A. niger agregado</i>	4-5	liso/finamente rugoso	globoso	18-54	verrucoso
<i>A. tubingensis</i>	4-5	finamente rugoso/rugoso	globosos/ subglobosos	45-69	equinulado/ verrucoso
<i>Aspergillus</i> sp	4-5	espinhosos/ finamente rugosos	globosos/ subglobosos	10-14	-
<i>A. costaricensis</i>	3.1-4.5	liso/ distintamente rugoso	globoso/subgloboso	45-90	equinulado

**A. costaricensis* – listado na tabela para comparação das características de *Aspergillus* sp.

3.2 Ornamentação dos conídios

As fotomicrografias de luz dos conídios dos isolados da Seção *Nigri* são apresentados na Figura 3. Entre as espécies bisseriadas, *A. carbonarius* pôde ser facilmente distinguida das demais espécies com base no tamanho dos seus esporos, que variou de 7 a 9 µm de diâmetro, alguns alcançando até 10 µm (Figura. 3B). Outras espécies que produzem conídios grandes incluem *A. homomorphus*, *A. sclerotiicarbonarius*, *A. sclerotioniger* (Samson et al., 2004, 2007) e *A. ibericus* (Samson et al., 2004, 2007; Serra, 2005). As demais espécies estudadas exibiram conídios com tamanhos variando entre 3-5µm, o que permitiu diferenciá-las de *A. carbonarius* (Tabela 3). *Aspergillus foetidus*, *A. niger* e *A. tubingensis* também são espécies morfologicamente difíceis de serem distinguidas (Samson et al., 2004); no entanto, *A. foetidus* pôde ser distinguido destas espécies através da ornamentação de seus conídios, os quais, quando formados, apresentam-se delicadamente espinhosos, e após maduros, lisos. As espécies unisseriadas *A. aculeatus* e *A. japonicus* não puderam ser distinguidas pela ornamentação de seus conídios, pois ambas as espécies apresentam conídios espinhosos (Figura. 3A- 3D). Embora estas duas espécies sejam morfologicamente bastante semelhantes, algumas diferenças foram observadas. *A. aculeatus* apresenta vesículas com tamanho maior que as de *A. japonicus*. Outra característica observada que auxiliou na diferenciação destas duas espécies foi com relação à forma dos seus conídios; a espécie de *A. aculeatus* exhibe conídios com forma predominantemente elipsoidal e *A. japonicus*, globosa a subglobosa (Tabela 3). No entanto, Hamari et al. (1997) afirmam que estas duas espécies não podem ser identificadas com base em critérios morfológicos.

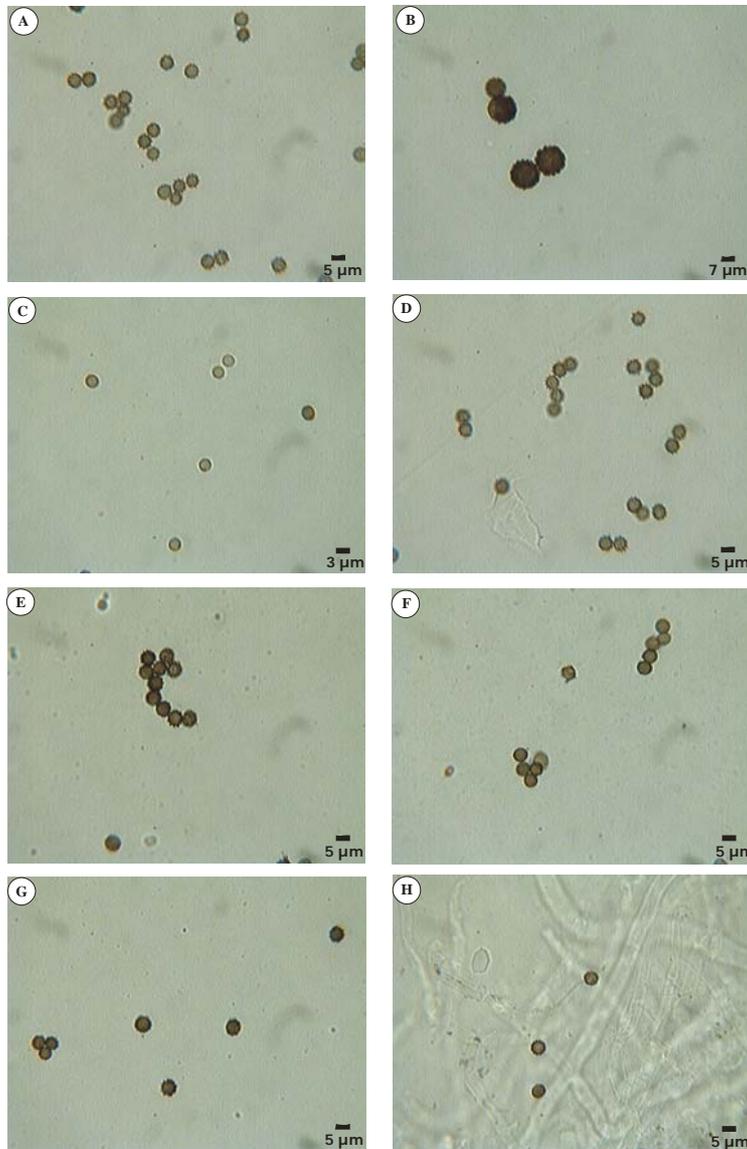


FIGURA 2 Ornamentação dos conídios de *Aspergillus* Seção *Nigri*. (A) *A. aculeatus*; (B) *A. carbonarius*; (C) *A. foetidus*; (D) *A. japonicus*; (E) *A. niger*; (F) *A. niger* agregado; (G) *A. tubingensis*; (H) *Aspergillus* sp.

Aspergillus sp apresentou conídios com ornamentação espinhosa à finamente rugosa, diferente da exibida por *A. costaricensis*, que apresenta conídios lisos a distintamente rugosos. O tamanho da vesícula em *A. costaricensis* (40-90) é maior em relação a *Aspergillus* sp (Tabela 3) (Samson et al., 2004).

A ornamentação dos esporos observados em MEV permitiu distinguir as espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* estudadas em dois grupos: os que apresentam conídios verrucosos e os que possuem conídios equinulados (Figura 5). As espécies que possuem conídios verrucosos foram: *A. niger*, *A. niger* Agregado, *A. carbonarius* e *A. tubingensis*. Os esporos de *A. japonicus* e *A. aculeatus* são distintamente equinulados.

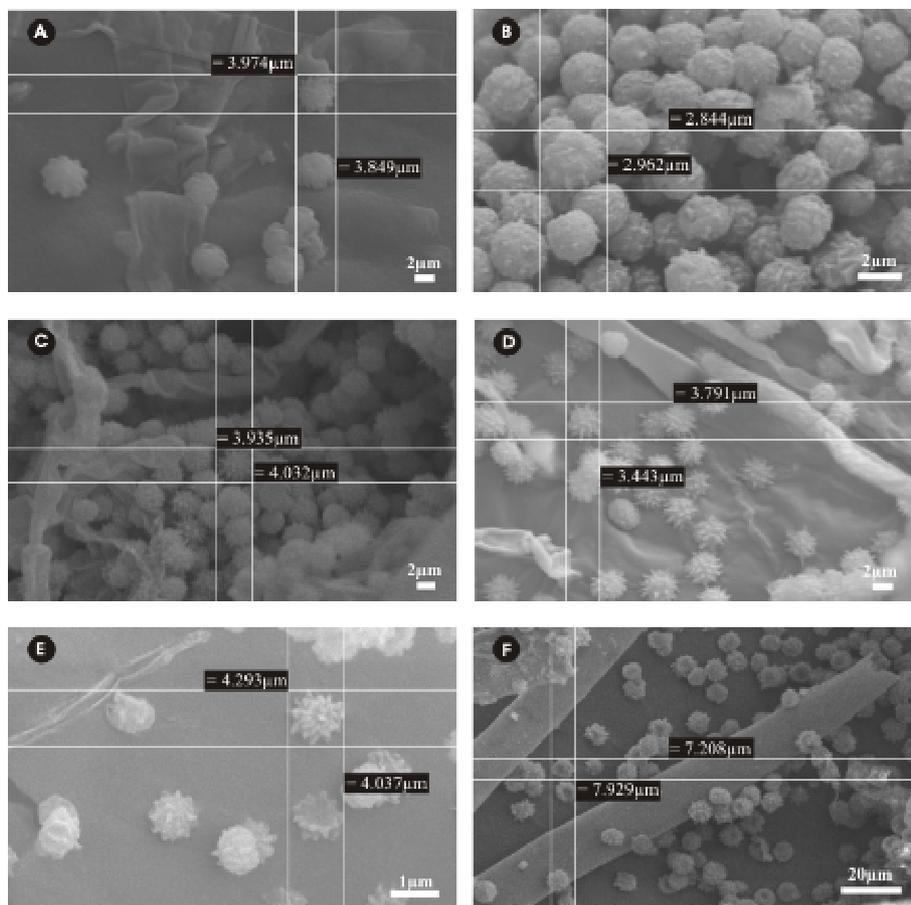


FIGURA 3 Eletromicrografia de Varredura dos conídios de *Aspergillus* Seção *Nigri*. (A) *A. niger*; (B) *A. niger* Agregado; (C) *A. aculeatus*; (D) *A. japonicus*; (E) *A. tubingensis*; (F) *A. carbonarius*.

3.3 Crescimento e produção de ácido em meio de cultura CREA (Creatine Sucrose Ágar)

A habilidade de crescimento e a produção de ácido em Creatine Sucrose Ágar (CREA) foram testadas nas espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* examinadas neste estudo (Figura 5). Este meio seletivo é bastante utilizado para

a classificação de diversas culturas fúngicas, especialmente em espécies do gênero *Penicillium* (Frisvad & Samson, 2004; Samson et al., 2004). Recentemente, este meio foi utilizado para dividir as espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* em grupos (Samson et al., 2007). Todas as espécies testadas apresentaram habilidade de crescimento em CREA, resultando na formação de um halo de coloração amarela em torno das colônias. As espécies bisseriadas *A. carbonarius* (Figura 5-B) e *A. niger* Agregado (Figura 5-F) apresentaram maior habilidade de crescimento neste meio do que as outras espécies testadas e boa produção de ácido. *Aspergillus foetidus* (Figura 5 C), *A. niger* (Figura 5-E), *A. tubingensis* (Figura 5-G) e *Aspergillus* sp (Figura 5-H) apresentaram um crescimento moderado e boa produção de ácido. *Aspergillus* sp (Fig. 5-H), além de boa produção de ácido, apresentou também capacidade de produzir esclerócios neste meio. Segundo Samson et al. (2007) algumas espécies como *A. sclerotii carbonarius* demonstram inabilidade de crescimento em CREA, uma das características que permitem diferenciar esta espécie de *A. carbonarius*, *A. sclerotioniger* e *A. ibericus*, pertencentes à Seção *Nigri*.

Com relação a *A. aculeatus* (Fig. 5-A) e *A. japonicus* (Fig. 5-D), estas espécies unisseriadas apresentaram crescimento também moderado e uma produção limitada de ácido em relação às espécies bisseriadas. Samson et al. (2007) também observaram uma produção limitada de ácido pelas espécies unisseriadas de *A. aculeatus*, *A. japonicus* e *A. uvarum* em CREA.

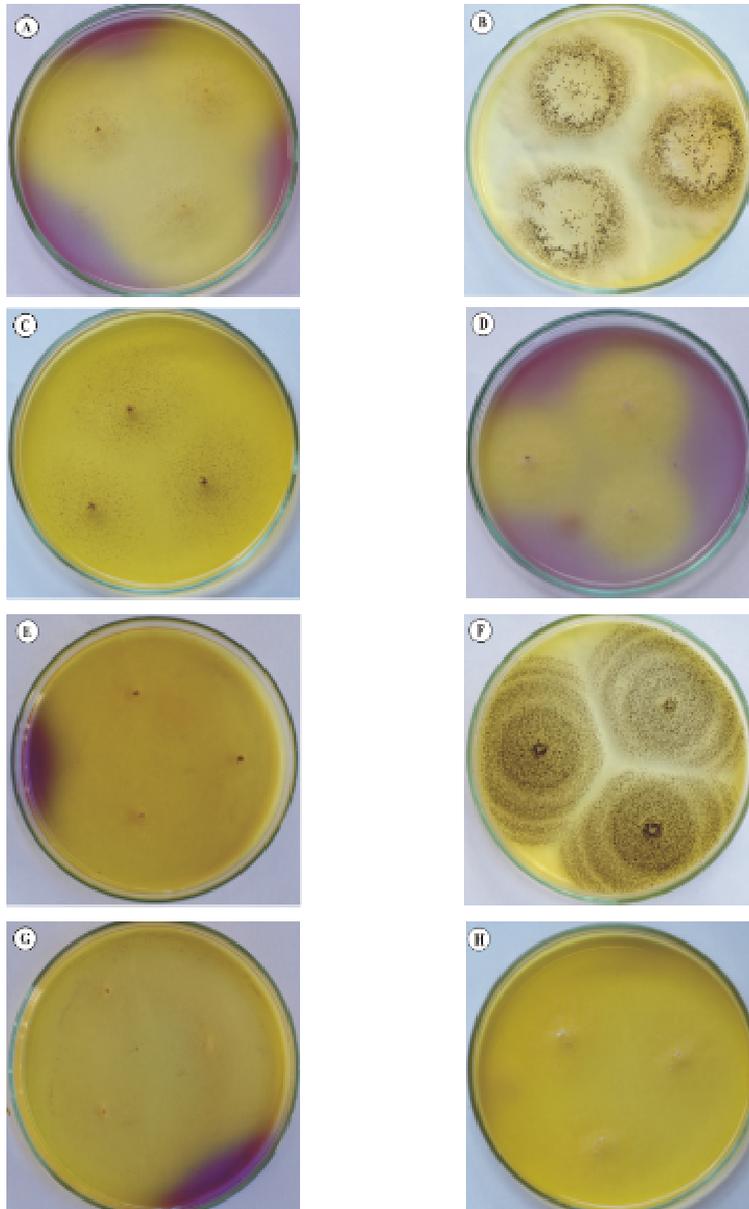


FIGURA 4 Crescimento das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* em placas de Creatine Sucrose Ágar (CREA). (A) *A. aculeatus*; (B) *A. carbonarius*; (C) *A. foetidus*; (D) *A. japonicus*; (E) *A. niger*; (F) *A. niger* Agregado; (G) *A. tubingensis*; (H) *Aspergillus* sp.

3.4 Avaliação do potencial ocratoxigênico

Dos isolados listados na Tabela 1, duas espécies apresentaram-se potencialmente capazes de produzir OTA. Dos 34 isolados de *A. Níger*, 6 espécies foram capazes de produzir OTA. Embora a produção de OTA por estas espécies seja raramente relatada, alguns estudos confirmam *A. niger* como produtor de OTA (Iamanaka et al., 2005; Valero et al., 2007).

Com relação às espécies de *A. carbonarius* das 9 espécies testadas, 6 foram potencialmente capazes de produzir de OTA. Esta espécie é considerada como a maior produtora de OTA em uvas e seus derivados (Rosa et al., 2002).

As demais espécies listadas (Tabela 1) não produziram OTA. No entanto, outros estudos relatam a produção de OTA por espécies de *A. foetidus* (Magnoli et al., 2003) e, recentemente, as espécies de *A. tubingensis* e *A. japonicus* foram relatadas como espécies capazes de produzir OTA (Oliveri et al., 2008). Para Samson et al. (2004), as espécies de *A. tubingensis* nunca foram capazes de produzir OTA. Estes mesmos autores relatam a produção de OTA pelas espécies de *A. carbonarius*, *A. sclerotium*, *A. niger* e *A. lacticoffeatus*, pertencentes à Seção *Nigri*.

3.5 Caracterização molecular para distinguir espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*

O cladograma indica a presença de dois clados na árvore filogenética com base no gene β -tubulina, um clado menor, no qual estão agrupados as espécies unisseriadas *A. japonicus* e *A. aculeatus*, e um clado maior, com espécies pertencentes ao complexo *A. Níger*, que foi subdividido em subclados (Figura 6).

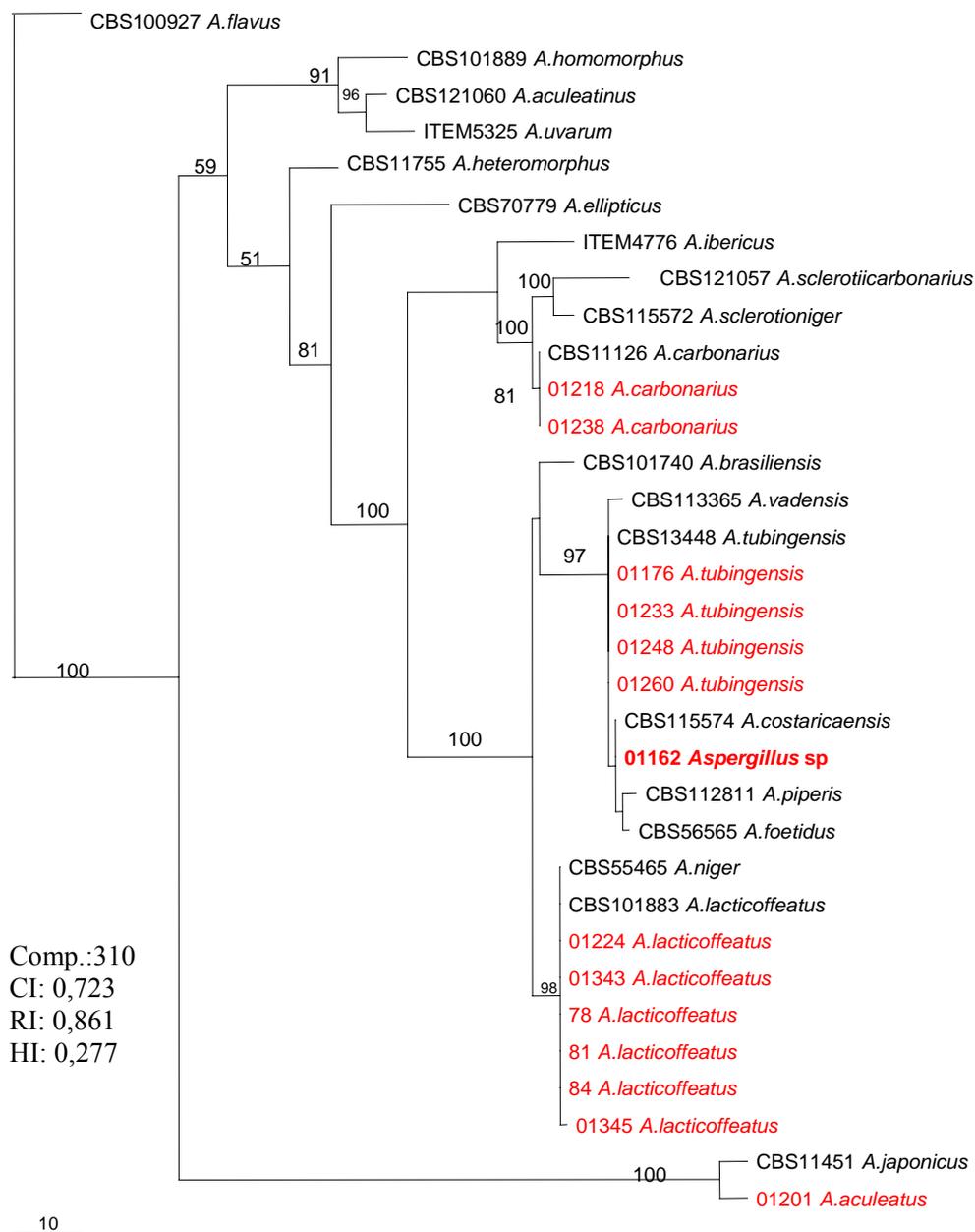


FIGURA 5 Árvore Filogenética de Máxima Parcimônia para o gene β -tubulina de espécies pertencentes à Seção *Nigri*. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de bootstrap (1000 repetições) são indicados em porcentagem nos internódios.

O subclado I é representado pelas espécies unisseriadas *A. homomorphus*, *A. aculeatinus* e *A. uvarum*. O subclado II é representado pela espécie *A. heteromorphus* e o subclado III, pela espécie *A. ellipticus*.

Os isolados 01218 e 01238 agruparam-se junto à espécie *A. carbonarius* presente no subclado IV. As espécies *A. ibericus*, *A. sclerotiicarbonarius* e *A. sclerotioniger*, também presentes neste subclado, formam um grupo distinto por compartilharem alguns caracteres como produção de OTA, produção de esclerócios e conídios com tamanho maiores em relação às demais espécies pertencentes à Seção *Nigri* (Samson et al., 2004, 2007).

O subclado V abrange um grupo maior, incluindo as espécies *A. brasiliensis*, *A. vadensis*, *A. tubingensis*, *A. costaricaensis*, *A. piperis* e *A. foetidus*, *A. niger* e *A. lacticoffeatus*, relacionadas ao complexo *A. niger* (Al-Mussallam, 1980). Este subclado inclui, também, a espécie *Aspergillus* sp (01162), que se agrupou junto à espécie de *A. costaricaensis*. Estas duas espécies puderam ser diferenciadas morfológicamente pelo crescimento e pigmentação do reverso em MEA 25 °C, além da coloração dos esclerócios. A morfologia dos conídios também é diferente, sendo conídios espinhosos e finamente rugosos para *Aspergillus* sp e lisos e distintamente rugosos para *A. costaricaensis*. O tamanho da vesícula em *A. costaricaensis* (40-90) é maior do que as de *Aspergillus* sp.

Os isolados 01176, 01233, 01248, 01260, também presentes no subclado V, agruparam-se junto à espécie *A. tubingensis*. *A. tubingensis* é uma espécie morfológicamente muito semelhante de *A. niger*. Porém, *A. tubingensis* pôde ser diferenciado pela produção de esclerócios de coloração branco para pink característico desta espécie; esta estrutura raramente é observada em espécies de *A. niger* (Samson et al., 2004). Apesar de *A. tubingensis* e *A. niger* serem difíceis de serem diferenciados utilizando métodos fenotípicos, estas espécies podem ser distinguidas através do sequenciamento do gene β -tubulina (Vries et al., 2005).

Com base em caracteres morfológicos, os isolados 01224, 01343, 78, 81, 84 e 01345 foram classificados como *A. niger*. A análise filogenética revelou que estes isolados se posicionaram próximos de *A. lacticoffeatus*. *A. lacticoffeatus* é uma espécie relatada como sendo muito próxima de *A. niger*. Segundo Samson et al. (2004), com base nas sequências do gene β -tubulina, estas duas espécies não podem ser separadas, pois apresentam sequências idênticas (Samson et al., 2004; Varga et al., 2007), embora Geiser et al. (2007) relatem que estas duas espécies podem ser distinguidas utilizando sequências de β -tubulina. Para Samson et al. (2004), morfológicamente *A. lacticoffeatus* pode ser distinguido de *A. niger* através da ornamentação e cor dos conídios, da pigmentação em meio de cultura e do perfil de metabólitos secundários (extrólitos).

O clado I é representado por espécies unisseriadas. O isolado 01201, caracterizado como *A. aculeatus*, posicionou-se junto à espécie *A. japonicus*. E embora estas duas espécies sejam morfológicamente bastante semelhantes, algumas diferenças permitem diferenciá-las (Tabela 3).

4 Descrição morfológica de uma nova espécie de *Aspergillus* Seção *Nigri*

A nova espécie do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, proposta neste estudo como *Aspergillus caveniger* sp nov, foi isolada de uma caverna localizada no Município de Montalvânia (MG), na região de Minas Gerais, Brasil. Esta espécie diferencia-se das demais espécies da Seção *Nigri* pela baixa esporulação em meios de cultura padronizados como CYA, OA, CY20S e MEA a 25 °C. Morfológicamente, *A. caveniger* se assemelha a *A. costaricensis*. Estas duas espécies podem ser diferenciadas morfológicamente pelo crescimento e pigmentação do reverso em MEA 25 °C, além da coloração dos esclerócios. A morfologia dos conídios também é diferente, sendo conídios espinhosos a finamente rugosos para *A. caveniger* e lisos a distintamente rugosos para *A. costaricensis*. O tamanho da vesícula em *A. costaricensis* (40-90) e os esclerócios, que são características distinguíveis desta espécie segundo Sansom et al. (2004), são diferentes de *A. caveniger*.

A. caveniger não pôde ser separado com base na sequência de β -tubulina, conforme já observado por Sansom et al. (2007) para diferenciação de *A. lacticoffeatus* e *A. niger*. Naquele estudo, os autores utilizaram as características de ornamentação e cor dos conídios e pigmentação em meio de cultura padronizada para diferenciar as duas espécies, além do perfil de metabólitos secundários (extrolitos). Características semelhantes foram utilizadas para diferenciar *A. caveniger* e *A. costaricensis*. O nome *A. caveniger* sp nov se deve ao gênero e à Seção a que pertence o isolado e por ter sido isolado de uma caverna.

Aspergillus caveniger sp nov Silva, Batista, Sartori, Fungaro

Diâmetro das colônias após 7 dias de cultivo a 25 °C, em mm: CYA: 75-76; MEA: 65-71; YES: 68-74; OA: 47-51; CY20S: 63-66; CREA: 50-58, ausência de esporulação, produção de esclerócios e boa produção de ácido; CYA 37 °C: 68-76.

Coloração e textura das colônias. Em CYA 25 °C, conidióforos em baixa quantidade, coloração preta; micélio branco; reverso creme; colônias planas e sulcadas; exsudato incolor; esclerócios presentes em abundância (50-70µm), ovalado, amarelo-laranja com tons de cinza; MEA, ausência de esporulação, cor da colônia influenciada pela alta concentração de esclerócios presentes; reverso creme para cinza ao centro; esclerócios abundantes, marrom escuro para tons de cinza, presença de hifas estéreis sobre os esclerócios; colônias planas e sulcadas; micélio branco; exsudato incolor.

Características microscópicas. Cabeça conidial radiada; estipe (120) 220-390 (750) x (4) 5-7µm, incolor, paredes lisas; vesículas globosas a subglobosas, (10) 14-24µm; bisseriada; métula (6) 11-15µm; fiálide (3) 5-7µm; conídios globosos a subglobosos para elipsoidais 4-5.5µm, paredes espinhosas a finamente rugosas.

Características distintivas: esta espécie é caracterizada pela produção abundante de esclerócios amarelo-laranja com tons de cinza, pelas vesículas pequenas e pela baixa esporulação.

Habitat: Caverna (Brasil)

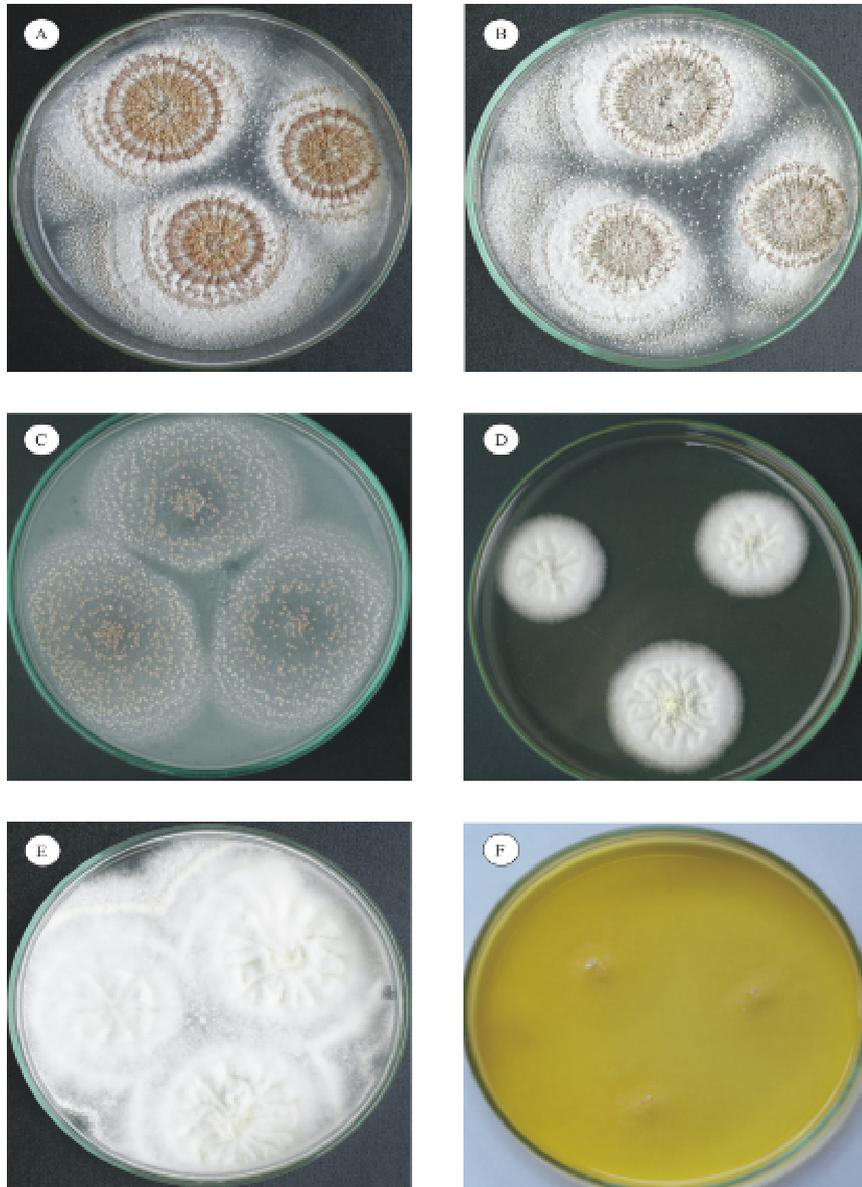


FIGURA 6 Crescimento das colônias de *Aspergillus caveniger* sp. nov após 7 dias de cultivo em (A) CYA 25 °C e (B) MEA 25 °C; (C) OA 25 °C; (D) YES 25 °C; (E) CY20S 25 °C; (F) CREA 25 °C.

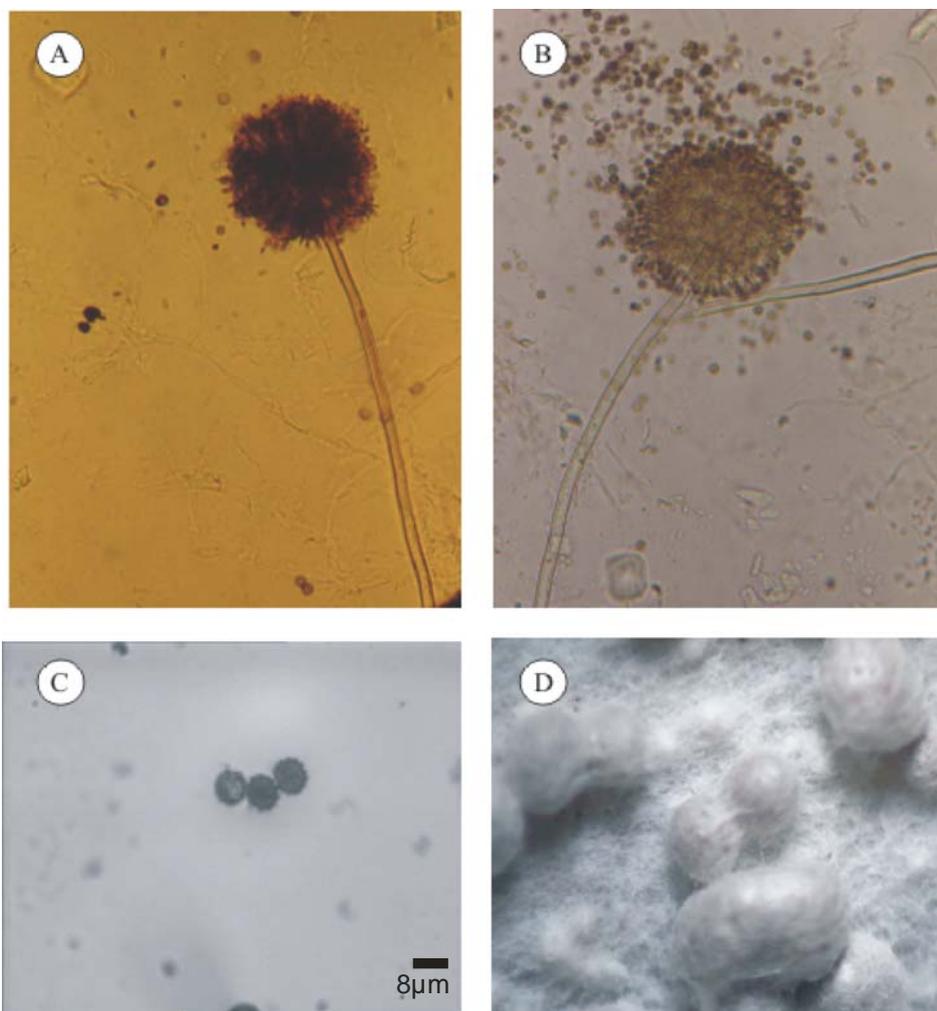


FIGURA 7 *Aspergillus caveniger* sp. nov. (A-B) Estruturas microscópicas em microscopia de luz; (C) Fotomicrografia de conídios; (D) Estereoscopia de esclerócios.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a Taxonomia Polifásica mostrou ser o método mais preciso para a identificação das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*.

Este estudo propõe, também, uma nova espécie de *Aspergillus* Seção *Nigri*, *Aspergillus caveniger* **sp nov Silva, Batista, Sartori e Fungaro**, isolada da caverna Gruta da Igreja Nossa Senhora Perpétuo Socorro, localizada no Município de Montalvânia, MG.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. Dr. Rodrigo Lopes Ferreira, do Departamento de Biologia, à sua equipe, ao CNPq, através do financiamento do Projeto “Estrutura das Comunidades Cavernícolas da Caatinga Brasileira”. Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de fitopatologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA e à Fapemig.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black *aspergilli*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 86, n. 1, p. 33-49, 2004.

AL-MUSSALAM, A. **Revision of the black *Aspergillus* species**. 1980. Thesis (Ph.D.) - University of Utrecht, Netherlands.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOZA-GOMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina Hyphomycetes*) isolates. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, p. 729-732, 2000.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A sample screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, London, v. 13, n. 3, p. 128-130, 1980.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: a guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 49, p. 1-173, 2004.

GEISER, D. M.; KLICH, M. A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S. W.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 59, p. 1-10, 2007.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous *Ascomycetes*. **Applied Environmental Microbiology**, New York, v. 61, p. 1323-1330, 1995.

HAMARI, Z.; KEVEI, F.; KOVÁCS, E.; VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z.; CROFT, J. H. Molecular and phenotypic characterization of *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* strains with special regard to their mitochondrial DNA polymorphisms. **Antonie Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 72, p. 337-347, 1997.

IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; MENEZES, H. C.; VICENTE, E.; FUNGARO, M. H. P. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, Londrina, v. 22, p. 1258-1263, 2005.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. North Ryde: [s.n.], 1988. 197 p.

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; SCOTT, E. S. *Aspergillus* producing ochratoxin A: isolation from vineyards soils and infection of Semillon bunches in Australia. **Journal Applied Microbiology**, Sydney, v. 102, p. 124-33, 2007.

MAGNOLI, C.; VIOLANT, M.; COMBINA, M.; PALACIO, G.; DALCERO, A. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 179-184, 2003.

OLIVERI, C.; TORTA, L.; CATARA, V. A polyphasic approach to the identification of ochratoxin A-producing black *Aspergillus* isolates from vineyards in Sicily. **International Journal of Food Microbiology**, Rome, v. 127, p. 147-154, 2008.

PITT, J. L.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593 p.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MacDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-148, 1953.

ROSA, C. A. da R.; PALACIOS, V.; COMBINAS, M.; FRAGA, M. E.; OLIVEIRA, R.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M. Potential ochratoxin A from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**, Buenos Aires, v. 19, p. 408-414, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. No page.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; FRANK, M. J.; FRISVAD, J. C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 50, p. 45-61. 2004.

SAMSON, R. A.; NOONIM, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black *aspergilli*. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 59, p. 129-145, 2007.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SERRA, R. M. A. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A**. 2005. 330 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Lisboa.

VALERO, A.; OLIVÁN, A.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Effect of intra and interspecific interaction on OTA production by *A.* section *Nigri* in grapes during dehydration. **Food Microbiology**, London, v. 24, p. 254-259, 2007.

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; TÓTH, B.; FRISVAD, J. C.; PERRONE, G.; SUSCA, A.; MEIJER, M.; SAMSON, R. A. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Netherlands, v. 57, p. 1925-1932, 2007.

VRIES, R. P. de; FRISVAD, J. C.; VONDERVOORT, P. J. I.; BURGERS, K.; KUIJPERS, A. F. A.; SAMSON, R. A.; VISSER, J. *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black *Aspergilli*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Netherlands, v. 87, p. 195-203, 2005.

CAPÍTULO 3

Aspergillus gruticola sp nov, NOVA ESPÉCIE DO GÊNERO *Aspergillus* SEÇÃO *Flavi* ISOLADO DE CAVERNA NO BRASIL

RESUMO

Uma nova espécie de *Aspergillus* Seção *Flavi*, *Aspergillus gruticola*, isolada de ambiente cavernícola, é proposta neste trabalho. Com base na Taxonomia Polifásica utilizando caracteres morfológicos, fisiológicos e moleculares (sequenciamento do gene β -tubulina), este trabalho objetivou descrever uma nova espécie de *Aspergillus* pertencente à Seção *Flavi*. As características morfológicas de *Aspergillus gruticola* foram comparadas com as principais espécies de *Aspergillus* Seção *Flavi*. *A. gruticola* assemelha-se morfológicamente a algumas espécies pertencentes à Seção *Flavi*; porém, esta espécie apresenta características macroscópicas e microscópicas que permitiram diferenciá-la das demais espécies, tais como o crescimento a 37 °C em CYA, a ornamentação de seus conídios e a coloração de suas colônias. Caracteres fisiológicos também auxiliaram na diferenciação de *A. gruticola*, pois esta espécie não apresenta capacidade para produção de aflatoxinas; a sua produção de metabólitos voláteis de aroma cítrico foi característica principalmente em meio YES, característica não relatada em outras espécies da Seção *Flavi*; e em meio CREA esta espécie apresenta crescimento moderado e baixa produção de ácido. Análise filogenética do gene β -tubulina deste isolado revelou que *A. gruticola* é, filogeneticamente, uma espécie distinta das demais espécies pertencentes à Seção *Flavi*.

Palavras-chave: *Aspergillus gruticola*, Taxonomia Polifásica, Seção *Flavi*

Comitê Orientador: Dr. Luís Roberto Batista – UFLA (Orientador)

ABSTRACT

A new *Aspergillus gruticola* species (Flavi Section), *Aspergillus gruticola*, isolated from a cave environment, is proposed in this study. On the basis of Polyphasic Taxonomy, by using morphological, physiological and molecular (β -tubulin gene sequencing) characters, this work aimed to report a new species of *Aspergillus* belonging to the *Flavi* Section. The morphologic characteristics of *Aspergillus gruticola* were compared with the main species of *Aspergillus Flavi* section. *A. gruticola* is similar morphologically to some species belonging to the *Flavi* Section, but this species presents macroscopic and microscopic characteristics which allowed to distinguish it from the other species, such as growth at 37 °C on CYA, ornamentation of its conidia and color of its colonies. Physiologic characters also helped in the differentiation of *A. gruticola*, since this species does not present a capacity for aflatoxin production, its production of volatile metabolites with citric odor was characteristic, chiefly on YES medium, a characteristic not reported in other species of the *Flavi* section. And on CREA medium, this species presents moderate growth and low acid production. The phylogenetic analysis of β -tubulin gene has revealed that *A. gruticola* is phylogenetically, a species distinct from the other species belonging to the *Flavi* Section.

Key words: *Aspergillus gruticola*, Taxonomy Polyphasic, Section *Flavi*

Guidance Committee: Dr Luís Roberto Batista - UFLA (Major Professor)

1 INTRODUÇÃO

Os *Aspergillus* pertencentes à Seção *Flavi* incluem espécies que apresentam conídios com coloração verde-amarelo para verde-oliva com tons de marrom (Klich, 2002). Estas espécies são as principais responsáveis pela presença de aflatoxinas em alimentos e rações. As principais espécies aflatoxigênicas são *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. toxicarius* (Murakami, 1971; Murakami et al., 1982; Frisvad et al., 2004) e *A. parvisclerotigenus* (Saito & Tsurota, 1993; Frisvad et al., 2004) e, recentemente, as espécies *A. arachidicola* e *A. minisclerotigenus* (Pildain et al., 2008). As espécies *A. caelatus*, *A. oryzae*, *A. tamarii* e *A. sojae* são descritas como espécies não aflatoxigênicas (Ito et al., 1999). Estas espécies têm sido amplamente utilizadas em processos industriais, na fermentação de comidas orientais (Hara et al., 1992; Klich, 2002).

Este estudo descreve a identificação de uma nova espécie da seção *Flavi*, designada como *Aspergillus gruticola*, isolada de ambiente cavernícola utilizando caracteres morfológicos e análise filogenética do gene β -tubulina. Os ambientes cavernícolas apresentam um grande potencial microbiológico ainda pouco explorado. A identificação de uma nova espécie de fungo neste ambiente ressalta a importância de novos estudos relacionados a estes ambientes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Os isolados examinados neste estudo foram obtidos na Gruta do Brejinho, uma gruta calcária localizada na Caatinga do Nordeste Brasileiro (Araripe, CE). A purificação e identificação destes isolados ocorreram no Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência dos Alimentos – DCA da Universidade Federal de Lavras – MG.

2.2 Métodos

2.2.1 Análise morfológica

Os isolados (12) foram purificados em meio Malte Ágar (MA – Extrato de Malte) a 25 °C por 7 dias. A partir das culturas puras em MA, os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo Czapeck Yeast Ágar (CYA) às temperaturas de 25 °C e 37 °C, MEA (Ágar Extract Malt) a 25 °C, OA (Oatmeal Ágar CBS) à temperatura de 25° C e CY20S (Czapeck Yeast Extract Ágar com 20% de Sacarose a 25 °C por um período de 7 dias. A identificação destas espécies do gênero *Aspergillus* foi realizada de acordo com o manual de identificação de Klich (2002), amparado por Christensen (1982), Horn (1997), Ito et al. (2001), Peterson et al. (2001) e Pildain et al. (2008).

Para avaliação das características microscópicas foram retirados micélios dos isolados. Estes micélios foram lavados em álcool 50% para eliminar o excesso de esporos. Em seguida, uma gota de corante azul de metila foi adicionada sobre a lâmina contendo o micélio. Posteriormente, uma lamínula foi colocada sobre o micélio e pressionada. A lâmina foi levada ao microscópio de luz para observação das seguintes características: comprimento do conidióforo, forma e tamanho dos conídios, vesículas, métulas e fiáldes, textura dos conídios e do conidióforo.

2.3 Determinação do potencial aflatoxigênico

Para a determinação do potencial toxigênico das espécies utilizou-se a metodologia de Plug Ágar descrita por Filtenborg & Frisvad (1980).

2.4 Crescimento e produção de ácido em meio de cultura CREA (Creatine Sucrose Ágar)

A habilidade de crescimento e a produção de ácido das culturas foram testadas em meio Creatine Sucrose Ágar (CREA), conforme Frisvad et al. (2004) e Samson et al. (2004).

2.5 Preparo das amostras para análise de microscopia eletrônica de varredura

Dois isolados *Aspergillus gruticola* foram inoculados em CYA 25°C por 5 dias. Após o período de incubação, discos das amostras foram imersos em solução fixativa (Karnovsky's modificado glutaraldeído 2,5% - paraformaldeído 2,5%, tampão cacodilato 0,05M) pH 7,2, por um período de 24 h. Em seguida, foram lavados em tampão cacodilato (três vezes de 10 min), pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora e lavados 3 vezes em água destilada, seguida da desidratação em uma série de acetona (25, 50, 75, 90 uma vez cada e 100% por três vezes). Depois as amostras foram levadas para o dessecador contendo sílica para completar a secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs*, com fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro em evaporador (BALZERS SCD 050) e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, diversas imagens para cada amostra.

2.6 Extração, sequenciamento e análise molecular

2.6.1 Obtenção de micélio para a extração de DNA Genômico

No total, foram analisados 02 isolados pertencentes à Seção *Flavi*. Inicialmente foi realizada uma suspensão monospórica de cada isolado. Os conídios de cada isolado foram inoculados em meio completo líquido (Pontecorvo et al., 1953) e incubados a 28°C, por 24 horas, a 180 rpm. O DNA genômico foi extraído de acordo com Azevedo et al. (2000) e quantificado pelo método do fluorímetro (Dyna Quant, Pharmacia).

2.6.2 PCR do Gene β -tubulina

A amplificação do gene β -tubulina utilizou os primers Bt1a e Bt1b de acordo com Glass & Donaldson (1995). O volume final de cada reação foi 25 μ L, contendo 2,5 μ L de tampão (200 mM Tris-HCl, pH 8,4 – 500 mM KCl, 1 x concentrado), 2,0 μ L de dNTPs (2,5 mM), 1,5 μ L de cada um dos iniciadores (Invitrogen – 10 pmol μ L⁻¹), 1,0 μ L MgCl₂ (50 mM), 0,2 μ L Taq DNA polymerase (5 U μ L⁻¹), 2 μ L DNA (5 ng μ L⁻¹) e 14,3 μ L de água destilada. A mistura da reação foi colocada em um termociclador PTC – 100 (MJ Research, Inc.) programado para 35 ciclos após uma desnaturação inicial de 4 minutos a 92 °C. A amplificação de cada ciclo consistiu de três etapas: desnaturação (92 °C, 40 s), anelamento (55 °C, 1 min e 30 s) e alongamento (72 °C, 2 min). Alongamento final a 72 °C por 5 min foi usado. A amplificação dos fragmentos foi realizada por gel de eletroforese em tampão TEB 1 x, de acordo com Sambrook & Russel (2001). Os géis de agarose 1% foram tratados com brometo de etídio e as bandas, visualizadas em luz UV.

2.6.3 Sequenciamento do Gene β -tubulina

Os fragmentos do gene β -tubulina foram amplificados por PCR e sequenciados de acordo com Sanger et al. (1977). Para o sequenciamento foram

utilizados 10 μL da reação, contendo 2,0 μL do primer β -tubulina (Invitrogen – 3,0 μmL^{-1}), 4,0 μL de DYEnamic ET terminator (Amersham Biosciences) e 4,0 μL do produto amplificado do rDNA (100 ng μL^{-1}). A reação foi submetida ao termociclador Mastercycle gradient (Eppendorf), programado para executar 35 ciclos após desnaturação inicial (95° C, 2 min.). Cada ciclo consistiu de três etapas: desnaturação (95° C, 1 min.), anelamento (55° C, 1 min) e alongamento (60° C, 1 min). No final dos ciclos, houve uma etapa final de alongamento (60° C, 5 min). O sequenciamento foi realizado em um MegaBACE™ 1000 sequencer (Amersham Biosciences). As condições de eletroforese foram 2 Kv/60 s e 6 Kv/230 min, respectivamente.

2.6.4 Análise das Sequências

A qualidade das sequências foi examinada por Phre/Phrap/Consel package. Para a identificação dos isolados, as sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas com as que já estão depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology e Information (NCBI), utilizando a ferramenta de pesquisa BLAST (Altschul et al., 1990).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise morfológica e fisiológica

Aspergillus gruticola **sp nov** apresenta características morfológicas tipicamente associadas com *Aspergillus* pertencentes à Seção *Flavi* (Raper & Fennell, 1965; Klich, 2002). As características morfológicas de *Aspergillus gruticola* foram comparadas com as principais espécies de *Aspergillus* Seção *Flavi* (Tabela 1 e 2). *Aspergillus gruticola* inicialmente exibem coloração verde-amarelo, mas após 7 dias essas colônias tendem a apresentar coloração amarelo com tons de marrom. Por comparação, *A. tamarii* (Klich, 2002) e *A. pseudotamarii* (Ito et al., 2001) são morfológicamente muito próximas, pois exibem coloração verde-amarelo a amarelo-marrom (Ito et al., 2001). *A. gruticola* apresenta crescimento bastante limitado a 37 °C (0-1,9 mm), enquanto *A. tamarii* e *A. pseudotamarii* exibem ótimo crescimento. *A. bombycis* é uma espécie que também apresenta crescimento limitado a 37 °C (15 mm de diâmetro), mas esta espécie difere de *A. gruticola* pela coloração verde das colônias e pela ornamentação dos conídios (Peterson et al., 2001). Conforme observado na Tabela 1, outras espécies, como *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, crescem rapidamente a 37 °C, além de exibirem coloração verde a verde-escuro, o que as difere de *A. gruticola* (Ito et al., 2001; Peterson et al., 2001; Klich, 2002).

Microscopicamente, *A. gruticola* apresenta características distintas das demais espécies pertencentes à Seção *Flavi* (Ito et al., 2001; Peterson et al., 2001; Klich, 2002; Kumeda et al., 2003; Pildain et al., 2008; Rodriguez et al., 2008), principalmente com relação à ornamentação de seus conídios, que são lisos a finamente espinhosos (Tabela 1 e 2).

Alguns caracteres fisiológicos também auxiliaram na distinção de *A. graticola* das demais espécies da Seção *Flavi*. Uma característica importante observada em *A. graticola*, não relatada em outras espécies de *Aspergillus* pertencentes à Seção *Flavi*, foi a produção de metabólitos voláteis com aroma cítrico, que são mais característicos em YES e CY20S, principalmente. *A. graticola* é uma espécie não aflatoxigênica e as únicas espécies relatadas como não aflatoxigênicas são *A. caelatus*, *A. oryzae*, *A. sojae* e *A. tamarii*, apesar de haverem controvérsias sobre a produção de aflatoxinas por *A. tamarii*. *A. graticola* apresenta crescimento moderado em meio de cultivo CREA e baixa produção de ácido (Figura 1 E).

Na Figura (4E-4F) estão as eletromicrografias dos esporos de *A. graticola* observadas em MEV. Os esporos de *A. graticola* e de *A. tamarii* (Kozakiewicz, 1989) apresentam ornamentação equinulada, mas os esporos de *A. graticola* possuem ornamentação distinta, em que as equinulações em feixes são mais agregadas do que as de *A. tamarii*.

TABELA 1 Características microscópicas das principais espécies de *Aspergillus* Seção *Flavi*.

Espécies	Diâmetro vesícula	Forma vesícula	Diâmetro conídios	Textura Conídios	Forma Conídios
<i>A. caelatus</i>	8-12	globosa/subglobosa	5-6	rugoso	globoso
<i>A. arachidicola</i>	9-10	globosa/subglobosa	4.5-5	equinolado	globoso/subgloboso
<i>A. bombycis</i>	30-50	globosa	4-7	rugoso	globoso/subgloboso
<i>A. flavus</i>	20-45	esférica/alongada	3-6	finamente rugoso	globoso/elipsoidal
<i>A. graticola sp nov</i>	20-35	globosa/subglobosa	6-8.5	liso/finamente espinhoso	globoso/subgloboso
<i>A. minisclerotigenes</i>	35-50	globosa/subglobosa	3-4	liso/equinolado	subgloboso/elipsoidal
<i>A. oryzae</i>	22-50	clavada/subglobosa	4-8.5	liso/finamente rugoso/ ocasionalmente espinhoso	globoso/ovoide/elipsoidal
<i>A. parasiticus</i>	20-35	esférica/alongada	3.5-6	rugoso	globoso
<i>A. pseudotamarii</i>	30-50	globosa	3.9-9.9	equinolado	globoso/subgloboso
<i>A. sojae</i>	17-35	piriforme/globosa	5.5-7	rugoso	esférico
<i>A. tamarii</i>	20-45	globosa/piriforme	5.5-8	rugoso	globoso

TABELA 2 Características macroscópicas das principais espécies de *Aspergillus* Seção *Flavi*

Espécies	CYA25°C			MEA 25°C		
	Diâmetro	Coloração	Reverso	Diâmetro	Coloração	Reverso
<i>A. caelatus</i>	30-45	verde oliva	amarelo pálido/marrom	60-80	verde oliva	amarelo pálido
<i>A. arachidicola</i>	60-65	oliva/oliva marrom	amarelo/ cinza	60-65	oliva/ marrom	amarelo/tons cinza
<i>A. bombycis</i>	65	verde/raramente marrom	incolor/amarelo claro	65	verde tons amarelo	amarelo claro
<i>A. gruticola sp nov</i>	65-70	verde-amarelo/ amarelo-marrom	creme/incolor	69-75	verde amarelo/ marrom	incolor
<i>A. flavus</i>	65-70	verde oliva	incolor/marrom escuro	65-70	oliva/verde escuro	incolor
<i>A. minisclerotigenes</i>	60-70	verde /tons cinza	marrom	60-70	verde tons cinza	marrom amarelo/ marrom claro
<i>A. oryzae</i>	55-70	oliva/marrom amarelo/cinza	pálido/incolor amarelo/cinza	60-70	amarelo acinzentado	incolor/ amarelo escuro
<i>A. parasiticus</i>	60-70	verde escuro	incolor/amarelo escuro	60-70	oliva/verde escuro	incolor/ amarelo
<i>A. pseudotamarii</i>	60-70	verde-marelo	amarelo pálido/ marrom	60-70	verde oliva	amarelo pálido
<i>A. sojae</i>	60-70	verde-marrom/ marrom-amarelado	incolor/marrom pálido	60-70	verde escuro/ oliva	incolor/ acinzentado
<i>A. tamarii</i>	55-70	verde-marrom/ amarelo-marrom	incolor/ amarelo cinza	65-70	marrom oliva/ marrom/ amarelo	marrom oliva/ marrom /amarelo

3.2 Caracterização molecular para distinguir espécie de *Aspergillus* Seção *Flavi*

As seqüências dos isolados 0160 e 0197 foram inseridas em um alinhamento com outras espécies pertencentes à Seção *Flavi* obtidas do GenBank e analisadas pelo método de máxima parcimônia. Na busca heurísticas identificaram 8 árvores de máxima parcimônia, das quais foi selecionada apenas uma que mais se aproximava da filogenia da Seção (Figura 1). *Aspergillus fumigatus* foi utilizado como *outgroup*. Os valores de *bootstrap* (1000 repetições) são indicados em porcentagem nos internódios.

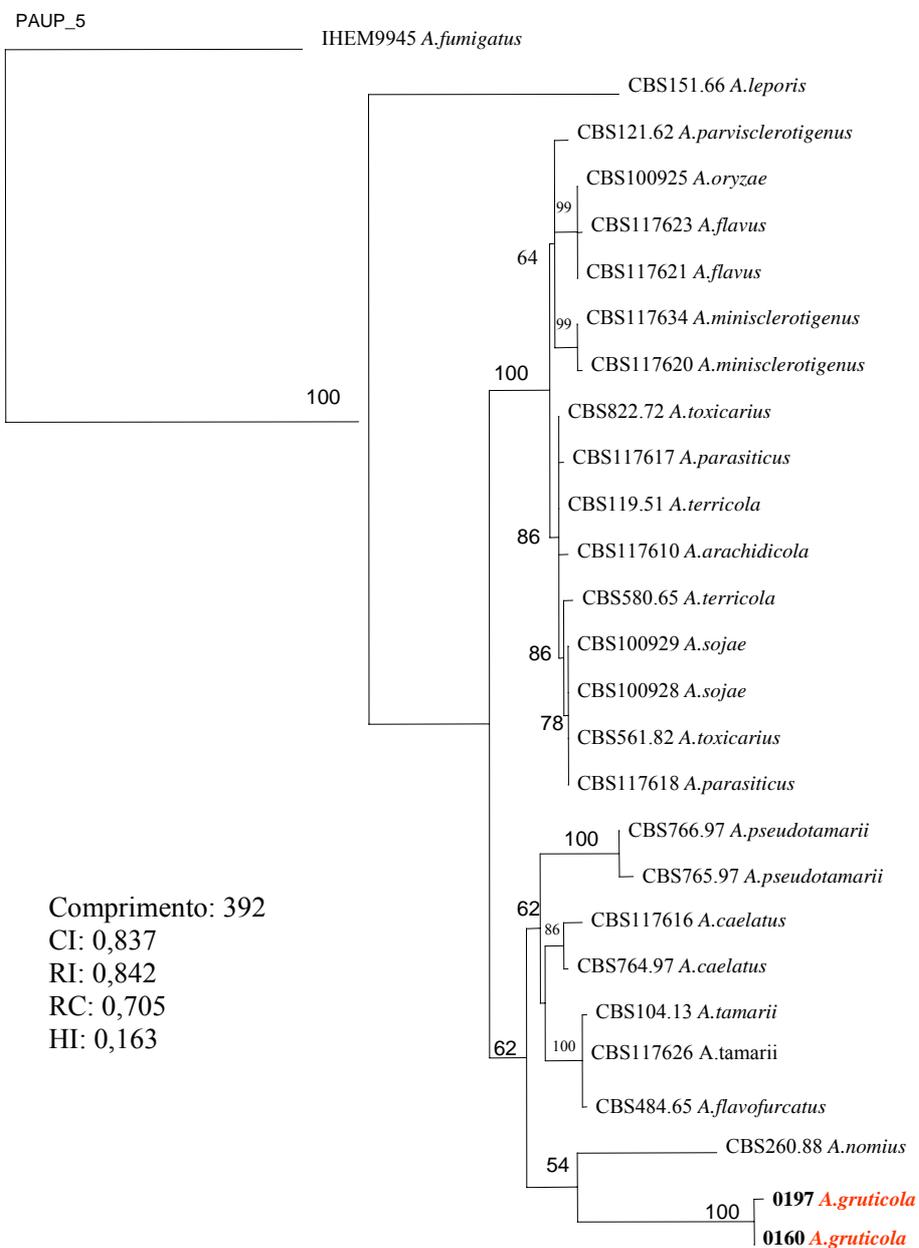
A análise do gene β -tubulina mostrou que os isolados 0160 e 0197 representam a mesma espécie, e que se agruparam separadamente das demais espécies da Seção *Flavi* (Figura 1). Estes resultados confirmam a hipótese de que estes dois isolados representam uma nova espécie denominada *A. gruticola*.

Aspergillus gruticola sp. nov, conforme demonstrado na Figura 1, se posicionou próximo à espécie de *A. nomius*, porém estas são espécies morfológicamente distintas. *A. nomius* é relatado como uma espécie morfológicamente similar a *A. flavus* (Kurtzman et al., 1987). *A. gruticola* apresenta crescimento limitado a 37 °C (0-1,3 mm diam), enquanto *A. nomius* cresce vigorosamente a esta temperatura (65 mm diam) (Peterson et al., 2001). A coloração das colônias de *A. gruticola* é verde-amarelo para verde-marrom, e a de *A. nomius*, verde-oliva (Kurtzman et al., 1987). *A. gruticola* tem estipes com paredes lisas se comparadas com as estipes rugosas de *A. nomius*, e a produção de aflatoxinas não foi observada em *A. gruticola*; no entanto, *A. nomius* é uma espécie capaz de produzir aflatoxinas B e G (Peterson et al., 2001; Pildain et al., 2008).

Análises morfológicas de *A. gruticola* demonstraram que esta espécie é similar a *A. tamarrii* com base na coloração das colônias (Klich, 2002; Thom & Rapper, 2002). As seqüências dos isolados de *A. gruticola* foram comparadas

com sequências de *A. tamaritii* depositadas no GenBank por meio da análise de BLAST. Através da análise de 480 pares de nucleotídeos de uma porção do gene *β-tubulina*, observa-se que *A. gruticola* tem como espécie mais próxima *A. tamaritii* (NRRL 426, CBS 117626, 2342/05 e NRRL 4911), com identidade igual a 89%; no entanto, estas duas espécies demonstraram ser diferentes em alguns pares de bases, conforme mostrado na Figura 2. Este resultado foi confirmado por meio da análise filogenética, por meio da qual observou-se que *A. gruticola* agrupou-se em um subclado diferente de *A. tamaritii* (Figura 1).

A descrição de uma nova espécie isolada de ambiente cavernícola ressalta a importância de novos estudos neste ambiente, mediante a variabilidade de microrganismos presentes.



10

FIGURA 1 Árvore Filogenética de máxima parcimônia para o gene β -tubulina de espécies pertencentes à Seção *Flavi*. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de bootstrap (1000 repetições) são indicados em porcentagem nos internódios.

4 Descrição Morfológica de *Aspergillus gruticola* sp nov Batista, Silva, Fungaro, Sartori

A nova espécie do gênero *Aspergillus* Seção *Flavi*, proposta neste estudo como *Aspergillus gruticola* sp nov, foi isolada de uma caverna localizada no município de Araripe (CE), na região nordeste do Brasil. Esta espécie diferencia-se da maioria das demais espécies da Seção *Flavi* pelo crescimento limitado em CYA a 37 °C e pela ornamentação de seus conídios, que são lisos a finamente espinhosos. Morfológicamente, o *A. gruticola* assemelha-se a *A. tamaritii* com base na coloração exibida por esta espécie. Estas duas espécies podem ser diferenciadas morfológicamente principalmente pelo crescimento a 37 °C e pela ornamentação dos conídios.

***Aspergillus gruticola* sp nov Batista, Silva, Fungaro, Sartori**

Diâmetro da colônia após 7 dias de cultivo a 25 °C, em mm: CYA: 65-70 mm; MEA: 69-75 mm; YES: 60-64 mm; OA: 56-60 mm; CY20S: 61-63 mm; CREA: 47-51 mm pouca esporulação e baixa produção de acidez. CYA 37 °C: 0-1,3 mm.

Coloração e textura das colônias. Em CYA 25 °C, verde amarelo para verde-marrom; micélio branco para creme; reverso creme ao centro para incolor nas extremidades; exsudato incolor e em pequena quantidade; colônias lanosas a flocosas ao centro. MEA, verde amarelo com tons de marrom; micélio inconspicuous; reverso incolor; colônias flocosas principalmente ao centro; exsudato incolor. CY20S, verde amarelo com pigmentação central com tons de marrom; micélio denso, branco a creme; reverso creme; exsudato incolor; produção de metabólitos voláteis com aroma cítrico, este aroma é mais característico em culturas de YES; colônias usualmente flocosas. CYA 37 °C, reverso incolor para tons de marrom ao centro; colônias compactas; demais características similar ao CYA 25 °C.

Características microscópicas: cabeça conidial colunar; estipe (100) 250-1600 (2000) x (5) 7-10 (11) μm , parede lisa e incolor; vesícula globosa a subglobosa, (7) 20-35 (46); unisseriadas; fiálides (8) 12-22 (35) as vesículas menores apresentam fiálides maiores; conídio liso a finamente espinhoso, globosos a subgloboso e em alguns casos elipsoidal, 6 - 8.5 (11).

Características distintivas: estas espécies são caracterizadas pelo crescimento limitado a 37 °C, pela ornamentação dos esporos lisos a finamente espinhosos e pela produção de metabólitos voláteis de aroma cítrico.

Habitat: Caverna Nordeste do Brasil

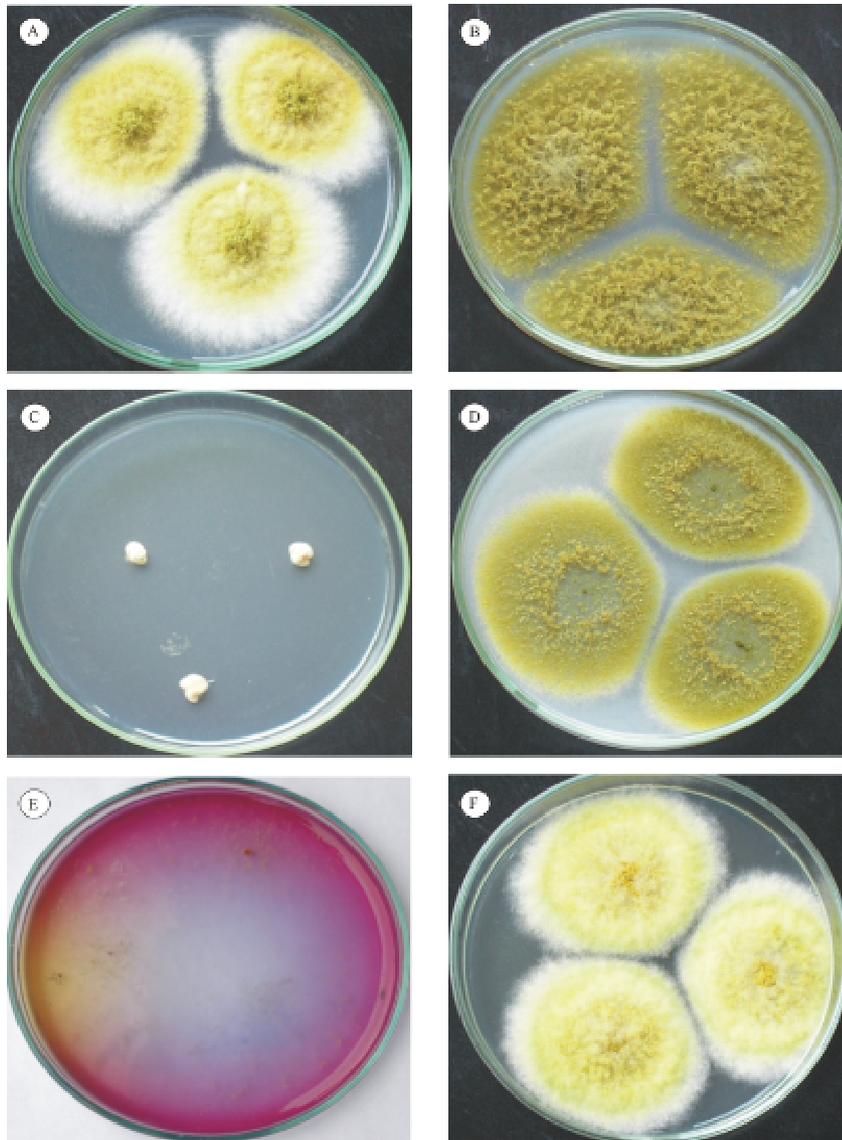


FIGURA 3 Crescimento das colônias de *Aspergillus gruticola* sp nov após 7 dias de cultivo em (A) CYA 25 °C; (B) MEA 25 °C; (C) CYA 37 °C; (D) OA 25 °C; (E) CREA 25 °C; (F) CY 20S 25 °C.

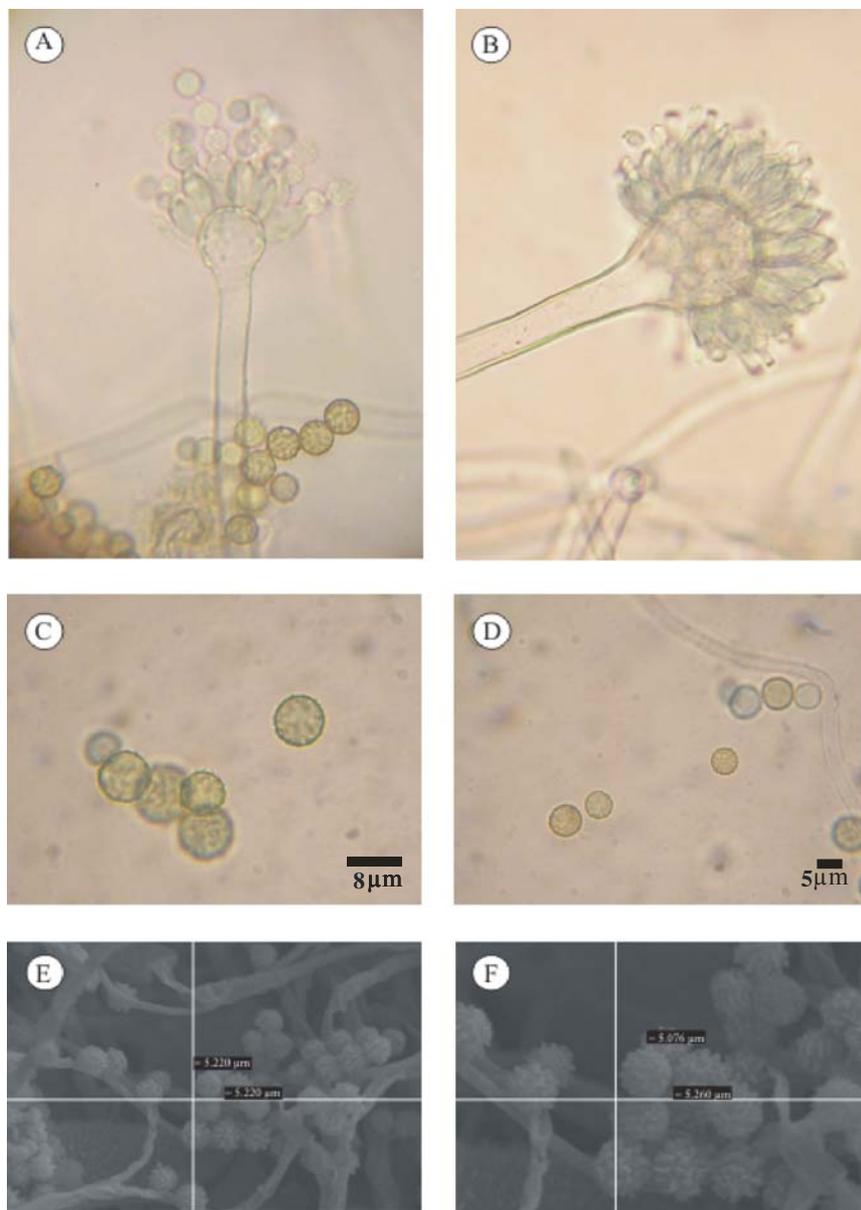


FIGURA 4 *Aspergillus gruticola* sp nov. (A-B) Fotomicrografias das estruturas microscópicas; (C-D) Fotomicrografias de conídios; (E-F) Eletromicrografias de conídios.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo conclui-se que a utilização da Taxonomia polifásica permitiu a identificação e a descrição da nova espécie de *Aspergillus* Seção *Flavi*, denominada neste estudo como *Aspergillus gruticola* sp nov **Batista, Silva, Fungaro, Sartori** demonstrando ser um método importante para a discriminação de novas espécies.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. Dr. Rodrigo Lopes Ferreira, à sua equipe, ao CNPq, através do financiamento do Projeto “Estrutura das Comunidades Cavernícolas da Caatinga Brasileira”. Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de fitopatologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA e a Fapemig.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOZA-GOMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina Hyphomycetes*) isolates. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, p. 729-732, 2000.

CODNER, R. C.; SARGEANT, K.; YEO, R. Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. **Biotechnology Bioeng.** v. 5, p. 185-192, 1963.

CHRISTENSEN, M. A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. **Mycology**, Netherlands, v. 73, p. 1056-1084, 1982.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A sample screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, London, v. 13, n. 3, p. 128-130, 1980.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; SMEDSGAARD, J. *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B1, B2 and sterigmatocystin. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, p. 440-445, 2004.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous *Ascomycetes*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1323-1330, 1995.

HARA, S.; KIAMOTO, K.; GOMI, K. New developemnts in fermented beverages and foods with *Aspergillus*. In: BENNETT, J. W.; KLICH, M. A. (Ed.). **Aspergillus: biology and industrial applications**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. p. 133-153.

HORN, B. W. *Aspergillus caelatus*, a new species in Section *Flavi*. **Mycotaxon**, Netherlands, v. 61, p. 185-191, 1997.

ITO, Y.; PETERSON, S. W.; GOTO, T. Properties of *Aspergillus tamari*, *A. caelatus* and related species from acidic tea field soils in Japan. **Mycopathologia**, Tokyo, v. 144, p. 169-175, 1999.

ITO, Y.; PETERSON, S. W.; WICKLOW, D. T.; GOTO, T. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. **Mycology Research**, Netherlands, v. 105, p. 233-239, 2001.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002. 116 p.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. **Mycological Papers**, Netherlands, v. 161, p. 1-188, 1989.

KUMEDA, Y.; ASAO, T.; TAKAHASHI, H.; ICHINOE, M. High prevalence of B and G aflatoxin-producing fungi in sugarcane field soil in Japan: heteroduplex panel analysis identifies a new genotype within *Aspergillus* Section *Flavi* and *Aspergillus nomius*. **FEMS Microbiology Ecology**, Haren, v. 45, p. 229-238, 2003.

KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 53, p. 147-158, 1987.

MURAKAMI, H. Classification of the koji mold. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 17, p. 281-309, 1971.

MURAKAMI, H.; HAYASHI, K.; USHIJIMA, S. Useful key characters separating three *Aspergillus* taxa: *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. flavus*. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 28, p. 55-60, 1982.

PETERSON, S. W.; ITO, W.; HORN, B. W.; GOTO, T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, Netherlands, v. 93, p. 689-703, 2001.

PILDAIN, M. B.; FRISVAD, J. C.; VAAMOND, G.; CABRAL, D.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Netherlands, v. 58. p. 725-735, 2008.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MacDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-148, 1953.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965. 685 p.

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. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 2008. Doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.023](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.023).

SAITO, M.; TSUROTA, O. A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxing productivity. **Proceeding Japan Association Mycotoxicology**, Tokyo, v. 37, p. 31-36, 1993.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. No page.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; FRANK, M. J.; FRISVAD, J. C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, The Netherlands, v. 50, p. 45-61, 2004.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

THOM, C.; RAPER, K. B. A manual of the *Aspergilli*. In: KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)