



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA PELISSON MASSI

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA VARIABILIDADE
GENÉTICA DE *Aspergillus nomius* E *Aspergillus
pseudonomius* ISOLADOS DE CASTANHA DO BRASIL**

Londrina
2014



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FERNANDA PELISSON MASSI

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA VARIABILIDADE
GENÉTICA DE *Aspergillus nomius* E *Aspergillus
pseudonomius* ISOLADOS DE CASTANHA DO BRASIL**

Londrina
2014

FERNANDA PELISSON MASSI

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA VARIABILIDADE
GENÉTICA DE *Aspergillus nomius* E *Aspergillus
pseudonomius* ISOLADOS DE CASTANHA DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniele Sartori.

Londrina
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Massi, Fernanda Pelisson .

Identificação e análise da variabilidade genética de *Aspergillus nomius* e *Aspergillus pseudonomius* isolados de castanha do Brasil / Fernanda Pelisson Massi. - Londrina, 2014.

107 f. : il.

Orientador: Maria Helena Pelegrinelli.

dissertação) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular , 2014.

Inclui bibliografia.

1. *Aspergillus* - . 2. Fungos toxigênicos - . 3. Castanha-do-pará - . I. Pelegrinelli, Maria Helena . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular . III. Título.

FERNANDA PELISSON MASSI

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE
Aspergillus nomius E *Aspergillus pseudonomius* ISOLADOS DE
CASTANHA DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

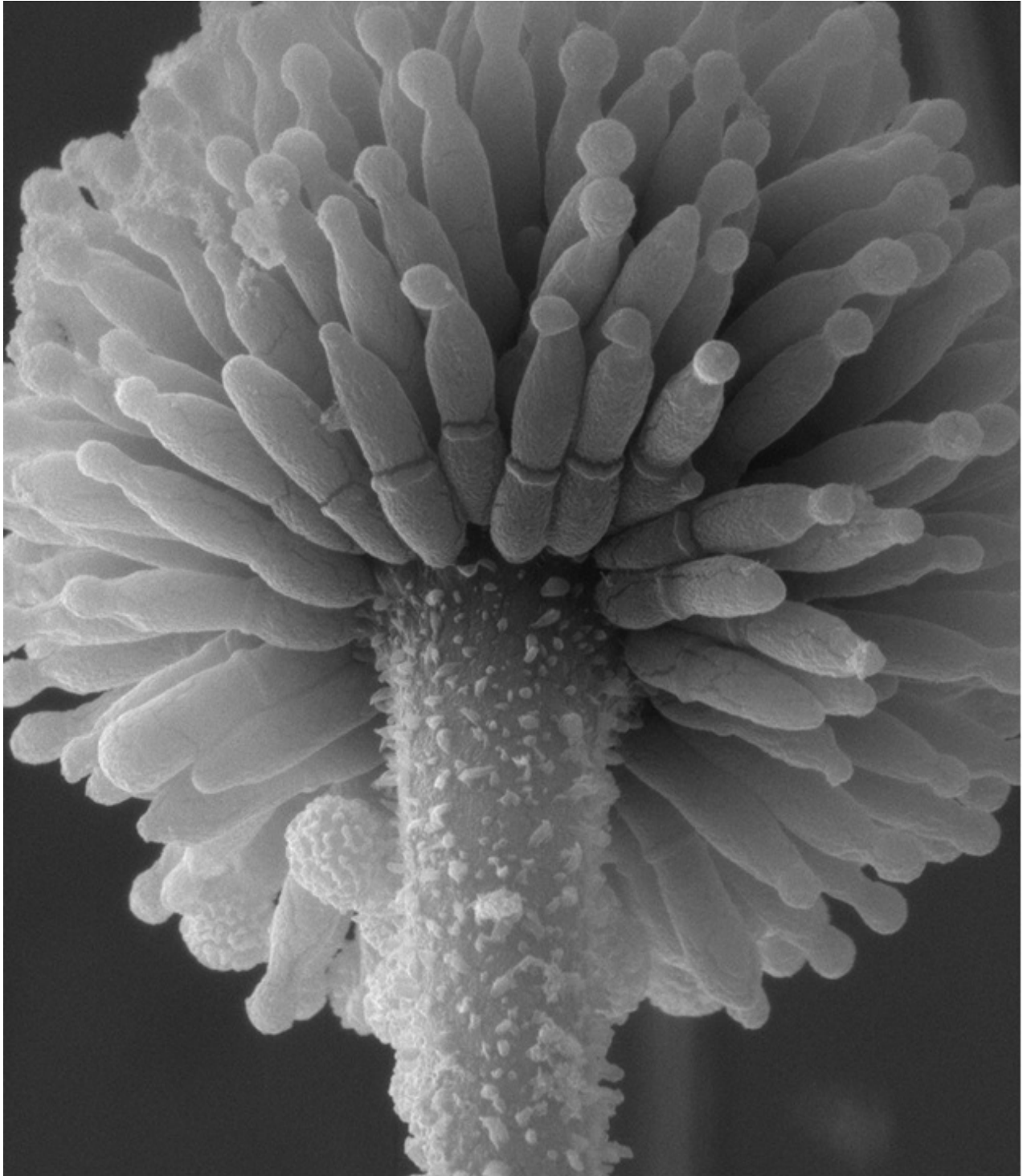
BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Helena
Pelegrinelli Fungaro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Márcia Magalhães Mata
Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de Fevereiro de 2014.



Aos meus pais, Massi e Ivani, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões e a minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, que muito contribuiu para esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado o presente da vida, e junto com ela saúde e disposição para cumprir mais uma fase de minha vida e por me acompanhar sempre.

Aos meus pais, Massi e Ivani, que sempre estão ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis, me ensinando, incentivando e investindo em meu desenvolvimento pessoal e profissional e por compartilhar a vida comigo.

Ao meu irmão Rodrigo, que sempre que possível dedicou um pouco da sua atenção às minhas necessidades e por todo carinho, compreensão e respeito.

A Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, pela orientação, dedicação, confiança, paciência e por me estimular a crescer científica, ética, profissional e pessoalmente, pois somente com seu apoio foi possível a realização deste trabalho.

A Prof^ª. Dr^ª. Daniele Sartori, pela co-orientação, dedicação, ensinamentos, acompanhamento científico em todos os passos durante a execução deste trabalho e amizade.

A Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade e por proporcionar um ambiente agradável de trabalho, bem como ao Programa de Genética e Biologia Molecular desta instituição, juntamente com a Coordenação e todos os professores pela oportunidade e ensinamentos transmitidos que muito contribuiu para o meu desenvolvimento profissional e intelectual.

A Dr^ª. Marta Hiromi Taniwaki e a Dr^ª. Beatriz Thie Iamanaka juntamente com o Instituto de Tecnologia de Alimentos, pela participação indispensável neste trabalho, disponibilizando amostras fúngicas e análises imprescindíveis.

A Dr^ª. Maria Lúcia Carneiro Vieira da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela participação e contribuições prestadas para a realização deste trabalho, bem como a Dr^ª. Carla de Freitas Munhoz pelo auxílio na execução de parte deste trabalho.

Ao Dr. Jens C. Frisvad, Technical University of Denmark, pela participação e execução das análises de metabólitos.

Ao Prof. Dr. Josué Maldonado Ferreira pelas contribuições e pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos Professores Doutores Paulo Maurício Ruas, Fernanda Simões de Almeida, Fernando Gomes Barcellos, Márcia Magalhães Mata e João Alencar Pamphile pela participação na Banca Examinadora, pelos comentários e sugestões.

Aos colegas de laboratório Larissa e Rafael que me auxiliaram na execução de partes deste trabalho, bem como aos demais colegas Helena, Josué e Karla pelo convívio e amizade.

A Prof^ª. Dr^ª. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) da UEL e suas alunas, Viviane e Daiane, pela disponibilidade e auxílio durante o preparo e captura das belas imagens fúngicas por microscopia eletrônica de varredura, bem como a Kelly e ao Laboratório Microbiologia de Solos do Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR pela disponibilidade e apoio contribuindo também para a obtenção de algumas imagens microscópicas.

A secretária Maria Sueli Trindade Miranda sempre muito prestativa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Aos amigos que conquistei ao longo destes anos e com os quais passei momentos felizes.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

Obrigada a todos!!!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo faz coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

MASSI, Fernanda Pelisson. **Identificação e análise da variabilidade genética de *Aspergillus nomius* e *Aspergillus pseudonomius* isolados de castanha do Brasil**. 2014. 107f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A exploração da castanha do Brasil é uma das atividades mais importantes das comunidades extrativistas da Amazônia. No entanto, a sua comercialização pode ser afetada pela presença de aflatoxinas produzidas por fungos *Aspergillus* seção *Flavi*. Foram investigados 40 isolados coletados de castanha do Brasil, todos previamente identificados como *A. nomius*, utilizando diferentes abordagens, incluindo características morfológicas, perfis de RAPD e AFLP, sequência parcial dos genes que codificam para β -tubulina e calmodulina, padrões de aflatoxinas, bem como a tolerância à baixa atividade de água em meio de cultura. Os resultados mostraram que a maior parte dos isolados (34), pertencem à espécie *A. nomius*, mas o restante (6) foram identificados como *A. pseudonomius*, uma espécie descrita recentemente. Os resultados da análise molecular de variância, bem como os altos valores de F_{st} par a par entre *A. nomius* e *A. pseudonomius* sugerem o isolamento entre essas duas espécies e à inexistência de fluxo gênico. Os nucleotídeos polimórficos interespecíficos fixados para os genes da β -tubulina e calmodulina são apresentados. Todos os isolados de *A. pseudonomius* analisadas produziram aflatoxinas do tipo B1, B2, G1 e G2. Neste trabalho relatou-se pela primeira vez, a ocorrência de *A. pseudonomius* em castanha do Brasil, capaz de produzir aflatoxina G, bem como a já conhecida capacidade de produção de aflatoxina B.

Palavras-chave: *Aspergillus* seção *Flavi*. Castanha do Brasil. *Aspergillus pseudonomius*. *Aspergillus nomius*. Produção de aflatoxinas

MASSI, Fernanda Pelisson. **Identification and analysis of genetic variability of *Aspergillus nomius* and *Aspergillus pseudonomius* isolated from Brazil nuts**. 2014. 107p. Dissertation (Master in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The exploitation of the Brazil nut is one of the most important activities of the extractive communities of the Amazon rainforest. However, its commercialization can be affected by the presence of aflatoxins produced by fungi, namely *Aspergillus* section *Flavi*. Were investigated 40 fungal isolates collected from Brazil nuts, all previously identified as *Aspergillus nomius*, by means of different approaches, including morphological characters, RAPD and AFLP profiles, partial β -tubulin and calmodulin nucleotide sequences, aflatoxin patterns, as well as tolerance to low water activity in culture media. Results showed that most (34) of the isolates do belong to *A. nomius* species, but the remaining (6) were identified as *A. pseudonomius*, a recently described species. The results of the analyses of molecular variance, as well as the high pairwise F_{ST} values between *A. nomius* and *A. pseudonomius* suggested the isolation between these two species and the inexistence of gene flow. Fixed interspecific nucleotide polymorphisms at β -tubulin and calmodulin loci are presented. All *A. pseudonomius* strains herein analyzed produced the aflatoxins AFB1, AFB2, AFG1, and AFG2. In this work reported for the first time, the occurrence of *A. pseudonomius* in Brazil nuts, capable of producing G aflatoxins, as well as the already-known B aflatoxins.

Keywords: *Aspergillus* section *Flavi*. Brazil nut. *Aspergillus pseudonomius*. *Aspergillus nomius*. aflatoxin production.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

- Figura 1** - Estrutura química dos quatro principais tipos de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2)..... 29
- Figura 2** - Compostos intermediários da via biossintética da aflatoxina, esterigmatocistina (ST) e O-metil esterigmatocistina (OMST), e o produto final, aflatoxina (AF) B e G, sintetizados por espécies de *Aspergillus*. Os quatro principais tipos de aflatoxinas são indicados mostrando a diferenciação entre os tipos B1/B2 e G1/G2. O gene **aflU** (*cypA*) é necessário para a formação da aflatoxina do tipo G; o gene **aflQ** (*ordA*) é necessário para a formação da aflatoxina do tipo B e o gene **aflP** (*omtA*) é necessário para a conversão do ST para OMST. A nomenclatura original do gene em itálico e a nova nomenclatura em itálico e negrito 33
- Figura 3** - Esquema mostrando a ordem dos genes, a localização cromossômica e a direção da transcrição do cluster gênico da via biossintética da aflatoxina em *A. flavus* e *A. parasiticus* (A) e do cluster gênico da via biossintética da esterigmatocistina (ST) em *A. nidulans* (B). As cores das setas representam os sete módulos inferindo as características evolutivas dos genes. No *cluster* da aflatoxina ambas as nomenclaturas, original (gene em itálico) e nova (gene em itálico e negrito), são apresentadas 35

Artigo Científico

- Figure 1** - RAPD profile of *Aspergillus nomius* (A-group) and *A. pseudonomius* (B-group) strains using the 10-mer OPAM-07 primer..... 87
- Figure 2** - UPGMA-based dendrogram generated from the distance matrix of the Jaccard coefficients using RAPD and AFLP data from 40 isolates collected from Brazil nuts, previously identified as *A. nomius*. Nodes supported by bootstrap values > 70% are indicated

	by numeric values. The column shown on the right corresponds to the hierarchical organization of genetic relatedness of the same group of isolates obtained using the STRUCTURE computational program (K=2)	88
Figure 3 -	Neighbor-Joining trees of <i>Aspergillus</i> section Flavi type strains and <i>Aspergillus</i> isolates from Brazil nuts based on β -tubulin (A) and calmodulin (B) sequence data. Nodes supported by bootstrap values > 70% are indicated by numeric values	89
Figure 4 -	Neighbor-Joining of 50 taxa belonging to the <i>Aspergillus nomius</i> clade based on β -tubulin (A) and calmodulin (B) tree sequence data. <i>Aspergillus flavus</i> (CBS 100927) was chosen as an outgroup. Nodes supported by bootstrap values > 70% are indicated by numeric values	90
Figure 5 -	Alignment of β -tubulin (A) and calmodulin (B) parcial gene sequences for different haplotypes of <i>Aspergillus nomius</i> and <i>A. pseudonomius</i> . Fixed nucleotide polymorphisms between <i>A. nomius</i> and <i>A. pseudonomius</i> are indicated by arrows	91
Figure 6 -	<i>Aspergillus pseudonomius</i> strain ITAL 286: Colonies grown on CYA (A), MEA (B), YESA (C) at 25 °C for 7 days. Scanning electron micrographs of conidiophore (D), conidia (E) and stipe (F). Bars: 1 = 50 μ m; 2 = 2 μ m; 3 = 10 μ m	92
Figure 7 -	Standard gel electrophoresis of PCR products derived from the norB-cypA region (~1.8 kb). 1, 1 kb Plus DNA Ladder; 2-6, <i>Aspergillus nomius</i> strains; 7-11, <i>A. pseudonomius</i> strains; 12 and 13, non-aflatoxigenic and aflatoxigenic strains of <i>A. flavus</i> , respectively.....	93
Figure 8 -	Polynomial regression curve showing the relationship between the variables, colony diameter means (after 7 days) (y) and levels of water activities in CYA medium (x). <i>Aspergillus nomius</i> and <i>A. pseudonomius</i> data are shaded in black and dark grey, respectively.....	94

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1 - Importantes micotoxinas com efeitos tóxicos para a saúde humana e animal.....	26
---	----

Artigo Científico

Table 1 - Haplotypes of the <i>Aspergillus nomius</i> clade defined on the basis of β -tubulin (<i>benA</i>) and calmodulin (<i>cmd</i>) genes. Sequences from strains denoted as ITAL were obtained in the present study; all others were obtained from GenBank. Roman numerals designate identical sequences.....	82
Table 2 - Aflatoxin production by five strains of <i>Aspergillus pseudonomius</i> grown on YESA for 7 days at 25°C	84
Table 3 - Production of mycotoxins and other extrolites by strains of <i>Aspergillus nomius</i> and <i>A. pseudonomius</i>	85

LISTA DE ABREVIÇÕES E UNIDADES

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitros
µM	Micromolar
A	Adenina
AF	Aflatoxina
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
<i>aflA (hexA)</i>	Gene regulador ácido-graxo sintetase
<i>aflB (hexB)</i>	Gene regulador ácido-graxo sintetase
<i>aflC (pksA)</i>	Gene policetídeo sintetase
<i>aflD (nor-1)</i>	Gene norsolorinic acid reductase
<i>aflE (norA)</i>	Gene norsolorinic acid reductase
<i>aflF (norB)</i>	Gene norsolorinic acid dehydrogenase
<i>aflG (avnA)</i>	Gene regulador monooxygenase
<i>aflH (adhA)</i>	Gene regulador desidrogenase
<i>aflI (avfA)</i>	Gene regulador desidrogenase
<i>aflJ (estA)</i>	Gene regulador esterase
<i>aflK (vbs)</i>	Gene regulador oxidase/desidrogenas síntese de versicolorina B
<i>aflL (verB)</i>	Gene regulador desterase

<i>aflM (ver-1)</i>	Gene regulador desidrogenase
<i>aflN (verA)</i>	Gene regulador monooxygenase
<i>aflO (omtB)</i>	Gene regulador Transferase
<i>aflP (omtA)</i>	Gene regulador Transferase
<i>aflQ (ordA)</i>	Gene regulador monooxygenase
<i>aflR (aflR)</i>	Gene regulador biossintético da transcrição da aflatoxina
<i>aflS (aflJ)</i>	Gene co-ativador
<i>aflT(aflT)</i>	Gene transportador de toxinas
<i>aflU (cypA)</i>	Gene regulador monooxygenase A
<i>aflV (cypX)</i>	Gene regulador monooxygenase X
<i>aflX (ordB)</i>	Gene regulador monooxygenase B
<i>aflY (hypA)</i>	Gene regulador oxidase
<i>aflW (moxY)</i>	Gene regulador monooxygenase Y
AFPA	Meio <i>Aspergillus flavus e parasiticus</i> Agar
AMOVA	<i>Analysis of Molecular Variance</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
A_w	Atividade de água
<i>benA</i>	Gene da β -tubulina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bt2a	<i>Primer</i> de β -tubulina forward
Bt2b	<i>Primer</i> de β -tubulina reverse
B _{2a}	Aflatoxina B _{2a}
C	Carbono
C	Citosina

CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
cm	Centímetros
<i>cmd</i>	Gene da calmodulina
cmd5	<i>Primer</i> de Calmodulina forward
cmd6	<i>Primer</i> de Calmodulina reverso
CYA	Meio <i>Czapek Yeast Autolysate</i>
d	Dias
DHDMST	Dihidro-dimetil esterigmatocistina
DHOMST	Dihidro-O-metil esterigmatocistina
DHST	Dihidro esterigmatocistina
DMST	Dimetil esterigmatocistina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Trifosfato de desoxirribonucleotídeo
EUA	Estados Unidos da América
F	<i>Forward</i>
<i>fas</i>	Ácido-graxo sintetase
g	Gramas
G	Guanina
h	Horas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
ITS	Espaços internos transcritos
Kb	Kilobase
Kg	Kilograma

L	Litro
LMEM	Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise
M1	Aflatoxina M1
M	Molar
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MAT	Gene Mating-type
Mb	Megabase
MEA	Meio <i>Malt Extract Autolysate</i>
mg	Miligrama
Min	Minutos
mL	Mililitro
<i>nadA</i>	Gene regulador oxidase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramas
NJ	<i>Neighbor-Joining</i>
nm	Nanômetros
<i>norB-cypA</i>	<i>Primer par o gene norB e cypA</i>
NRRL	ARS Culture Collection
NY	Nova York
OMST	O-metil esterigmatocistina
OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B
OTC	Ocratoxina C

P1	Aflatoxina P1
p	Peso
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	picomoles
Q1	Aflatoxina Q1
R	<i>Reverse</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rpm	Rotação por minuto
rRNA	RNA ribossomal
RNA	Ácido ribonucleico
s	Segundos
S	Subunidade
sec	Segundos
SEM	Scanning Electron Micrographs
ST	Esterigmatocistina
T	Espécie tipo
T	Timina
TLC	Cromatografia de camada delgada
U	Unidades
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Mean</i>

USA	Estados Unidos da América
UV	Luz ultravioleta
v	Versão
v	Volume
YESA	Meio <i>Yeast Extract Sucrose Agar</i>
w	Wats

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	CASTANHA DO BRASIL	22
2.2	MICOTOXINAS	25
2.3	AFLATOXINAS	28
2.4	CLADO <i>Aspergillus Nomius</i> : <i>Aspergillus Nomius</i> , <i>A. Pseudonomius</i> <i>e a. Bombycis</i>	38
2.5	AFLATOXINAS E FUNGOS AFLATOXIGÊNICOS EM CASTANHA DO BRASIL	42
2.6	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>Aspergillus</i> SECÇÃO FLAVI	45
3	OBJETIVOS	52
3.1	OBJETIVOS GERAL	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4	MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO	54
4.2	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	54
4.3	TRATAMENTO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS COM RNASE A	55
4.4	QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO	55
4.5	ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR RAPD	56
4.6	ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR AFLP	57
4.7	ANÁLISE DOS DADOS DE RAPD E AFLP	58
4.8	AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE B-TUBULINA E CALMODULINA	59
4.9	PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DOS GENES DE B-TUBULINA E CALMODULINA	60
4.10	SEQUENCIAMENTO DE REGIÕES PARCIAIS DOS GENES DE B-TUBULINA E CALMODULINA	60
4.11	PURIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	61

4.12	ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS OBTIDAS	61
4.13	OBSERVAÇÕES MACROMORFOLÓGICAS E MICROMORFOLÓGICAS	62
4.14	AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DOS GENES <i>NORB</i> E <i>CYPA</i>	63
4.15	ANÁLISE DA ATIVIDADE DE ÁGUA	64
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	Artigo Científico: “Brazil nuts are subject to contamination with B and G aflatoxin producing fungus <i>Aspergillus pseudonomius</i> ”	66
6	CONCLUSÕES FINAIS	95
	REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

A castanheira do brasil (*Bertholletia excelsa*), também conhecida como castanheira do pará, é produzida por uma árvore nativa da região Amazônica considerada uma das maiores riquezas da região, pois, através do extrativismo proporciona a geração de renda à população local.

A produção orgânica da castanha do brasil, a coleta do produto sob condições climáticas que favorecem a sua contaminação, e o fato da castanha com e sem casca passar por um processamento mínimo antes da exportação, principalmente para países Europeus e Estados Unidos, contribui para o crescimento de fungos neste produto, sendo este, o principal problema que leva à queda na qualidade das castanhas e seus derivados.

A contaminação da castanha do brasil é decorrente principalmente da presença de fungos produtores de micotoxinas, estas resultantes do metabolismo secundário dos mesmos, produzidas quando as castanhas são mantidas sob condições que favorecem o desenvolvimento das espécies, principalmente as espécies aflatoxigênicas.

Aspergillus secção *Flavi* inclui 22 espécies, dentre as quais *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. parvisclerotigenus*, *A. arachidicola*, *A. minisclerotigenus*, *A. pseudocaelatus*, *A. togoensis*, *A. pseudonomius* e *A. nomius* são espécies aflatoxigênicas podendo, algumas destas serem encontradas em diferentes estágios da cadeia produtiva da castanha do brasil. A espécie *A. nomius* é a mais frequentemente encontrada no produto com e sem casca, caracterizando-se como a principal fonte de contaminação da castanha por aflatoxinas, já que todos os isolados desta espécie tem se mostrado produtores dos quatro principais tipos de aflatoxinas, opondo-se aos isolados da espécie *A. flavus*, também frequentemente encontrado, mas que somente 50% dos isolados são capazes de produzir aflatoxina do tipo B.

Os países importadores exercem um rigoroso controle de qualidade com relação à quantidade de micotoxinas presentes em lotes de castanhas do brasil. No Brasil, o Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) por meio da Resolução RDC N° 7, de 18 de Fevereiro de 2011, estabeleceu os limites máximos tolerados para aflatoxinas e outras

micotoxinas em alimentos prontos para o consumo e em matérias primas. Para a castanha do brasil com casca para consumo direto é permitido no máximo 20 µg/Kg. Para castanha do brasil sem casca para consumo direto estabeleceu-se 10 µg/Kg, enquanto que para castanha do brasil sem casca para processamento posterior é permitido 15 µg/Kg.

Devido às preocupações relacionadas à contaminação da castanha do brasil com aflatoxinas, altamente tóxicas e com potencial carcinogênico, é crucial o levantamento das espécies fúngicas que contaminam este importante produto nativo de nosso país, bem como a caracterização do potencial dos isolados fúngicos com relação à capacidade de produção de toxinas.

Portanto, este trabalho teve por objetivo analisar a variabilidade genética de uma coleção constituída de 40 isolados fúngicos obtidas de castanha do brasil e previamente identificadas, por taxonomia morfológica, como pertencentes à espécie *Aspergillus nomius*. Várias análises foram utilizadas para atingir o objetivo proposto: RAPD, AFLP, sequências de nucleotídeos de parte dos genes que codificam para β-tubulina e calmodulina, micro morfologia por meio de microscopia eletrônica de varredura, produção de aflatoxinas por HPLC e tolerância à redução de atividade de água no meio de cultura. Além disso, sequências de nucleotídeos dos genes que codificam para β-tubulina e calmodulina de todas as espécies inclusas no Clado *A. nomius* e que se encontram disponíveis no banco de dados do NCBI foram analisadas quanto à diversidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CASTANHA DO BRASIL

A castanheira *Bertholletia excelsa* Humboldt & Bonpland popularmente conhecida como castanheira do Brasil ou castanheira do Pará é uma árvore nativa da região Amazônica que pertence à família Lecythidaceae. No Brasil esta castanheira ocorre nos Estados do Acre, Amazonas, Pará, Roraima, Rondônia, e em parte dos Estados do Maranhão, Tocantins e do Mato Grosso (VIEIRA et al., 2009). Estes Estados possuem matas de terras não inundáveis, com disponibilidade média de água no solo, pH ácido, baixos valores de saturação de bases, solo distrófico, baixa capacidade de troca de cátion e altíssimos valores de saturação de alumínio, alta compactação e clima tropical, propício para o desenvolvimento da espécie (LOCATELLI et al., 2003).

A castanheira do Brasil é uma árvore de grande porte, com copa grande e emergente, formada por folhas simples glabras, que atinge em média 32 metros de altura e seu tronco retilíneo não ramificado que pode atingir vários metros de diâmetro, quando em floresta primária, e viver mais de 500 anos formando os conhecidos “castanhais” (SALOMÃO, 2009).

As flores das castanheiras são protegidas por uma lígula que dificulta a entrada dos principais polinizadores, as grandes e robustas abelhas de língua comprida da família Apidae, pertencente aos gêneros *Bombus*, *Centris*, *Epicharis*, *Euglossine*, *Eulaema* e *Xylocopa* que precisam levantar uma das pétalas para realizar a polinização (CAVALCANTE et al., 2012). Entretanto, um estudo desenvolvido por Santos e Absy (2010) evidencia que além das tradicionais abelhas da família Apidae, outras abelhas sem ferrão pertencentes à família Megachilidae também são frequentes nos castanhais influenciando no processo de polinização. As árvores de castanha do Brasil florescem de setembro a janeiro, com aproximadamente 90% das plantas adultas florescendo em

novembro e dezembro. Esse florescimento ocorre normalmente no final do período da estiagem e começo das chuvas, sendo diferente da maioria das espécies de florestas tropicais de várias regiões do mundo, onde florescem em estações secas (VIEIRA et al., 2009).

O fruto da castanheira, chamado de “ouriço” é lenhoso, globoso, com tamanho variável, podem pesar de 500 g a 1.500 g e conter em seu interior de 15 a 25 sementes, do qual se obtém a amêndoa que é coletada por extrativistas em áreas naturais de floresta para a comercialização da castanha do brasil, produto de grande importância econômica internacional e responsável pela renda de famílias extrativistas (MULLER et al., 1995; SOUZA et al., 2001).

As sementes ou castanhas são de forma angulosa com tegumento córneo. A amêndoa, presente no interior da semente, é um alimento apreciado pelo seu sabor e pelo alto valor nutritivo, sendo considerada uma das proteínas vegetais de maior complexidade, devido à qualidade e quantidade de aminoácidos presentes, estando incluso neste produto todos os aminoácidos essenciais aos seres humanos, sendo que leucina, metionina e valina representam aproximadamente 20% da quantidade total desses aminoácidos presentes na castanha do brasil (SOUZA e MENEZES, 2004). A forma desidratada possui de 15 a 20% de proteínas incluindo aminoácidos essenciais a humanos, e alto teor de lipídios, aproximadamente 60 a 70%. Além disso, é rica em cálcio e fósforo, essenciais na alimentação infantil; possui elevado índice de magnésio e potássio, minerais importantes para o equilíbrio da saúde; selênio, mineral de ação antioxidante e energética; vitaminas do grupo B, principalmente B1 e B3; vitamina A e vitamina E; além de outros minerais (VILHENA, 2004).

A produção de frutos da castanha do brasil, que começa a ocorrer aos oito anos de idade e atinge aos doze anos a regularidade na produção é destinada à exportação principalmente para países como Bolívia, Estados Unidos, Hong Kong, Austrália, além de países europeus devido ao elevado valor comercial das amêndoas e onde a população tem boa aceitação, permanecendo de 70 a 75% da produção para o consumo interno. Nos quatro primeiros meses de 2012, o volume total das exportações de castanha do brasil atingiram 4.940 toneladas, cuja venda alcançou mais de US\$ 6,5

milhões, valor este 65,6% superior ao observado no mesmo período de 2011. Durante o decorrer de todo o ano de 2011, foram produzidos 42.000 toneladas de castanha do brasil, sendo que 10.350 toneladas (24,64%) da castanha foram destinadas a exportação e 30.350 toneladas (72,26%) foram consumidas internamente (CONAB, 2012).

A emergência de sementes de castanha do brasil, sob condições normais, leva de 12 a 18 meses, sendo considerada lenta e desuniforme, constituindo em grande problema no estabelecimento de cultivos racionais. Entretanto, a espécie apresenta rusticidade e crescimento relativamente rápido, fornecendo madeira de boa qualidade para construção civil e naval, bem como para esteios e obras externas. O abate de árvores de castanheiras em florestas naturais é proibido por lei, através do Decreto nº 1282 de 19 de Outubro de 1994, já que serve de sustentação e subsistência para as populações que vivem a base do extrativismo, desempenhando importante função na organização sócio econômica de grandes áreas extrativistas da floresta amazônica, mas esse Decreto não impede o plantio da castanheira do brasil com a finalidade de reflorestamento (apud FERREIRA e TONINI, 2009).

A produção extrativista orgânica da castanha do brasil, o baixo nível tecnológico característico da cadeia produtiva associado às condições climáticas (umidade e precipitação pluviométricas elevadas) no período de colheita e as características nutricionais, tornam a castanha do brasil um excelente substrato para a contaminação das amêndoas com e sem casca por várias espécies de fungos, incluindo os produtores de micotoxinas. De forma genérica, as micotoxinas são substâncias naturais de baixo peso molecular, produzidas como um metabólito secundário de algumas espécies de fungos filamentosos podendo afetar seriamente a saúde humana e animal (SOUZA et al., 2001; FERREIRA e TONINI, 2009).

Dentre as micotoxinas destacam-se as aflatoxinas, produzidas pelo metabolismo secundário dos fungos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (KURTZMAN et al., 1987) constituindo um forte entrave para a comercialização do produto, principalmente no mercado externo, dado o rigoroso controle de países europeus e americanos em relação aos níveis de toxinas presentes nos alimentos (apud PIMENTEL et al., 2010).

Normas de segurança alimentar determinam as concentrações mínimas de aflatoxinas na amêndoa e outros produtos, para que possam ser consumidas no mercado externo e por consequência no próprio país. No Brasil, o Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) por meio da Resolução RDC N° 7, de 18 de Fevereiro de 2011, estabeleceu os limites máximos tolerados para aflatoxinas (AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2) e outras micotoxinas em alimentos prontos para o consumo e em matérias primas. Para a castanha do brasil com casca para consumo direto é permitido no máximo 20 µg/kg de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Para castanha do brasil sem casca para consumo direto estabeleceu-se 10 µg/kg, enquanto que para castanha do brasil sem casca para processamento posterior é permitido 15 µg/kg (AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2).

No Brasil, entre as mais variadas espécies de castanhas, a castanha do brasil é a que apresenta a maior incidência de aflatoxinas, comprovando a susceptibilidade desta cultura (CALDAS et al., 2002; MELLO e SCUSSEL, 2007). Este fato justifica a realização de estudos que visem identificar e quantificar os agentes propulsores da contaminação e os mecanismos que possam minimiza-la.

2.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, naturalmente sintetizados no final da fase exponencial de crescimento de algumas espécies de fungos filamentosos, podendo desenvolver atividade mutagênica, carcinogênica, teratogênica e imunossupressora naqueles que a ingerem. Esses metabólitos não são essenciais para a manutenção da vida fúngica, mas supõe-se que possam oferecer vantagem competitiva em relação às espécies não toxigênicas (TANIWAKI et al., 1993; ABDIN et al., 2010).

A contaminação dos mais variados tipos de alimentos com diferentes níveis de micotoxinas podem trazer perdas econômicas e agravos à saúde dos seres humanos e dos animais. Algumas micotoxinas são produzidas por um número limitado de espécies, enquanto outras são sintetizadas por espécies fúngicas de vários gêneros, entretanto,

todas são responsáveis por causar micotoxicoses, quando ingeridas por seres humanos e outros animais (KONIETZNY e GREINER, 2003).

Os fungos micotoxigênicos envolvidos na cadeia alimentar de humanos e animais pertencem principalmente aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, normalmente encontrados como contaminantes presentes em alimentos durante a secagem e estocagem, e *Fusarium* um importante patógeno de plantas. Segundo Konietzny e Greiner (2003), entre 25 e 50% das colheitas mundiais estão contaminadas com micotoxinas, sendo esta contaminação ainda mais elevada em regiões tropicais onde em até 80% das culturas são relatadas quantidades significativas de micotoxinas.

Existem aproximadamente trezentos tipos de micotoxinas descritas, mas somente vinte tipos podem ser encontrados contaminando produtos agroindustriais e são conhecidos por seus efeitos tóxicos para os organismos quando ingeridos juntamente com os mais diversos alimentos que podem apresentar-se contaminados (Tabela 1) (KONIETZNY e GREINER, 2003). Dentre estas micotoxinas, seis tipos são considerados as mais importantes do ponto de vista de saúde pública, as aflatoxinas, ocratoxina A, patulina, fumonisina, deoxinivalenol e zearalenona (apud AMARAL et al., 2006; ABDIN et al., 2010).

Tabela 1 - Importantes micotoxinas com efeitos tóxicos para a saúde humana e animal

Micotoxina	Tipo	Fungos produtores	Produto contaminado
Aflatoxina	B (B1 e B2)	<i>Aspergillus</i>	Semente de algodão, semente de girassol, ervilha, sorgo, arroz, milho, amendoim, pistache, nozes, figos, temperos, carnes, produtos lácteos e sucos de frutas.
	G (G1 e G2)	<i>Aspergillus</i>	
Esterigmatocistina		<i>Aspergillus</i>	Amendoim, milho, pistache, semente de algodão, nozes, semente de girassol, soja, ervilha, figos.

Continuação Tabela 1.

Micotoxina	Tipo	Fungos produtores	Produto contaminado
Ocratoxina	A (OTA)	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>	Trigo, aveia, cevada, feijão, soja, milho, ervilha, nozes, café, cacao, uvas, figos, cana, carnes, frutas secas, temperos, vinho, produtos lácteos, ovos e peixe.
	B (OTB)	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>	
	C (OTC)	<i>Aspergillus</i>	
Tricotecenos	Deoxinivalenol	<i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i>	Cevada, batata, trigo, milho, soja, centeio, grãos processados e fubá.
	Toxina T2	<i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i>	Trigo, aveia, cevada, centeio, figo, batata e grão processados.
	Toxina HT2	<i>Fusarium</i>	Batata, trigo, milho, cevada, aveia, centeio, grãos processados e figo.
	Nivalenol	<i>Fusarium</i>	Trigo, milho, cevada, aveia, centeio e grãos processados.
Fumonisina	B1	<i>Fusarium</i>	Milho, trigo, arroz, sorgo, cebola e grãos de café.
	B2	<i>Fusarium</i>	
Moniliformina		<i>Fusarium</i>	Milho, cevada, aveia, arroz, pimenta, soja, sorgo, milho e trigo.
Zearalenona		<i>Fusarium</i>	Milho, cevada, aveia, centeio, trigo, arroz, sorgo, pão, banana e girassol.
Ácido ciclopiazônico		<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>	Cevada, milho, queijo, amendoim, arroz, soja, grãos de café, pistache, nozes e produtos lácteos.
Patulina		<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>	Cevada, trigo, tomate, morango, banana, manga, abacate, damasco, suco de uva, maçã, peras.

Continuação Tabela 1.

Micotoxina	Tipo	Fungos produtores	Produto contaminado
Metil éter alternariol		<i>Alternaria</i>	Arroz, cevada, aveia, girassol, milho, trigo, centeio, tomate, pimenta, melão.
Alternariol		<i>Alternaria</i>	Arroz, cevada, aveia, girassol, trigo, centeio, pimento, melão e oleaginosas.
Ácido tenuazônico		<i>Alternaria</i>	Arroz, oleaginosas, centeio, trigo, aveia, pimento, girassol e melão.
Citrinina		<i>Penicillium</i>	Trigo, cevada, arroz, maçã, sementes de plantas medicinais.

Fonte: adaptada de KONIETZNY e GREINER (2003); ABDIN et al. (2010)

A contaminação dos produtos vegetais ocorre através do contato com os esporos dos fungos, presentes no ambiente, sobretudo no solo. A utilização de práticas agrícolas incorretas, que prolongam o contato dos produtos com o solo, as lesões nas superfícies dos grãos, provocadas por insetos, o armazenamento inadequado, em locais úmidos e sem ventilação, são apontados como as principais causas que favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos toxigênicos.

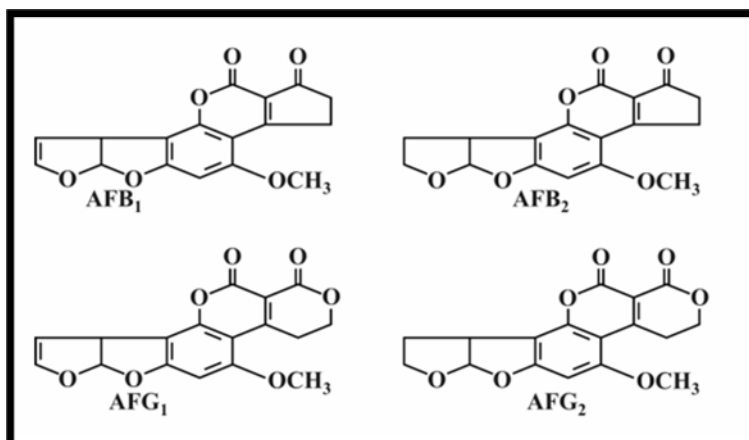
2.3 AFLATOXINAS

A aflatoxina foi descoberta na Inglaterra, em 1960, após um acidente econômico que levou a morte de milhares de filhotes de perus e outros tipos de aves em poucos meses e ficou conhecida como doença “x” dos perus. Esses animais tiveram hepatite aguda necrosante devido à ingestão de ração feita à base de amendoim contaminado com aflatoxina. Após muitos estudos, descobriu-se que a doença “x” dos perus era

causada devido à presença de um metabólito secundário do fungo *Aspergillus flavus*, então denominado de aflatoxina (BLOUNT, 1961).

Sabe-se atualmente que a aflatoxina é um composto hepatocarcinogênico, mutagênico, teratogênico e imunossupressivo para animais e humanos, produzido por várias espécies de fungos. É um composto químico simples, de baixo peso molecular e lipofílico, facilmente absorvido após a ingestão pelo trato gastrointestinal. Os principais e mais potentes tipos de aflatoxinas encontrados nos mais diversos produtos agrícolas e seus derivados são denominados aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 baseadas em suas fluorescências detectadas sob a luz ultravioleta 366 nm (azul e verde), e mobilidade cromatográfica relativa em camada delgada. Todos os quatro principais tipos de aflatoxinas são metabólitos heterocíclicos altamente oxigenados derivados das bisfuranocumarinas (YU et al., 2002; MAIA e SIQUEIRA, 2007). As aflatoxinas apresentam um núcleo central cumarínico ligado de um lado a uma estrutura bifuranóide e por outro lado a uma lactona cumarínica, porém as aflatoxinas do grupo B apresentam um anel ciclo pentano na molécula, enquanto que as aflatoxinas do grupo G apresentam um anel de lactona. As aflatoxinas do tipo B2 e G2 diferem das aflatoxinas do tipo B1 e G1 por apresentarem um anel bifuranóide saturado (BHATNAGAR et al., 2003) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura química dos quatro principais tipos de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2).



Fonte: adaptada de HUSSEIN e BRASEL (2001).

A AFB1 é conhecida como a mais potente micotoxina produzida e um dos mais tóxicos carcinógenos conhecidos, podendo ser encontrada em concentrações significativas em variados alimentos, mas especialmente em cereais. É capaz de inibir a síntese de DNA, a atividade da RNA polimerase DNA-dependente, a síntese de RNA mensageiro e a síntese de proteínas (MAIA e SIQUEIRA, 2007).

A aflatoxina B1 precisa ser metabolicamente ativada para manifestar seus efeitos tóxicos. O composto 8,9-epóxido de AFB1 ou AFB1-epóxido é a forma ativada da aflatoxina B1, originada a partir da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bifuranóide da molécula de AFB1, que reage rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas como DNA, RNA e proteínas, determinando a formação de adutos de DNA, que são lesões bioquímicas primárias produzidas pelas aflatoxinas. A ligação da AFB1-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e sua atividade biológica, originando os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da aflatoxina B1 (YU et al., 2005). A biotransformação da aflatoxina B1 inclui, além da epoxidação, as reações de hidroxilação, com formação de aflatoxinas M1, Q1 e B_{2a} e de O-desmetilação, formando aflatoxina P1 (apud MAIA e SIQUEIRA, 2007).

Dentre as espécies fúngicas produtoras de aflatoxina, destacam-se as do gênero *Aspergillus* pertencentes à secção *Flavi*. *Aspergillus flavus* (LINK, 1809), *A. parasiticus* (PILDAIN et al., 2008) e *A. nomius* são as espécies produtoras de aflatoxinas que mais frequentemente são encontradas associadas a cereais e culturas agrícolas (KURTZMAN et al., 1987). *A. pseudotamarii* (ITO et al., 2001), *A. bombycis* (PETERSON et al., 2001), *A. toxicarius* (PILDAIN et al., 2008), *A. parvisclerotigenus* (FRISVAD et al., 2005), *A. arachidicola* (PILDAIN et al., 2008), *A. minisclerotigenus* (PILDAIN et al., 2008), *A. pseudocaelatus* (VARGA et al., 2011) e *A. pseudonomius* (VARGA et al., 2011) também são espécies, da secção *Flavi*, produtoras de aflatoxinas, mas de menor ocorrência.

Quatro espécies não pertencentes à secção *Flavi* possuem potencial para produção da aflatoxina como, *A. ochraceoroseus* (*Aspergillus* secção *Ochraceorosei*), *A. rambelli* (*Aspergillus* secção *Nidulantes*), e ascomicetos do gênero *Emericella* como

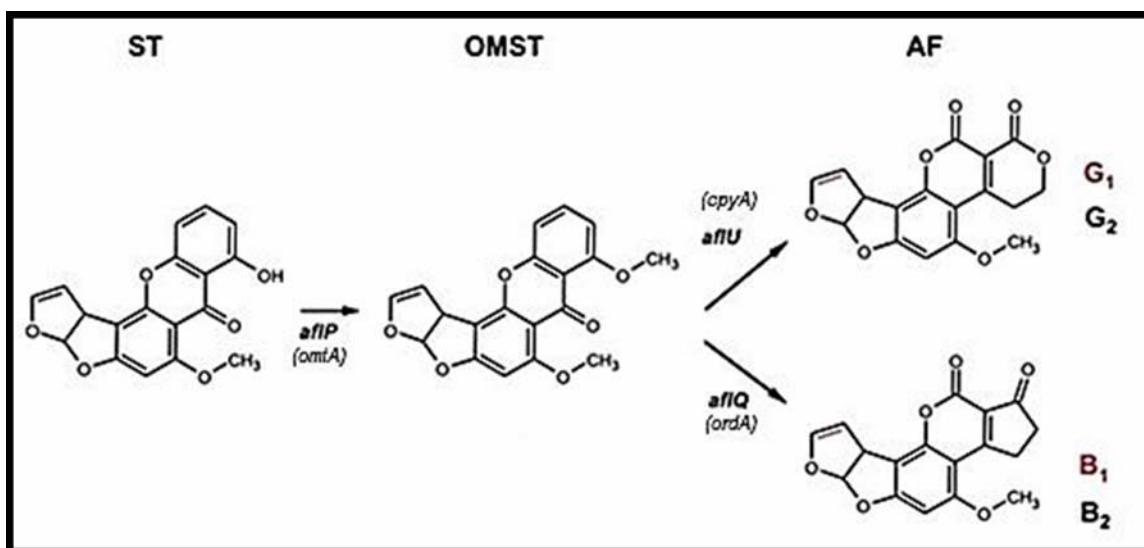
Emericella venezuelensis e *E. astellata* (CARY et al., 2005; revisado por PILDAIN et al., 2008; CARVALHO et al., 2010). A espécie *A. flavus* contém representantes que não são capazes de produzir aflatoxinas, bem como linhagens que produzem aflatoxinas do tipo B1 e B2, e um número pequeno de linhagens que podem produzir, além de B1 e B2, aflatoxinas do tipo G1 (TANIWAKI et al., 1993; FARIAS et al., 2000). *A. pseudotamarii* e *A. pseudonomius* tem sido descritos como produtores de aflatoxinas apenas do grupo B, enquanto que as outras espécies de *Aspergillus* secção *Flavi* são capazes de produzir aflatoxinas tanto do grupo B como do grupo G (VARGA et al., 2011). No que diz respeito a *A. pseudonomius*, é importante ressaltar que um único representante da espécie, a linhagem NRRL 3353, foi analisada quanto ao potencial para produção de aflatoxinas. A conclusão da incapacidade de produção de aflatoxinas do tipo G para esta espécie parece ser prematura.

Devido a sua importância, desde a sua descoberta, há uma busca constante pelo completo conhecimento sobre o metabolismo e a biossíntese da aflatoxina, estando estes atualmente bem caracterizados em nível molecular.

Estudos têm determinado que a biossíntese da aflatoxina compreende uma complexa via metabólica, formada por mais de 20 reações enzimáticas capazes de converter acetil-CoA e malonil-CoA em compostos intermediários esterigmatocistina (ST) e O-metil esterigmatocistina (OMST), quimicamente e estruturalmente semelhantes, mas que diferem em relação aos níveis acumulados nas diferentes espécies de *Aspergillus*. Estes precursores são convertidos em aflatoxinas B e G nas espécies e/ou linhagens produtoras (Figura 2). A espécie *A. nidulans* sintetiza somente ST enquanto que várias espécies de *Aspergillus* pertencentes à secção *Flavi* sintetizam além do ST também o produto final, as aflatoxinas (CARBONE et al., 2007). A via biossintética da aflatoxina atualmente aceita é: acetil-CoA e malonil-CoA que por meio de uma reação catalisada pelos genes *fas-1* e *fas-2* produzem hexanoato, este é utilizado por uma policetídeo sintase (*pksA*) em uma reação de oxido-redução para a produção do ácido norsolorínico, este é o primeiro produto intermediário estável na via da aflatoxina. A partir do ácido norsolorínico, uma série de produtos codificados pelos genes *afID* (*nor-1*), *afIG* (*avnA*), *afIH* (*adhA*), *afIJ* (*estA*) e *afIK* (*vbs*) agem em sequência para produzir versicolorina B, um precursor intermediário comum antes do

ponto de ramificação e divergência da via da aflatoxina em 2 ramos que permitirá a formação das aflatoxinas do tipo B1 e G1 enquanto que o outro ramo permitirá a formação das aflatoxinas do tipo B2 e G2. Uma reação de redução converterá a versicolorina B em versicolorina A. Novamente, várias reações enzimáticas estão envolvidas no processo de conversão da versicolorina A em dimetil esterigmatocistina (DMST), este em esterigmatocistina (ST), O-metil esterigmatocistina (OMST). Uma vez OMST tendo sido formado, este poderá ser convertido em aflatoxina B1 ou G1. A monooxigenase citocromo P450 codificada pelo gene *afIQ* (*ordA*) converte o OMST em aflatoxina B1, mas a atuação da monooxigenase citocromo P450 codificada pelo gene *afIU* (*cypA*) converte o OMST em aflatoxina G1 (ROZE et al., 2013). Após a etapa de formação da versicolorina B e seguindo o outro ponto de ramificação da via, novamente uma metil transferase codificada pelo gene *afIO* (*omtB*) faz a conversão do dihidro-dimetil esterigmatocistina (DHDMST) em dihidro esterigmatocistina (DHST) e por fim a conversão em dihidro-O-metil esterigmatocistina (DHOMST). Uma vez DHOMST tendo sido formado, este poderá ser convertido em aflatoxinas B2 e G2. A monooxigenase citocromo P450 codificada pelo gene *afIQ* (*ordA*) converte o DHOMST em aflatoxina B2 e a atuação da monooxigenase citocromo P450 codificada pelo gene *afIU* (*cypA*), a partir de um passo oxidativo adicional, converte o DHOMST em aflatoxina G2 (YU et al., 2002).

Figura 2 - Compostos intermediários da via biossintética da aflatoxina, esterigmatocistina (ST) e O-metil esterigmatocistina (OMST), e o produto final, aflatoxina (AF) B e G, sintetizados por espécies de *Aspergillus*. Os quatro principais tipos de aflatoxinas são indicados mostrando a diferenciação entre os tipos B₁/B₂ e G₁/G₂. O gene *afIU* (*cypA*) é necessário para a formação da aflatoxina do tipo G; o gene *afIQ* (*ordA*) é necessário para a formação da aflatoxina do tipo B e o gene *afIP* (*omtA*) é necessário para a conversão do ST para OMST. A nomenclatura original do gene em itálico e a nova nomenclatura em itálico e negrito



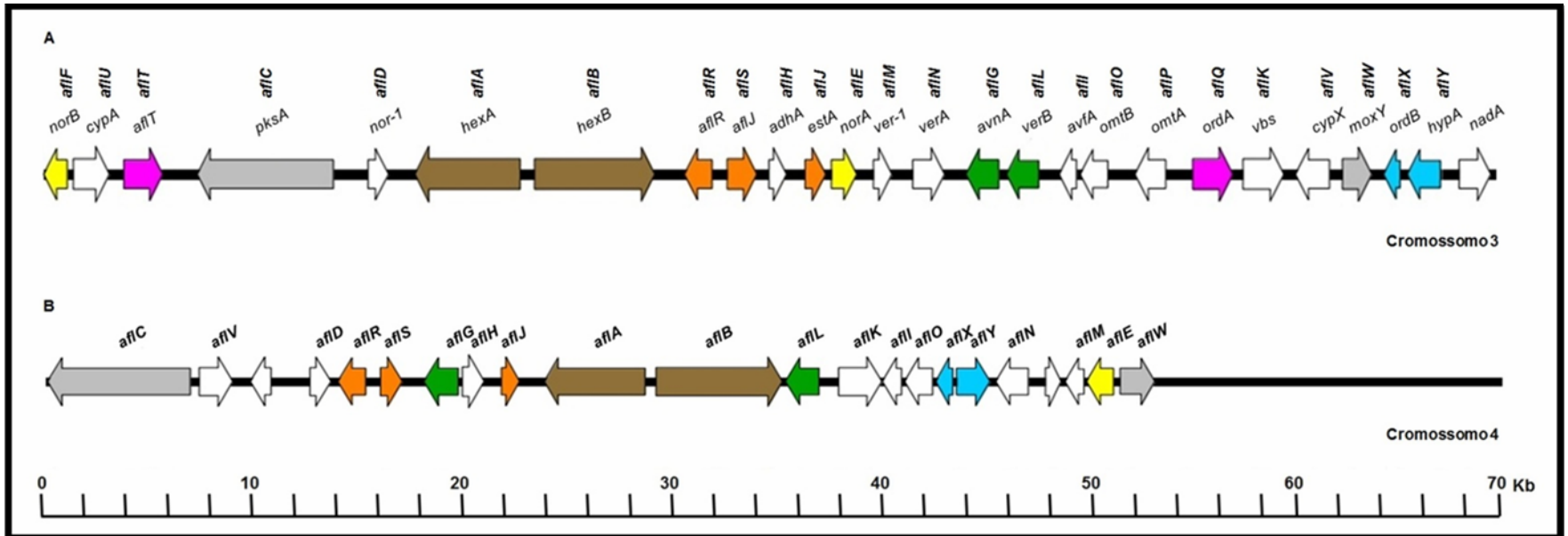
Fonte: adaptado de CARBONE et al. (2007)

Os genes que codificam as enzimas envolvidas na via biossintética da aflatoxina encontram-se organizados na forma de *cluster* gênico, observado pela primeira vez por Skory et al. (1992). Estes autores encontraram em seu estudo pioneiro genes que codificam enzimas na parte inicial da via (gene *afID* (*nor-1*)), na parte intermediária (gene *afIM* (*ver-1*)) e na parte final da via da aflatoxina (gene *afIP* (*omtA*)), além do gene regulador da biossíntese de aflatoxina (gene *afIR* (*afIR*)), sendo esses genes essenciais e localizados em uma região de 70 Kb no DNA genômico de *A. parasiticus* e *A. flavus*. Yu et al. (2002) encontraram os genes *afIV* (*cypX*), *afIW* (*moxY*) e *afIX* (*ordB*) localizados em uma das extremidades do *cluster* gênico da aflatoxina, e os genes *afIF* (*norB*), *afIU* (*cypA*) e *afIT* (*afIT*) na extremidade oposta. Espécies de *Aspergillus* estudadas e que possuem seu genoma sequenciado, possuem 8 cromossomos com tamanho variando de 3 a 7 Mb e alteração no número de genes preditos (YU et al., 2002; CARBONE et al., 2007). A inativação da expressão de alguns destes genes da

via biossintética da aflatoxina é resultante da localização deste *cluster* gênico próximo a região telomérica do cromossomo 3 tornando-se desfavorável para a expressão dos mesmos (YU et al., 2002). Entretanto, a presença do gene ***afIR*** (*afIR*) no *cluster* é necessária para a expressão dos genes em espécies de *Aspergillus* produtoras da aflatoxina.

Segundo Ehrlich (2006) a evolução deste *cluster* gênico envolveu um processo complexo que ocorreu em várias etapas ao longo dos anos, evidenciando uma provável duplicação de alguns genes do *cluster* da aflatoxina (***afIM*** (*ver-1*) e ***afID*** (*nor-1*)); ***afIP*** (*omtA*) e ***afIO*** (*omtB*); ***afIX*** (*ordB*) e ***afII*** (*avfA*); ***afIL*** (*verB*) e ***afIG*** (*avnA*); *hypB1* e *hypB2* e ***afIE*** (*norA*) e ***afIF*** (*norB*), possuindo 21%; 24%; 30%; 39%; 42% e 50% de identidade entre os aminoácidos presentes respectivamente, codificando proteínas com funções catalíticas semelhantes) assim como a deleção de outros durante este processo evolutivo, contribuindo desta forma, para que isolados de *Aspergillus* secção *Flavi* produtores e não produtores de aflatoxinas apresentem uma organização diferenciada em relação à organização deste *cluster* gênico. A Figura 3 representa a organização atualmente aceita do *cluster* gênico da via biossintética da aflatoxina em *A. flavus* e *A. parasiticus* e do *cluster* gênico da via biossintética da esterigmatocistina em *A. nidulans*.

Figura 3 - Esquema mostrando a ordem dos genes, a localização cromossômica e a direção da transcrição do *cluster* gênico da via biossintética da aflatoxina em *A. flavus* e *A. parasiticus* (A) e do *cluster* gênico da via biossintética da esterigmatocistina (ST) em *A. nidulans* (B). As cores das setas representam os sete módulos inferindo as características evolutivas dos genes. No *cluster* da aflatoxina ambas as nomenclaturas, original (gene em itálico) e nova (gene em itálico e negrito), são apresentadas



Fonte: adaptado de EHRLICH (2006); CARBONE et al. (2007)

A maioria dos isolados de *Aspergillus parasiticus* é capaz de produzir aflatoxinas (B e G), enquanto que somente 40 ou 50% dos isolados de *Aspergillus flavus* são produtores da aflatoxina do grupo B. A incapacidade de alguns isolados desta espécie em produzir aflatoxina B está relacionada à deleção ou a mutação de genes da via biossintética da aflatoxina. Geisen (1996) evidenciou através da técnica de PCR que o isolado *A. flavus* BFE310 possui uma provável deleção de parte ou de todo o *cluster* gênico da via biossintética da aflatoxina. *A. flavus* BFE311 não apresentou amplificação específica para o gene ***afIP*** (*omtA*) indicando uma deleção nesse gene, enquanto *A. flavus* BFE301 sofreu uma provável mutação no gene regulador da produção da aflatoxina. Espécies como *A. sojae* e *A. oryzae* não produtoras de aflatoxinas e comumente utilizadas na indústria alimentícia, possuem o *cluster* gênico da via biossintética da aflatoxina, porém não funcional, assim como sequências homólogas ao gene ***afIM*** (*ver-1*) e ***afIP*** (*omtA*), mas estas com variações ou mesmo deleções nestas sequências. Em *A. sojae*, foi encontrada um gene ***afIR*** (*afIR*) defeituoso devido a uma mutação que originou na deleção de 62 aminoácidos a partir de sua extremidade C-terminal.

Em alguns isolados da espécie *A. flavus* partes dos genes ***afIU*** (*cypA*) e do seu gene vizinho ***afIF*** (*norB*), que codifica para a formação de uma proteína putativa arilo álcool desidrogenase, são deletados. Essa mutação está relacionada com a perda da capacidade de *A. flavus* cepas L em produzir aflatoxinas do grupo G (EHRlich et al., 2004). A função do produto do gene ***afIF*** (*norB*) na síntese da aflatoxina é desconhecida, mas há evidências que este gene codifique uma enzima responsável por um processo oxidativo na formação da aflatoxina G1 (EHRlich et al., 2008).

Segundo Ehrlich et al. (2004) a amplificação e análise das sequências obtidas de uma porção de DNA compreendendo os genes ***afIU*** (*cypA*) e ***afIF*** (*norB*) de isolados de *A. flavus* (cepas L e S), *A. nomius* e *A. parasiticus*, revelou uma deleção de aproximadamente 0,9 e 1,5 Kb nas sequências de *A. flavus* produtores de aflatoxinas B1 e não produtores de aflatoxinas, respectivamente. Essa deleção abrange parte de ambos os genes que são transcritos a partir de uma região intergênica de 279 pb. Isolados de *A. parasiticus* e *A. nomius*, ambos produtores de aflatoxinas B e G, não apresentam deleções na referida região. Está determinado na literatura que a

integridade do gene ***afIU*** (*cypA*) é uma exigência para a biossíntese de aflatoxinas do grupo G (Ehrlich et al., 2004).

Donner et al. (2010) buscando comparar a organização do *cluster* gênico da via biossintética da aflatoxina, utilizaram diferentes isolados de *A. flavus* produtoras e não produtoras de aflatoxinas obtidas de amostras de milho da Nigéria. Isolados não produtores de aflatoxinas apresentaram resultados negativos para os produtos de PCR referentes a genes de várias regiões do *cluster*, indicando que estes isolados apresentaram grandes deleções, incluindo deleções na região 5' do *cluster* da aflatoxina, deleções esta próxima a região telomérica, opondo-se à outra extremidade do *cluster* que apresenta-se mais conservada. Isolados de *A. flavus* (AV0173 e AV0452) também apresentaram deleções dos genes *norB-cypA* opondo-se ao isolado de *A. parasiticus* (AY371490) que se apresenta íntegra.

Muitos fatores nutricionais e ambientais tais como, temperatura, pH, atividade de água (A_w), modificações climáticas, fonte de carbono e stress podem inibir ou ativar significativamente a expressão de genes do *cluster* da biossíntese da aflatoxina. A produção da aflatoxina por espécies de *Aspergillus* é influenciada devido a alterações na expressão do gene ***afIR*** (*afIR*) ou em genes estruturais que possivelmente levam a alterações na expressão de todos os outros genes do *cluster*. Abdel-Hadi et al. (2012) avaliaram os efeitos da combinação entre diferentes valores de atividade de água (0,99–0,85) e diferentes temperaturas (20–42°C) na expressão de genes do *cluster* da aflatoxina em isolados de *A. flavus* mantidos em meio de cultura. Estes autores observaram que a associação destes fatores influencia diretamente na expressão destes genes e a consequente contaminação do produto com aflatoxinas produzida pelo fungo. Valores de A_w de 0,99 e temperatura entre 30 e 35°C foram às condições ótimas para o crescimento dos isolados, enquanto que a expressão dos genes e a produção de altos níveis de aflatoxinas B1 foram possíveis entre temperaturas de 20–37°C com valores de A_w variando entre 0,98 e 0,99.

Devido ao fato de que espécies produtoras apenas de aflatoxinas do tipo G não são encontradas naturalmente, Ehrlich et al. (2004) sugerem que os isolados capazes de produzir este tipo de aflatoxina evoluíram a partir de um ancestral que produzia

aflatoxina B, enquanto que isolados produtores apenas de aflatoxinas B possam ter evoluído a partir de uma espécie produtora de ambos os tipos de micotoxinas, mas que devido a uma mutação perdeu o gene responsável pela produção de aflatoxina do tipo G, mantendo-se ativo apenas o gene responsável pela produção de aflatoxina do tipo B.

2.4 CLADO *Aspergillus nomius*: *A. nomius*, *A. pseudonomius* E *A. bombycis*

O gênero *Aspergillus* contém aproximadamente 250 espécies, as quais estão organizadas em várias secções. A secção *Flavi*, conforme já mencionado alberga as principais espécies produtoras de aflatoxinas. A taxonomia desta secção é bastante complexa e constantemente tem sofrido mudanças. O último trabalho que reorganiza a secção *Flavi* foi publicado por um pesquisador húngaro, grande conhecedor dos *Aspergillus* produtores de toxinas, e seus colaboradores (VARGA et al., 2011). Segundo este trabalho a secção *Flavi* contém 21 espécies, que podem ser agrupadas em sete clados: clado *A. flavus* (8 espécies); clado *A. tamarii* (4 espécies); clado *A. nomius* (3 espécies); clado *P. alliaceus* (2 espécies); clado *A. togoensis* (2 espécies); clado *A. leporis* (1 espécie); clado *A. avenaceus* (1 espécie). Mais recentemente, um grupo de pesquisa do ITAL, Campinas, em colaboração com o nosso Laboratório da UEL, Londrina, publicou a descrição de uma nova espécie e um novo clado na secção *Flavi*, *A. bertholletius* (Taniwaki et al., 2012). Assim, conclui-se que esta secção consta atualmente com 22 espécies, distribuídas em 8 clados.

O Clado *A. nomius* inclui as espécies *A. nomius*, *A. bombycis* e *A. pseudonomius*. *A. nomius* e *A. bombycis* são produtores de aflatoxina do grupo B e G (PETERSON et al., 2001), enquanto que *A. pseudonomius* é descrito como produtor apenas de aflatoxina B1 (VARGA et al., 2011).

A. nomius, descrito por Kurtzman et al. (1987), possui colônias cujas superfícies são flocosas, tem micélio vegetativo com coloração variando desde tons esbranquiçados até uma coloração laranja ou marrom claro, presença de esclerócios alongados e grandes de cor marrom escuro com a extremidade branca na superfície

das colônias, exudados de cor vermelha ou marrom, estipes rugosas e conidióforos uni ou bisseriados (contém métula e fiálides), com formação moderada de conídios de coloração amarelo ou verde, vesículas globosas e subglobosas (KURTZMAN et al., 1987; PETERSON et al., 2001; RIGÓ et al., 2002). Recentemente, o estágio de reprodução sexual foi identificado para a espécie *A. nomius*, sendo que nesta fase o isolado fúngico passa a ser denominado de *Petromyces nomius* (HORN et al., 2011).

A capacidade de *P. alliaceus*, *P. flavus*, *P. parasiticus* e *P. nomius* de reproduzir sexualmente ocorre devido à presença de genes “mating-type” MAT1-1 e MAT1-2, que permitem após o cruzamento entre diferentes indivíduos, o desenvolvimento de estruturas sexuais. Os ascósporos de *P. nomius* diferem ligeiramente dos ascósporos de *P. flavus* e *P. parasiticus* em tamanho e em ornamentação. *P. nomius* possui ascósporos menores quando comparado aos ascósporos das outras espécies, porém os ascósporos de *P. flavus* são ligeiramente maiores que os ascósporos de *P. parasiticus*. Muitas vezes, há uma sobreposição no tamanho dos ascósporos, por isso, essas estruturas têm pouco valor para identificação das espécies. Os ascósporos típicos de *P. flavus* e *P. parasiticus* contêm uma única e grande gotícula de óleo, enquanto os ascósporos de *P. nomius* contêm várias gotículas.

A espécie fenotipicamente mais representativa de *A. nomius* (NRRL 13137=CBS 260.88) foi isolada primeiramente a partir de amostras de trigo dos EUA e a partir de um grande número de abelhas doentes da espécie *Nomia melanderi*, gênero que originou o nome da espécie fúngica *A. nomius*. Mais recentemente, *A. nomius* foi isolado de vários substratos estando frequentemente associado com insetos, tais como abelhas e cupins, além de contribuir para a contaminação de aflatoxina em solos de áreas agrícolas levando a perdas econômicas (apud VARGA et al., 2011). *A. nomius* também tem sido isolados de frutos de casca rígida, cana de açúcar, de uma enorme variedade de sementes e grãos e de castanha do Brasil, evidenciando seu potencial como agente etiológico em eventos de contaminação por aflatoxina (KURTZMAN et al., 1987; apud VARGA et al., 2011).

Doster et al. (2009) descreveram um isolado de *A. nomius*, denominada de cepa O, que produz pequenas quantidades de aflatoxinas B e G e não produz ácido

ciclopiazônico, mas difere do isolado NRRL 13137, descrita por Kurtzman et al. (1987), em alguns poucos caracteres morfológicos. Segundo os autores, esta cepa não foi classificada como nova espécie porque foi encontrada uma alta identidade nucleotídica no gene *afIR* (*afIR*) (98 a 99%) com *A. nomius* isolado NRRL 13137. A cepa O foi isolada em amostras de pistache, nozes e figo em pomares da Califórnia, possui colônias cujos conídios apresentam coloração verde oliva tornando-se marrom com o passar do tempo, produzem esclerócios pequenos, escuros e em menor quantidade quando comparados com os esclerócios produzidos por outras espécies fúngicas aflatoxigênicas, com formato globoso ou subgloboso, sempre submersos no meio, conidióforos unisseriados e o reverso da colônia com coloração laranja (DOSTER et al., 2009).

Um estudo sobre a análise da variabilidade genética, utilizando marcadores do tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) e amplificação parcial de genes que codificam para β -tubulina, calmodulina, nitrato redutase e α -amilase A, desenvolvido alguns anos antes por FEIBELMAN et al. (1998), utilizando isolados de *A. nomius* tipo NRRL 13137 e isolados de uma cepa posteriormente denominadas de cepa O, bem como representantes de outras espécies dessa secção com morfologia similar, mostrou serem distantemente relacionados, assim como isolados com morfologia distinta que estão estritamente relacionados. Por isso, ferramentas moleculares tem se mostrado necessárias para esclarecer as relações dentro dessa secção, já que estudos de compatibilidade genética e vegetativa sugerem que esta secção é composta de numerosas linhagens clonais que divergiram em diferentes períodos, favorecendo para o aparecimento de uma extensa diversidade filogenética como a que ocorre com essas espécies da secção *Flavi*.

A espécie *A. pseudonomius* foi isolada pela primeira vez de amostras de insetos e do solo nos EUA, estando relacionada à *A. nomius*, mas como comentado anteriormente, produz apenas aflatoxinas do tipo B1. Cabe ressaltar, neste momento, que o valor desta informação é relativamente questionável, pois apenas um isolado da espécie foi analisado quanto à capacidade de produzir estas toxinas. As colônias desta nova espécie, segundo os autores que a descreveram, possuem superfície flocosa, com micélio aéreo dominante com pouca esporulação, não sendo observados

esclerócios, os conidióforos são unisseriados (contém apenas fiálides), as vesículas são globosas e subglobosas, as estipes são hialinas e lisas, os conídios são globosos a subglobosos, com coloração esverdeado e o reverso da colônia não apresenta coloração característica (VARGA et al., 2011).

O crescimento e o metabolismo dos microrganismos demanda a presença de água na forma livre, o que é denominado de “atividade de água”. As diferentes espécies fúngicas variam com relação à capacidade de crescimento e produção de micotoxinas em atividades de água reduzida. Os fungos que crescem em atividade de água menor que 0,85 são chamados de xerofílicos, e é a esta classe que pertencem às espécies da secção *Flavi*. Segundo Pitt e Miscamble (1994) a avaliação do crescimento de *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* em diferentes atividades de água (0,75 a 0,99) e temperaturas (25, 30 e 37°C), utilizando glicose e frutose para o controle da atividade de água no meio, determinaram que os valores mínimos para o crescimento dos fungos mostrou-se similar, com valores de 0,82 à 25°C; 0,81 à 30°C e 0,80 à 37°C, entretanto, *A. nomius* foi ligeiramente menos xerofílico que as demais espécies. Para a produção da aflatoxina por *A. flavus* os valores de atividade de água são de 0,82 a valores maiores de 0,99 e a atividade de água mais favorável é de 0,95 à 0,99 (PITT e MISCAMBLE, 1994). De acordo com Maia e Siqueira (2007) o teor mínimo de umidade dos alimentos favorável ao crescimento de *A. flavus* encontra-se em torno de 85% de umidade relativa do ar e temperatura ótima entre 25 e 30°C. Foi mencionado no estudo de Varga et al., (2011) que *A. pseudonomius* parece diferir de *A. nomius* com relação a este caráter, mas este atributo deve ser mais detalhadamente investigado.

Aspergillus bombycis foi descoberto durante o isolamento de fungos a partir de amostras de fezes dos insetos bicho-da-seda coletados em casas do Japão e Indonésia. As colônias fúngicas apresentam crescimento moderado em diferentes meios e temperaturas, não ultrapassando 37°C, com coloração variando em tons de amarelo, quando imaturas podendo atingir tons mais esverdeados e raramente atingem uma coloração marrom ou bronze, com o reverso das colônias variando de incolor a uma coloração amarela bem clara. Esta espécie apresenta estipes lisas, os conidióforos contêm vesículas globosas e bisseriadas (contém métula e fiálide) com conídios

rugosos, globosos ou subglobosos. Os esclerócios não são observados nas colônias de *A. bombycis* (PETERSON et al., 2001).

2.5 AFLATOXINAS E FUNGOS AFLATOXIGÊNICOS EM CASTANHA DO BRASIL

A ocorrência de aflatoxinas em castanhas do Brasil tem sido pesquisada no Brasil e em vários outros países do mundo. O trabalho realizado por Castrillón e Purchio (1988) demonstrou que 3, dentre 100 amostras, de castanha do Brasil coletadas de usinas de beneficiamento, mercados e feira-livres em Manaus e de supermercados de São Paulo estavam contaminadas com níveis de AFB1 entre 0,1 a 2,25 µg/Kg e de AFG1 entre 0,075 a 1,5 µg/kg, respectivamente.

Um trabalho feito por Pohland (1993) nos Estados Unidos demonstrou que dentre 176 amostras de castanhas do Brasil analisadas, 11% estavam contaminadas com aflatoxinas em níveis variando desde traços até 20 µg/kg, e 6% estavam contaminadas com níveis maiores que 20 µg/kg. No Japão, de 74 amostras de castanhas do Brasil analisadas somente 2 continham aflatoxinas com níveis maiores que 10 µg/kg. O nível máximo detectado foi 123 µg/kg (JECFA, 1998).

Pacheco e Scussel (2009) coletaram amostras de castanha do Brasil em uma fábrica localizada na cidade de Manaus, no Estado do Amazonas e demonstraram que 68,7% das amostras de castanhas analisadas estavam contaminadas com 1,2 a 11,5 µg/kg de AFB1. Novamente, Pacheco et al. (2010) detectaram aflatoxinas em 7,5% (9/120) das amostras de amêndoas de castanha do Brasil coletada na cidade de Manaus entre 2003 e 2006. As aflatoxinas (8 a 686 µg/Kg) foram detectadas nas amostras provenientes da etapa de recepção e de comercialização.

Calderari et al. (2013), investigaram amostras de castanha do Brasil retiradas da floresta, em fase de processamento antes e depois da classificação, e de mercados dos Estados de São Paulo e Amazonas. Os níveis de aflatoxinas total encontrados em amostras retiradas de florestas tropicais foi de 0,7 µg/kg, de plantas de processamento antes e depois da classificação 8,0 e 0,1 µg/kg, respectivamente, a partir de mercados

de rua na Amazônia 6,3 µg/kg e de supermercados no Estado de São Paulo 0,2 µg/kg. Os autores mostraram ainda, que o processamento que incluiu triagem manual ou mecânica e secagem a 60°C durante 30 a 36 h, eliminou em média, mais do que 98% do total das aflatoxinas. Estes resultados mostraram que a classificação é uma maneira muito eficaz para diminuir teor de aflatoxinas em castanha.

As pesquisas relacionadas à presença de toxinas em castanha do Brasil não se restringem apenas à presença da toxina, mas também vislumbram a identificação e caracterização dos fungos que as infectam em diferentes fases da cadeia produtiva.

Olsen et al. (2008) analisaram 22 isolados de *Aspergillus* seção *Flavi* obtidos de amostras de castanha do Brasil, e dentre estes, 19 isolados eram da espécie *A. flavus*, sendo 10 produtoras de aflatoxinas do tipo B e 9 isolados não produtoras de aflatoxinas. Também foi obtido 1 isolado da espécie *A. nomius* e 2 outros isolados cujas espécies não foram confirmadas. Devido a nenhum isolado da espécie *A. parasiticus* (produtor de AFB e AFG) ter sido obtido e que *A. flavus* não é capaz de produzir aflatoxina do tipo G, os autores sugeriram que *A. nomius* (produtor de AFB e AFG) é a espécie responsável pela presença de aflatoxina G em castanha do Brasil.

Um trabalho desenvolvido por Costa et al. (2009) buscou isolar e identificar fungos obtidos de amostras de castanha do Brasil com e sem casca comercializados no município de Fortaleza, Ceará. Segundo estes autores, o elevado percentual de infecções deste produto pela espécie *A. flavus*, potencialmente aflatoxigênica, explica a frequência com que a aflatoxina tem sido detectada em amostras de castanha do Brasil.

Baquião et al. (2012) avaliaram a presença de fungos, aflatoxinas e ácido ciclopiazônico em amostras de castanha do Brasil coletadas a campo e em armazenamento. Em todos os substratos analisados (solo, ar, ouriço, castanhas com casca e amêndoas) *A. flavus*, *Fusarium* spp e *Penicillium* spp, foram encontrados. Dentre estes, *A. flavus* foi a espécie mais frequente. Os autores sugeriram que a contaminação da castanha do Brasil ocorra ainda em campo e que o solo é o principal reservatório para *A. flavus*. O uso de taxonomia polifásica permitiu ao mesmo grupo de pesquisadores (BAQUIÃO et al., 2013) identificar que dentre os *Aspergillus* seção *Flavi* encontrados em castanha do Brasil, 75,5% eram *A. flavus*, 22,3% eram *A. nomius* e

2,2% eram *A. parasiticus*. Todos os isolados de *A. nomius* e *A. parasiticus* eram produtores de aflatoxinas B e G, mas não de ácido ciclopiazônico. Dentre os isolados de *A. flavus*, uma alta frequência de isolados produtores de aflatoxina B1 e ácido ciclopiazônico foram encontrados.

Gonçalves et al. (2012) estudaram diversos isolados de *Aspergillus* secção *Flavi*, através de marcadores de RAPD e sequências de nucleotídeos, e detectaram alta diversidade genética sendo *A. flavus*, *A. bombycis*, *A. arachidicola* e *A. nomius* as principais espécies aflatoxigênicas encontradas. Segundo estes autores, *A. nomius* foi frequentemente isolado de castanha do brasil, sendo uma espécie altamente produtora de aflatoxina B1 e G1.

Buscando identificar a microbiota fúngica e a consequente produção de micotoxinas em amostras de castanha do brasil coletadas na região Amazônica Brasileira, Reis et al. (2012b) analisaram 254 isolados de *Aspergillus* secção *Flavi* obtidos de castanha do brasil, sendo a espécie *A. nomius* a mais incidente (56% no Acre, 81% no Amazonas, 68% no Amapá e 62% no Pará), seguido de isolados de *A. flavus* que foram obtidos em todas as regiões estudadas (33% no Acre, 13% no Amazonas, 29% no Amapá e 35% no Pará). Isolados de outras espécies de *Aspergillus* secção *Flavi* também foram identificadas, porém em frequências muito baixas. Segundo estes autores, os resultados da análise do potencial aflatoxigênico de isolados de *A. flavus* revelaram produção de aflatoxinas B1 e B2 por 52% dos isolados dessa espécie, com níveis variando de 67,83 a 187,10 µg/Kg de aflatoxina B1. Entretanto, todos os isolados de *A. nomius* produziram aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, com níveis de produção variando de 2.313,68 a 285.901,89 µg/Kg de aflatoxina B1, evidenciando que dentre os isolados da secção *Flavi* obtidos da castanha do brasil o maior nível de produção de aflatoxina B1 ocorreu entre aqueles da espécie *A. nomius*.

Resultados obtidos por Calderari et al. (2013) demonstram que do total de fungos *Aspergillus* secção *Flavi* isolados de amostras de castanha do brasil, 1.235 (30%) dos isolados com potencial para produção de aflatoxinas foram da espécie *A. nomius*, enquanto que 1.212 (29%) dos isolados foram da espécie *A. flavus*. Este resultado é extremamente preocupante pelo fato de que 100% dos isolados de *A.*

nomius são produtores de aflatoxinas, enquanto que apenas 46% dos isolados de *A. flavus* são capazes de produzir aflatoxinas. Um número baixo de isolados de outras espécies dessa secção, incluindo espécies produtoras e não produtoras também foram isoladas destas mesmas amostras de castanha do Brasil, mas *A. nomius* permanece sendo a fonte mais importante de contaminação da castanha por aflatoxina.

Estes trabalhos da literatura não deixam dúvidas que o principal agente contaminante da castanha do Brasil com aflatoxinas é o fungo *A. nomius*. Apesar disso, esta espécie tem sido menos estudada que outras da secção, tais como *A. flavus* e *A. parasiticus*. Estudos que contemplam esta importante espécie produtora de aflatoxinas são uma necessidade contemporânea e preponderante.

2.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Aspergillus* SECÇÃO *Flavi*

Métodos clássicos para a identificação de isolados de *Aspergillus* secção *Flavi* baseiam-se na análise das características morfológicas macro e micromorfológicas observadas nas culturas fúngicas em crescimento em diferentes meios de cultura. Estes procedimentos são demorados, exigem um amplo conhecimento micológico e podem tornar-se imprecisos devido às similaridades das características morfológicas interespecíficas observadas nas mais variadas espécies da secção. O uso de sequências de nucleotídeos para a identificação de fungos, incluindo os aflatoxigênicos, tem permitido a identificação rápida e precisa de espécies. Além disso, dados de sequências de nucleotídeos também têm sido altamente determinantes para a classificação de novas espécies. Existem várias regiões do DNA fúngico propostas para a identificação de espécies, dentre elas os Espaços Internos Transcritos (ITS - Internal Transcribed Spacer) do DNA nuclear ribossomal, regiões dos genes que codificam para β -tubulina e calmodulina, entre outras (VARGA et al., 2011).

Em 2003, o pesquisador canadense Paul D N Hebert preocupado com a limitação da identificação morfológica e com a escassez de taxonomistas especializados nos diferentes grupos de organismos, sinalizaram a necessidade de uma nova abordagem para identificação de taxa e propuseram o uso de "DNA

barcoding” como forma rápida de identificar as espécies de diferentes organismos. A ideia do DNA barcoding é usar uma ferramenta padronizada para identificar todas as espécies, ou seja, usar uma mesma sequência gênica para identificar todas as espécies de um dado reino. Em 2004, foi estabelecido o consórcio “Barcode of Life”, o qual é uma iniciativa internacional dedicada a desenvolver códigos de barras de DNA como um padrão global para a identificação das espécies biológicas. A padronização forneceria resultados comparáveis que poderiam ser facilmente repetidos por qualquer pessoa, mesmo que este não seja um especialista em taxonomia. A principal exigência do “Barcoding” é que a sequência de DNA possua variação interespecífica suficiente para identificar as espécies individuais, mas não muita variação intraespecífica. Para fungos a região ITS foi escolhida como a principal região de barcoding (Schoch et al., 2012). No entanto, infelizmente vários trabalhos tem demonstrado que sequências de nucleotídeos da região ITS não tem resolução suficiente para discriminar todas as espécies de determinadas grupos fúngicos.

A taxonomia de *Aspergillus* secção *Flavi* vem sendo estudada por muitos taxonomistas e apresenta-se em constante alteração. Atualmente, a identificação precisa de espécies de *Aspergillus* secção *Flavi* faz uso de métodos de análise de características morfológicas das culturas fúngicas, produção de metabólitos secundários e sequências de nucleotídeos. Juntas, estas abordagens recebem o nome de taxonomia polifásica.

Conforme dados apresentados por Nakamura et al. (2011) a análise molecular utilizando sequências gênicas de RNA (rDNA) 5,8S, 18S e 28S e seus respectivos ITSs não são apropriadas para identificar espécies de *Aspergillus* secção *Flavi* por serem compostos por regiões demasiadamente conservadas para tal finalidade. Devido a um maior grau de variabilidade, as sequências que codificam para os genes da β -tubulina e calmodulina são preferidas pelos taxonomistas para a identificação e classificação de *Aspergillus* secção *Flavi* (VARGA et al., 2011).

Varga et al. (2011) utilizaram sequências de ITS e dos genes que codificam para calmodulina e β -tubulina para examinar a relação evolucionária dentro de *Aspergillus* section *Flavi*. Os dados indicaram que a secção é constituída de 21 espécies que se

organizam em sete clados. Ainda neste trabalho, a análise das sequências corroboraram para a descrição de duas novas espécies, *A. pseudonomius* e *A. pseudocaelatus*. É importante ressaltar que várias das espécies definidas por Varga e colaboradores, baseando-se em sequências de calmodulina e β -tubulina e produção de metabólitos secundários, não são discriminadas pelas regiões ITS1 e ITS2. Um exemplo é a recente descrição por Taniwaki et al. (2012) utilizando sequências que codificam para β -tubulina e calmodulina descreveram a espécie *A. bertholletius*, isolada a partir de amostras de castanha do Brasil.

Também é possível analisar molecularmente espécies fúngicas produtoras e não produtoras de aflatoxinas baseando-se em genes relacionados com a via biossintética da aflatoxina. O gene ***afIP*** (*omtA*) é um gene da via biossintética da aflatoxina, utilizado para identificar *A. flavus* e *A. oryzae* dentro da secção *Flavi*, o gene ***afIM*** (*ver-1*) também pertencente a via biossintética da aflatoxina, é utilizado para identificar espécies produtoras e não produtoras de aflatoxina da secção *Flavi* (EHRlich et al., 2005), o gene ***afIR*** (*afIR*) regulador biossintético da transcrição da aflatoxina e o ***afIT*** (*afIT*), gene transportador de toxinas (GODET e MUNAUT, 2010), são mais apropriados para identificar espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* secção *Flavi*, pois suas sequências são variáveis. Nakamura et al. (2011) basearam-se no *cluster* gênico da via biossintética da aflatoxina e identificaram quatro genes eficazes para diferenciar espécies estritamente relacionada, produtoras ou não de aflatoxinas dentro do gênero *Aspergillus* secção *Flavi*, sendo estes o gene ***afIR*** (*afIR*) e o gene ***afIT*** (*afIT*) já descritos anteriormente e os genes ***afIE*** (*norA* - ácido norsolorínico redutase) e ***afIK*** (*vbs* - oxidase/dehidrogenase para síntese de versicolorina B) suprimindo a deficiência das análises baseadas em apenas um único loco gênico.

Abdin et al. (2010) desenvolveram um estudo evidenciando o uso de técnicas moleculares para a correta identificação de espécies de *Aspergillus* secção *Flavi*. Esses métodos moleculares baseiam-se na detecção das diferenças nas sequências de ácidos nucleicos através de PCR utilizando, por exemplo, *primers* específicos para amplificação do gene da aflatoxina (*afIR*), que permitirá identificar espécies produtoras e não produtoras de micotoxinas.

Também é possível através da PCR e do uso de *primer* espécie específicos distinguir várias espécies de *Aspergillus* secção *Flavi*. Os *primers* espécie específicos podem ser desenhados a partir de polimorfismos obtidos por diferentes marcadores moleculares anônimos e multilocais. O agrupamento de isolados semelhantes e o conhecimento das diferenças existente entre os grupos formados são de extrema importância e podem ser obtidos por meio das análises de diversidade genética com marcadores dominantes do tipo RAPD, método rápido e simplificado que por meio de uma reação de PCR revela informações para vários locos dispersos pelo genoma não havendo necessidade de informações genéticas antecipadas sobre as sequências alvos, e AFLP, técnica que utiliza de enzimas de restrição para a fragmentação da molécula de DNA e adaptadores que se ligam as extremidades dos fragmentos gerados associados a iniciadores que permitirão a amplificação de um fragmento específico, apresentando alta sensibilidade e reprodutibilidade. Ambas as metodologias são utilizadas para detecção de polimorfismos de DNA, e quantificação da variação genética.

Midorikawa et al. (2008) objetivaram determinar a variabilidade genética em populações de *A. flavus* isoladas de amostras de castanha do brasil e castanha de caju por meio da análise de RAPD e da sequência de nucleotídeos da região ITS do DNA ribossômico, bem como o desenvolvimento de um método específico para detecção da espécie. Por meio da amplificação com onze *primers* de sequência arbitrária, foram obtidos 141 bandas que permitiram a distinção genética entre os isolados analisados. A análise da sequência de nucleotídeos baseada na região ITS1-ITS2 também possibilitou a observação de uma variabilidade interespecífica, sendo esta utilizada para a obtenção de *primers* específicos, ASPITSF2 (forward) e ASPITSR3 (reverse), para a identificação da espécie *A. flavus*.

Como comentado anteriormente, Gonçalves et al. (2012) utilizando a técnica de RAPD, observaram alta diversidade genética entre as espécies de *Aspergillus* secção *Flavi* analisadas. O perfil molecular de alguns isolados divergiu significativamente de outros da secção *Flavi*, e esta observação suscitou a realização de um segundo trabalho que veio a descrever uma nova espécie na secção *Flavi*, *A. bertholletius* (TANIWAKI et al., 2012).

Em um estudo desenvolvido por Jamali et al. (2012) os autores relataram o isolamento de 193 isolados de *Aspergillus flavus* de amostras de solos com cultivo de pistache, sendo 59% destes produtores de aflatoxinas. As análises do dendrograma obtidos a partir do perfil gerado após amplificação com cinco *primers* de RAPD de 24 isolados de *A. flavus* previamente selecionados demonstrou a formação de dois grupos distintos. Segundo os dados apresentados, o primeiro grupo é composto por isolados produtores e não produtores de aflatoxinas e o segundo grupo é composto somente por isolados produtores de aflatoxinas do tipo B1 e B2. Por meio da técnica de RAPD também foi possível observar uma alta diversidade genética e diferenciar isolados de *A. flavus* e *A. parasiticus*, espécies estas estritamente relacionadas dentro da secção *Flavi*, confirmando a importância desta técnica para estudos taxonômicos de espécies morfológicamente semelhantes da secção *Flavi*.

Uma seleção de vinte e quatro isolados de *A. sojae*, *A. parasiticus*, *A. oryzae* e *A. flavus*, produtores e não produtores de aflatoxinas foram utilizados por Montiel et al. (2003) em um estudo de diversidade genética por meio da técnica de AFLP. A análise de 12 diferentes combinações de enzima de restrição/iniciadores permitiu identificar 500 fragmentos potencialmente polimórficos, possibilitando a separação de isolados de *A. sojae* e *A. parasiticus* de isolados de *A. oryzae/A. flavus*. Porém, este estudo não permitiu a distinção entre isolados da espécie *A. oryzae* e *A. flavus*. Buscando um método para a separação das espécies e a confirmação da taxonomia destes isolados, estes autores, também sequenciaram a região ITS do DNA ribossômico destes isolados selecionados. A separação dentre *A. sojae/A. parasiticus* e *A. oryzae/A. flavus* foram obtidas, porém, a região ITS foi incapaz de separar isolados de *A. sojae* e *A. parasiticus*. Uma variação na sequência ITS entre isolados de *A. oryzae* e *A. flavus* foi observada, mas esta não se mostrou capaz de ser utilizada para a identificação das espécies. Durante este estudo também foi observado incoerência na anotação dos isolados depositados em banco de dados, podendo gerar confusões na classificação de isolados de *Aspergillus* secção *Flavi*. Igualmente um estudo conduzido por Lee et al. (2004) buscaram por meio da técnica de AFLP diferenciar isolados de *A. flavus* e *A. oryzae*. Os resultados obtidos demonstraram a possibilidade de diferenciação de *A.*

flavus de *A. oryzae* por meio de três pares de iniciadores seletivos obtidos por AFLP, através de diferentes fragmentos que foram detectados para ambas as espécies.

Um trabalho desenvolvido por Rocha et al. (2012) buscaram caracterizar a diversidade genética por meio da técnica de AFLP, o tipo de esclerócio produzido e a capacidade de produção de aflatoxina por linhagens de *Aspergillus* secção *Flavi* isoladas de amostras de milho de diferentes origens brasileiras. Apenas isolados da espécie *A. flavus* foram obtidos e por meio da técnica de AFLP foi possível observar uma grande variabilidade genética entre os isolados. Segundo estes mesmos autores, 34% dos isolados foram classificados como S e 66% dos isolados como L, baseada na produção de esclerócios. Para os dados de produção de aflatoxinas dos isolados, estes autores basearam-se no uso dos genes *afIR* (*afIR*) e *afIP* (*omtA*), ambos pertencentes a via biossintética da aflatoxina, onde 52,8% mostraram-se produtores de aflatoxina B1 e 47,2% produtores de aflatoxina B1 e B2. Esses dados apresentados evidenciam a não correlação entre a produção de esclerócios e o potencial aflatoxigênico dos isolados.

Os mesmos objetivos foram almejados por Reis et al. (2012a). Estes consistiram em analisar a variabilidade genética de isolados da espécie *A. flavus* obtidas de amostras de amendoim por meio da utilização da técnica de AFLP, buscando existência de associação de um perfil genético com a produção de aflatoxina e a formação de esclerócios. Os 78 marcadores permitiram identificar geneticamente, no dendrograma, doze grupos de isolados de *A. flavus* com similaridade entre os isolados variando de 37 a 100%. Segundo estes autores, embora 91,7% das amostras analisadas foram produtoras de aflatoxina e 83,9% serem produtoras de esclerócios, estes dados novamente não apresentaram correlação entre os grupos geneticamente formados com a produção de aflatoxina e a presença de esclerócios.

Para finalizar, citamos o trabalho de Godet e Munaut (2010) que desenvolveram um par de *primer* específico (*Anits-F/Anits-R*) para a detecção de *A. nomius*. Embora esta metodologia seja de grande valia para aqueles que necessitem detectar *A. nomius* em substratos quaisquer, é importante ressaltar que este *primer* não é capaz de discriminar *A. nomius* de *A. pseudonomius* (Fungaro, 2013, comunicação pessoal). Um

método de PCR específica para discriminação destas duas espécies ainda está por ser desenvolvido.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAL

Este trabalho objetivou analisar a variabilidade genética de isolados previamente identificados por meio de técnicas de morfologia clássica como pertencentes à espécie *Aspergillus nomius* e obtidos de amostras de castanha do Brasil com e sem casca em diferentes estágios da cadeia produtiva, através de técnicas moleculares de RAPD, AFLP, sequências de nucleotídeos de parte dos genes que codificam para β -tubulina e calmodulina, bem como a análise das sequências destes genes de todas as espécies incluídas no Clado *A. nomius* e que encontram-se disponíveis no banco de dados do NCBI. Também objetivamos analisar os isolados quanto à tolerância à baixa atividade de água e a análise do perfil de produção de aflatoxinas pelos isolados em estudo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a variabilidade genética, por meio de marcadores moleculares RAPD e AFLP, de 40 isolados previamente identificados por meio de técnicas de morfologia clássica como pertencente à espécie *Aspergillus nomius* e obtidos de amostras de castanha do Brasil.

- Analisar a variabilidade genética, por meio de sequências de nucleotídeos de parte dos genes que codificam para β -tubulina e calmodulina, dos isolados previamente identificados como *Aspergillus nomius*.

- Analisar a variabilidade genética, por meio de sequências de nucleotídeos de parte dos genes que codificam para β -tubulina e calmodulina, de todos os isolados

incluídos no Clado *Aspergillus nomius* e cujas sequências encontram-se disponíveis no banco de dados do NCBI.

- Analisar a presença ou a ausência de genes (*norB-cypA*) relacionados com a produção de aflatoxinas do tipo G, bem como analisar o perfil de produção da referida micotoxina nos isolados em estudo.

- Realizar análises macro e micromorfológicas de *A. pseudonomius*.

- Comparar a capacidade de crescimento de *A. nomius* e *A. pseudonomius* em meio de cultura com diferentes níveis de atividade de água.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para identificação molecular e análise da variabilidade genética foram obtidos e analisados 40 isolados previamente identificados por métodos morfológicos como *Aspergillus nomius*. Os isolados foram fornecidos pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas, SP. Foram obtidos de amostras de castanha do Brasil com e sem casca, flores e solo provenientes dos Estados do Amazonas, Pará e São Paulo. Todos os isolados foram previamente analisados com relação à capacidade de produção de aflatoxinas descrito por Filtenborg et al., (1983), sendo todos produtores dos tipos B e G.

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Cada isolado fúngico foi inicialmente cultivado a 28°C em meio de cultura completo descrito por Pontecorvo et al. (1953) durante 7 dias.

A partir destas culturas, foi preparada uma suspensão de aproximadamente 10^7 conídios em 2,5 mL de Tween 80. A suspensão foi inoculada em frascos erlenmeyer contendo 50 mL de meio completo líquido com incubação sob agitação constante de 180 rpm, 28°C durante 16 a 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, o micélio de cada isolado foi coletado por filtração para posterior extração de DNA.

Os ácidos nucleicos foram extraídos como descrito por Azevedo et al. (2000). O micélio resultante do processo de filtração foi macerado em nitrogênio líquido, até obter-se um pó fino. Aproximadamente 60 mg foi transferido para microtubos (2 mL) e adicionado 800 µL de tampão de extração (Tris-HCl 1 M, pH 8,0; EDTA 0,5 M, pH 8,0; NaCl 5 M; SDS 10% p/v e 12 mL q.s.p. de água ultrapura). Os componentes foram homogeneizados por inversão dos microtubos e incubados em banho Maria a 65°C

durante 15 a 20 minutos. Após este período, foi adicionado 800 μL de fenol (Invitrogen[®]), seguido de homogeneização e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro microtubo, seguido da adição de 800 μL de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 25:24:1, respectivamente, com posterior homogeneização e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. Novamente a fase aquosa foi transferida para outro microtubo, seguido da adição de 800 μL de clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 24:1, respectivamente, com posterior homogeneização e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. À fase aquosa resultante foi adicionado 1:10 do volume de NaCl 3 M e 2 volumes de etanol absoluto seguido de incubação a -20°C por 60 minutos para a precipitação do ácido nucleico e posterior centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. Ao *pellet* foi adicionado 300 μL de etanol 70% seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos e posterior secagem a 25°C . O *pellet* foi ressuspendido em aproximadamente 100 μL de tampão TE (Tris-HCl 1 M pH 8,0; EDTA 0,5 M pH 8,0 e q.s.p. de água destilada), e armazenamento a -20°C .

4.3 TRATAMENTO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS COM RNASE A

Uma alíquota de 40 μL de DNA genômico de cada isolado foi submetido ao tratamento com RNase A. Para este volume, foi adicionado 2 μL de RNase A (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), com incubação a 37°C durante 20 minutos. A inativação da enzima foi obtida com incubação a 65°C por 5 minutos. Após este período, cada amostra de DNA foi diluída 10x em água ultrapura e quantificada.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

A quantificação do DNA extraído ocorreu através de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 1x (108 g de Tris-base; 55 g de H_3BO_3 ; 40 ml de EDTA 0,5M pH 8,0 e q.s.p. 1L de água destilada), utilizando-se como padrão de comparação o DNA do fago *lambda* nas concentrações de 50 ng, 100 ng, 150 ng e 200

ng. A quantificação do DNA extraído foi determinada por leitura da intensidade de fluorescência das bandas coradas com brometo de etídio (0,5 µg/mL) comparando a fluorescência do DNA extraído dos isolados com a fluorescência padrão do DNA do fago lambda. Após a quantificação, todos os DNAs foram diluídos a uma concentração padrão de 5 ng/µL para uso nas demais etapas.

4.5 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR RAPD

A análise da variabilidade genética dos isolados morfológicamente identificados como *A. nomius*, ocorreu por meio da técnica de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990) utilizando-se os *primers* OPAM-02, OPAM-07, OPE-07, OPE-19, OPX-03, OPX-07, OPX-7, OPX-11, OPX-13 (Operon, Technologies).

As reações de amplificação foram realizadas com um volume final de 25 µL composto por: 2,5 µL de tampão (Invitrogen Life Technologies, USA – 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCL 10x concentrado), 2,5 µL de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA – 2,5 mM), 2,5 µL de *primers* de sequência arbitrária de 10 nucleotídeos (Operon Technologies, CA – 2,5 µM), 7,5 µL de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, USA – 10 mM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, USA – 5 U/µL), 2 µL da amostra de DNA (5 ng/µL) e 7,8 µL de água ultrapura. Uma reação controle foi realizada a partir da substituição de DNA genômico por água ultrapura. As reações foram submetidas a um termociclador PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) programado para um ciclo inicial de desnaturação a 92°C por 5 minutos, 39 ciclos composto por desnaturação a 92°C por 40 segundos, anelamento a 40°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. Após o término da reação de amplificação, os produtos de RAPD foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,4% (p/v) em tampão TBE 1x. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados utilizando transiluminador UV e Sistema de Imagem Digital LPIX (Loccus[®]).

4.6 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR AFLP

A análise da variabilidade genética dos isolados também foi realizada por meio da técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS et al., 1995) utilizando-se a combinação de *primers* adaptador da enzima *EcoRI* + AA / adaptador da enzima *MseI* + CA, adaptador da enzima *EcoRI* + AG / adaptador da enzima *MseI* + CA e adaptador da enzima *EcoRI* + CG / adaptador da enzima *MseI* + AG.

Inicialmente foi realizada uma dupla digestão, utilizando 10 µL de DNA a 50 ng/µL, 2 µL de tampão da enzima 10x NEBiolabs[®], 0,2 µL de BSA 100x NEBiolabs[®], 0,6 µL da enzima *MseI* a 10 U/µL (NEBiolabs[®]) (corte freqüente), 0,3 µL da enzima *EcoRI* a 20 U/µL (NEBiolabs[®]) (corte raro) e 6,9 µL de água ultrapura esterilizada para completar o volume final de 20 µL. Os microtubos foram incubados por 4 horas a 37°C e, em seguida, por 20 minutos a 65 °C, para bloquear a ação das enzimas. Ao produto digerido foram ligados adaptadores, por meio de reações com volume final de 20 µL, acrescentando-se, ao material digerido, 2 µL de tampão ligase 10x (NEBiolabs[®]), 1 µL de adaptador *EcoRI* a 5 µM, 1 µL de adaptador *MseI* a 50 µM, 0,17 µL da enzima T4 DNA Ligase a 400 U/µL (NEBiolabs[®]) e 15,83 µL de água ultrapura esterilizada. Em seguida, os tubos foram incubados overnight a 16°C, em seguida, por 20 minutos a 65°C para inativação das enzimas. Para a pré-amplificação dos fragmentos, foi realizada uma PCR, com combinações de *primers* complementares às extremidades dos adaptadores *EcoRI* e *MseI*. A reação de PCR foi realizada em um volume final 15 µL, contendo 3 µL de tampão 5x (Promega[®]), 0,37 µL de cada *primer* a 5 µM, 1,2 µL de dNTP a 2,5 mM, 0,9 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega[®]), 0,6 µL da enzima Taq DNA polimerase a 5 U/µL (Promega[®]), 3 µL do DNA digerido e ligado ao adaptador e 5,5 µL de água ultrapura esterilizada. A reação de amplificação foi submetida ao termociclador Applied Biosystems Modelo Gene Amp PCR System 9700, previamente programado para um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, 26 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com um ciclo final de extensão a 72°C durante 5 minutos. O produto desta pré-amplificação foi diluído 10x em água ultrapura e utilizado na reação de amplificação

seletiva. Essa reação de PCR foi realizada em um volume final 15 μL , contendo 3 μL de tampão 5x (Promega[®]), 0,37 μL de cada *primer* específico a 5 μM , 1,2 μL de dNTP a 2,5 mM, 0,9 μL de MgCl_2 a 25 mM (Promega[®]), 0,3 μL da enzima Taq DNA polimerase a 5 U/ μL (Promega[®]), 5 μL do DNA pré-amplificado e 3,8 μL de água ultrapura esterilizada. A reação de amplificação foi submetida ao termociclador Applied Biosystems Modelo Gene Amp PCR System 9700, previamente programado para um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, 12 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, 23 ciclos constituídos de 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, com um ciclo final de extensão a 72°C durante 5 minutos. A separação dos fragmentos foi realizada em gel de poliacrilamida 5% (acrilamida/bisacrilamida 19:1, uréia 7,5 M), em um sistema “Sequi-Gen GT” (Bio Rad[®]) à potência de 80 W durante 5 horas, e corado com solução nitrato de prata 0,2% (p/v).

4.7 ANÁLISE DOS DADOS DE RAPD E AFLP

Os dados de RAPD e AFLP foram analisados quanto à presença (1) ou ausência (0) de bandas em eletroforese para cada um dos 40 isolados analisados. A análise dos agrupamentos foi realizada através do programa computacional NTSYS-PC Versão 2.1 (“*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*”) (ROHLF, 2000), com o auxílio de uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard. Esses dados foram utilizados pelo programa para a construção de um dendrograma pelo o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Mean*). A análise de bootstrap com 1.000 repetições foi realizada utilizando o programa WINBOOT (*International Rice Research Institute*, Manila, Philippines) para determinar os limites de confiança observado nos agrupamentos gerados no dendrograma.

Foi realizado um teste de atribuição, pelo programa *Structure* Versão 2.2.3 (Department of Human Genetics, University of Chicago) (PRITCHARD et al., 2000).

Através deste programa foi possível identificar populações geneticamente homogêneas dentro de um grupo de organismos de origens geográficas e/ou substratos distintos.

4.8 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE β -TUBULINA E CALMODULINA

O DNA de dez isolados (ITAL 286, ITAL 603, ITAL 632, ITAL 638, ITAL 849, ITAL 1230, ITAL 1289, ITAL 1659, ITAL 6071 e ITAL 7290) representativos dos grupos formados após análise de RAPD foram selecionados e submetidos à amplificação e sequenciamento, buscando confirmar a identificação das espécies.

Para a reação de amplificação foram utilizados os *primers* Bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT TTC 3') e Bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3') para amplificação de parte do gene que codifica para β -tubulina (GLASS e DONALDSON, 1995), e os *primers* cmd5 (5' CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC 3') e cmd6 (5' CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG 3') para amplificação de parte do gene que codifica para calmodulina (HONG et al., 2006). Ambas as reações foram preparadas em um volume final de 25 μ L composto por: 2,5 μ L de tampão (Invitrogen Life Technologies, USA – 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCL 10x concentrado), 2 μ L de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA – 2,5 mM), 1 μ L de cada um dos respectivos *primers* (Invitrogen, Life Technologies, USA – 10 pmol/ μ L), 1 μ L de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, USA – 50 mM), 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, USA – 5 U/ μ L), 2 μ L da amostra de DNA (5 ng/ μ L) e 15,3 μ L de água ultrapura. Uma reação controle foi realizada a partir da substituição de DNA genômico por água ultrapura. As reações foram submetidas a um termociclador PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) programado para um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 1 minutos, 34 ciclos composto por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minutos, seguido de um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos para ambos os genes analisados. Após o término da reação de amplificação, os produtos foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), corados com brometo de etídio e

fotografados utilizando transiluminador UV e Sistema de Imagem Digital LPIX (Loccus[®]).

4.9 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DOS GENES DE β -TUBULINA E CALMODULINA

Os produtos obtidos após amplificação de parte dos genes que codificam para β -tubulina e calmodulina foram purificados utilizando o Kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System Technical Bulletin (PROMEGA, USA) e posteriormente utilizados nas reações de sequenciamento. Durante a purificação foi adicionado igual volume da solução *Membrane Binding* ao produto amplificado. A mistura foi transferida para minicoluna e incubado a 25°C por 1 minuto. Procedeu-se à centrifugação das amostras a 12.000 rpm por 1 minuto, seguido da adição de 700 μ L de solução *Membrane Wash*, e posterior centrifugação a 12.000 rpm por 1 minuto, repetindo-se esta etapa com 500 μ L da mesma solução. Posteriormente, eluíu-se o DNA em 50 μ L de água livre de nucleasse.

4.10 SEQUENCIAMENTO DE REGIÕES PARCIAIS DOS GENES DE β -TUBULINA E CALMODULINA

Os produtos de PCR foram sequenciados baseados no método de Sanger et al. (1977), utilizando-se os mesmos pares de *primers* descritos anteriormente para a obtenção dos respectivos fragmentos. As reações de sequenciamento foram preparadas em um volume final de 10 μ L sendo composta por: 1 μ L de tampão, 1 μ L de *primer* forward ou reverse (10 pmol/ μ L), 2 μ L de DNA (20 ng/ μ L), 2 μ L do Kit BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA) e 4 μ L de água ultrapura para completar o volume da reação. Esta foi submetida ao termociclador VERITI[®] 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), previamente programado para um ciclo de desnaturação inicial de 95°C a 1 minuto, seguido de 30 ciclos de amplificação constituídos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 50°C

por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto e 30 segundos seguido de extensão final de 60°C por 1 minuto e 30 segundos.

4.11 PURIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Após o término da reação de amplificação, foi realizada a purificação da reação de sequenciamento. Adicionou-se 1:10 do volume de acetato de amônio 7,5 M e 27,5 µL de etanol absoluto. O material foi mantido a temperatura de -20°C por aproximadamente 40 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 4.000 rpm, por 45 minutos, a 20°C. Ao *pellet* resultante foi adicionado 130 µL de etanol 70% seguido de centrifugação a 4.000 rpm, por 15 minutos, a 20°C. Subsequentemente, foi acrescentado 0,2 µL de acetato de amônio 7,5 M e 80 µL de isopropanol 80%, mantendo a placa por 10 minutos a 25°C, seguido de centrifugação a 4.000 rpm, 20°C por 40 minutos. Logo após adicionou-se 80 µL de álcool 70% ao *pellet* seguido de nova etapa de centrifugação a 4.000 rpm, por 15 minutos a 20°C. Após a secagem do *pellet* o material foi ressuscitado em 10 µL de formamida, e em seguida a placa foi submetida ao sequenciador ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

4.12 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS OBTIDAS

A análise da qualidade das sequências foi visualizada através do eletroferograma com o auxílio do software *BioEdit*. Em seguida as sequências foram comparadas com as sequências já depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através da ferramenta “BLAST Search”. As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências das espécies tipo de *Aspergillus* pertencentes à secção *Flavi*. A edição e alinhamento das sequências foram conduzidos através do programa *BioEdit* e *ClustalW*, com as estimativas de distâncias genéticas e a construção das árvores filogenéticas ocorrendo pelo método *Neighbor-Joining* (NJ), e análises de bootstrap com 1.000 repetições, conduzidas pelo programa

Mega 5.1 (TAMURA et al., 2011) para cada gene separadamente. A Análise Molecular de Variância (AMOVA) foi realizada utilizando-se o programa computacional Arlequin Versão 3.5 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010) a fim de estimar a porcentagem da variância molecular atribuída dentro e entre os grupos formados. A análise de haplótipos para o Clado *Aspergillus nomius* foi realizada utilizando-se o software DnaSP Versão 5.10.01 (LIBRADO e ROZAS, 2009).

4.13 OBSERVAÇÕES MACROMORFOLÓGICAS E MICROMORFOLÓGICAS

Isolados da espécie *A. nomius* (ITAL 1230), *A. pseudonomius* (ITAL 286) e *A. bombycis* (ITAL 89) foram inoculados em três pontos em placas contendo os meios de cultura CYA (*Czapek Yeast Autolysate Agar*), MEA (*Malt Extract Autolysate Agar*) e YESA (*Yeast Extract Sucrose Agar*) seguidos de incubação a 25°C durante 7 dias. Após este período procedeu-se as análises macromorfológicas das colônias.

Estes isolados também foram analisados micromorfolologicamente por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) da Universidade Estadual de Londrina, sobre coordenação da Prof. Dr^a. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus. Isolados das espécies *A. nomius* (ITAL 1230), *A. pseudonomius* (ITAL 286) e *A. bombycis* (ITAL 89) foram incubados em meio de cultura MEA (*Malt Extract Autolysate Agar*) durante 7 dias a 25°C. Um *plug* de cada isolado foi fixado em 3 ml de solução de glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0,2 M pH 7,2 durante 24 horas a temperatura de 4°C. Em seguida a solução de fixação foi removida e as culturas foram lavadas, por 3 vezes, com uma solução de tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 durante 15 minutos cada. Após a remoção deste tampão, adicionou-se tetróxido de ósmio 1% seguido de incubação por 2 horas a 25°C na ausência de luz. Cada *plug* foi novamente lavado com tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 durante 15 minutos e desidratado em uma série de lavagens graduais com etanol (70 e 80 %) durante 15 minutos/lavagem e etanol (90 e 100%) durante 10 minutos/lavagem. As culturas fúngicas foram secas em ponto crítico (Critical Point Dryer SDC 030 - BALTEC),

recobertas com uma camada de ouro (Sputter Cooter SDC 050 – BALTEC) e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

4.14 AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DOS GENES *norB* E *cypA*

O DNA de cinco isolados da espécie *A. nomius* (ITAL 1230, ITAL 1289, ITAL 1659, ITAL 6071 e ITAL 7290) e o DNA de cinco isolados da espécie *A. pseudonomius* (ITAL 286, ITAL 603, ITAL 632, ITAL 638, ITAL 849) foram submetidos à reação de amplificação, buscando confirmar a presença ou ausência dos genes *cypA* e *norB* responsáveis pela produção de aflatoxinas do tipo G em espécies de *Aspergillus* produtoras da micotoxina.

Para a reação de amplificação foram utilizados os *primers norB-cypA* F (5' GTG CCC AGC ATC TTG GTC CA 3') e *norB-cypA* R (5' AGG ACT TGA TGA TTC CTC GTC 3') descritos por Chang et al. (2005). As reações foram preparadas em um volume final de 25 µL composto por: 2,5 µL de tampão (Invitrogen Life Technologies, USA – 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl 10x concentrado), 2 µL de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA – 2,5 mM), 1 µL de cada um dos respectivos *primers* (Invitrogen, Life Technologies, USA – 10 pmol/µL), 1 µL de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, USA – 50 mM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, USA – 5 U/µL), 2 µL da amostra de DNA (5 ng/µL) e 15,3 µL de água ultrapura. Reações controle foram realizadas utilizando o isolado da espécie *A. flavus* (ITAL 74) não produtor de aflatoxina, o isolado *A. flavus* (ITAL 371) produtor de aflatoxina do tipo B e uma reação onde o DNA genômico foi substituído por água ultrapura. As reações foram submetidas a um termociclador PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) programado para um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos composto por desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos. Após o término da reação de amplificação, os produtos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v),

corados com brometo de etídio e fotografados utilizando transiluminador UV e Sistema de Imagem Digital LPIX (Loccus[®]).

4.15 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE ÁGUA

A análise da atividade de água mínima necessária para o crescimento das espécies *A. nomius* e *A. pseudonomius* foi realizada utilizando-se meio de cultura CYA (*Czapek Yeast Autolysate Agar*) com adição de diferentes quantidades de glicerol ao meio a fim de controlar a atividade de água do meio. Os valores de atividade de água analisados foram: 0,99 (0,0 g de glicerol controle); 0,98 (2,76 g de glicerol em 100 ml); 0,97 (9,2 g de glicerol em 100 ml); 0,95 (14,72 g de glicerol em 100 ml); 0,93 (18,4 g de glicerol em 100 ml); 0,91 (23,0 g de glicerol em 100 ml); 0,87 (36,8 g de glicerol em 100 ml); 0,86 (41,4 g de glicerol em 100 ml); 0,85 (46,0 g de glicerol em 100 ml); 0,84 (50,6 g de glicerol em 100 ml); 0,83 (55,2 g de glicerol em 100 ml) e 0,81 (69,0 g de glicerol em 100 ml) (DALLYN e FOX, 1980). O aparelho *AquaLab* (Decagon Devices, Inc., Pullman, Wash) foi utilizado para conferir o valor de A_w do meio.

Cinco isolados da espécie *A. nomius* (ITAL 1659; ITAL 1230; ITAL 6071; ITAL 1289 e ITAL 7290) e cinco isolados da espécie *A. pseudonomius* (ITAL 632; ITAL 638; ITAL 603; ITAL 286 e ITAL 849) foram inoculadas em três pontos em placas de petri com os respectivos valores de atividade de água e mantidos sob incubação constante a 25°C durante 7 dias.

A análise foi realizada medindo-se o diâmetro das colônias do quarto dia de incubação até o sétimo dia. A análise de variância (ANOVA) foi realizada de acordo com o delineamento ao acaso com os tratamentos arranjados em fatorial, com doze níveis de atividade de água livre e dez isolados fúngicos de duas espécies, sendo cinco isolados da espécie *A. nomius* e cinco isolados da espécie *A. pseudonomius* e procederam-se os desdobramentos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram apresentados sob a forma de artigo científico “Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxina-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*”, a ser enviado para publicação no periódico científico Food Control.

5.1 Artigo Científico

Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*

Abstract

The exploitation of the Brazil nut is one of the most important activities of the extractive communities of the Amazon rainforest. However, its commercialization can be affected by the presence of aflatoxins produced by fungi, namely *Aspergillus* section *Flavi*. In the present study, we investigated 40 fungal isolates collected from Brazil nuts, all previously identified as *Aspergillus nomius*, using different approaches, including morphological characters, RAPD and AFLP profiles, partial β -tubulin and calmodulin nucleotide sequences, aflatoxin patterns, as well as tolerance to low water activity in culture media. Results showed that most (34) of the isolates do belong to *A. nomius* species, but the remaining (6) were identified as *A. pseudonomius*, a very recently described species. The results of the analyses of molecular variance, as well as the high pairwise F_{ST} values between *A. nomius* and *A. pseudonomius* suggested the isolation between these two species and the inexistence of gene flow. Fixed interspecific nucleotide polymorphisms at β -tubulin and calmodulin loci are presented. All *A. pseudonomius* strains analyzed produced aflatoxins AFB1, AFB2, AFG1, and AFG2. This study contains the first-ever report on the occurrence in Brazil nuts of *A. pseudonomius* capable of producing G aflatoxins as well as the already-documented B aflatoxins.

Keywords: *Aspergillus* section *Flavi*. Brazil nut. *Aspergillus pseudonomius*. *Aspergillus nomius*. aflatoxin production.

1. Introduction

The Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae) is considered one of the most economically important species of the Amazon rainforest. The genus is monotypic, endemic to upland areas and distributed along almost the entire expanse of the Amazon. The Brazil nut has been traditionally exploited by local extractive communities; however, more recently, *B. excelsa* has been used as an alternative for cultivation in areas degraded by agriculture or livestock, reconciling reforestation and income generation. *The fruit* is a spherical capsule of ligneous mesocarp, which is extremely hard. Inside the fruit, the seeds (or nuts) have a ligneous, rough shell and are found in average numbers of 18.

Brazil nuts are much appreciated for human consumption due to their high nutritional value and health benefits. The nut contains substantial amounts of phenolic antioxidants that can effectively control oxidative stress in the body (John & Shahidi, 2010). However, some reports state that Brazil nut commercialization could be affected by the presence of aflatoxins (AF), a group of secondary metabolites produced by *Aspergillus* section *Flavi* that are extremely toxic and carcinogenic.

The fruit of *B. excelsa* remains on the tree for 15 months (~1.5 kg). It then falls from the top of the tree, that can grow to a height of up to 45 meters, one of the tallest trees of the Amazon rainforest. This means that the fruit is not harvested from the plant but collected off the ground where it can remain for periods of a few days to several months, with ample opportunity for interaction with the environment. Some studies indicate that the soil is the main source of fungal contamination of Brazil nuts (Arrus, Blank, Clear, Holley, & Abramson, 2005; Baquião et al., 2013).

The taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* is very complex and continually changing; β -tubulin and calmodulin gene sequences have been increasingly considered essential for appropriate species identification. As reported in a recent review by Varga, Frisvad, and Samson (2011), *Aspergillus* section *Flavi* contains 21 species, which can be grouped into seven clades: *A. flavus* (8 species); *A. tamari* (4 species); *A. nomius* (3 species); *P. alliaceus* (2 species); *A. togoensis* (2 species); *A. leporis* (1 species); *A. avenaceus* (1 species). Our group has subsequently described a new species of

Aspergillus section *Flavi* that represents a new phylogenetic clade, *A. bertholletius* (Taniwaki et al., 2012).

The *A. nomius* clade includes *A. nomius*, *A. bombycis* and *A. pseudonomius*. According to several authors, *A. nomius* is of particular importance because it is the main culprit for the presence of aflatoxins in Brazil nuts (Olsen, Johnsson, Möller, Paladino, & Lindblad, 2008; Baquião et al., 2012; Reis et al., 2012; Calderari et al., 2013). *A. bombycis* also infects Brazil nuts, but at very low frequency (Calderari et al., 2013). In terms of their aflatoxin-producing ability, *A. nomius* and *A. bombycis* can produce both types of aflatoxin, AFB and AFG, but do not produce cyclopiazonic acid.

A. pseudonomius is a new species that produces AFB but not AFG (Varga, Frisvad, & Samson, 2011). The *A. pseudonomius* culture ex type CBS 119388T = NRRL 3353 was isolated from bees by D. Shimanuki (cited by Peterson, Ito, Horn, & Goto, 2001), and treated as *A. nomius* until Varga's study was published. Based on *in silico* analysis of ITS, β -tubulin and calmodulin nucleotide sequences, this new species includes several other isolates from insects and soil from the North American states of Louisiana, Texas, Wyoming and Wisconsin (Peterson, Ito, Horn, & Goto, 2001). However, only the NRRL 3353 isolate was available for mycotoxin analysis.

Recently, there has been an increase in the number of molecular studies characterizing toxigenic *Aspergillus*, but little data is available from South American countries. In the present study, we investigated the genetic variation of 40 isolates collected from Brazil nuts, all previously identified as *A. nomius*. A number of different approaches were used, including RAPD and AFLP profiles, partial β -tubulin and calmodulin nucleotide sequences, aflatoxin patterns, as well as tolerance to low water activity.

2. Materials and methods

2.1. Fungal isolates

A total of 40 isolates previously identified as *Aspergillus nomius* (Calderari et al., 2013), collected from Brazil nuts at different stages of in the production chain, were

randomly selected for investigation. Sequence data from several other *A. nomius* isolates (40) available in the GenBank database were used for comparison and constructing phylogenetic trees.

2.2. RAPD and AFLP procedures

RAPD and AFLP protocols were performed as proposed by Fungaro, Vieira, and Azevedo (1996) and Ferri et al. (2012). Amplified fragments were scored 1 for presence and 0 for absence at each polymorphic locus across all 40 isolates. Genetic similarities among the isolates were calculated using Jaccard's coefficient. A dendrogram was then constructed on the basis of UPGMA in the SAHN clustering program of the NTSYS-pc software (v 2.1; Setauket, NY) (Rohlf, 2000). Bootstrap analysis with 1.000 resamples was completed with WINBOOT software (IRRI, Manila, Philippines) to determine the confidence limits of the dendrogram. In addition, each isolate was probabilistically assigned to a genetically distinct cluster based on Bayesian models using STRUCTURE (v 2.2.3; Department of Human Genetics, University of Chicago) (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000), available online from Cornell University at <http://cbsuapps.tc.cornell.edu/structure.aspx>

2.3. Partial amplification and sequencing of the β -tubulin and calmodulin coding genes

Fungal DNA extraction and amplification of the β -tubulin (*benA*) and calmodulin (*cmd*) genes were performed as described by Gonçalves et al. (2012). Briefly, the primer-pairs Bt2a-Bt2b (Glass & Donaldson, 1995) and cmd5-cmd6 (Hong, Cho, Shin, Frisvad, & Samson, 2006) were used to amplify the *benA* and *cmd* gene regions respectively, adopting standard amplification reactions and cycling protocols. Fragments generated by PCR were purified with Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). The amplicons were submitted to direct sequencing in both directions using a BigDye[®] Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) under the following conditions: denaturation at 95 °C for 60 s, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 20 s, annealing at 50 °C for 15 s, extension at 60 °C for 1.5

min, and a final extension at 60 °C for 1.5 min. A volume of HiDiformamide (10 µl) was added to the sequencing products, which were processed in an ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Sequences were assembled using the Phred/Phrap/Consed package (University of Washington, Seattle) applying a quality threshold value ≥ 80 . If the Phred score of a base exceeded this threshold, the base was considered of high quality. The sequences were aligned with those from *Aspergillus* section *Flavi* available on the NCBI site. Phylogenies are inferred separately from each gene using MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011). The Tamura 3-parameter (T92) model was used for building phylogenetic trees from the distance data on the basis of Neighbor-Joining (NJ) method and nonparametric bootstrap analysis (1.000 replicates) as a method for assessing node confidences.

To estimate the molecular variance within and between clusters, a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) was performed using ARLEQUIN v 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), also used to calculate the fixation index (F_{ST}).

2.4. Macromorphological and micromorphological observations

Isolates were inoculated at three points on plates containing Czapek Yeast Autolysate (CYA), Malt Extract Autolysate (MEA), Yeast Extract Sucrose (YESA) and *Aspergillus flavus* and *parasiticus* Agar (AFPA) (Pitt, Hocking, & Glenn, 1983). After incubation in culture media (25 °C, 7 d) macromorphological observations were made. For micromorphological observation using scanning electron microscopy (SEM), samples were prepared as follows: plugs (0.5 cm x 0.5 cm) containing the strain ITAL 286 (grown on solid MEA) were cut and immersed in 2% glutaraldehyde solution at 4°C, for 24 h. Then specimens were washed in 0.1 M phosphate buffer (three times, 15 min each) and post-fixed with 1% osmium tetroxide aqueous solution at room temperature for 2 h. Each plug was washed again in 0.1 M phosphate buffer (three times, 15 min each) and dehydrated through a graded ethanol series (70, 80, 90, and 100%, at least 10 min each). Afterwards, samples were transferred to a critical point dryer (Bal-Tec, CSDC 030), coated with gold in a sputter coater (Bal-Tec, SDC 050), viewed and photographed (FEI Quanta 200®).

2.5. Aflatoxin and other extrolite analyses

Isolates were evaluated for aflatoxin production following the protocol of Filtenborg, Frisvad, and Svendsen (1983). Briefly, isolates were inoculated onto yeast extract agar containing 20% sucrose (YESA), and incubated at 25 °C for 7 days. A small piece of each colony was cut out, and used for toxin extraction with chloroform:methanol (1:1). Plugs were placed on thin layer chromatography (TLC) plates (silica gel-G 500 mm thick), which were developed in toluene: ethyl acetate: 90% formic acid: chloroform (7:5:2:5), and visualized under UV light at 356 and 254 nm. Aflatoxin B1, B2, G1, and G2 standards (Sigma Chemical, St Louis, USA) were used for qualitative comparison of retention time and fluorescence. Production of the B1, B2, G1, and G2 aflatoxins by *A. pseudonimus* strains was confirmed and quantified by HPLC. A Shimadzu LC-10VP HPLC system (Shimadzu, Japan) was used with a fluorescence detector set to 362 nm excitation and 455 nm emission for aflatoxins G1 and G2 and 425 nm emission for aflatoxins B1 and B2. A Shimadzu CLC G-ODS (4 x 10 mm) guard column and Shimadzu Shimpack (4.6 x 250 mm) column were employed. The mobile phase used was water: acetonitrile: methanol (6:2:3, v/v/v) containing KBr (119 mg/L) and nitric acid (4 M, 350 µL/L). The flow rate was 1 ml/min. A standard mix of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 was used to construct a five point calibration curve of peak areas versus concentration (µg/ml). The injection volume was 100 µl. Post-column derivatization of aflatoxins B1 and G1 was performed with bromine using a Kobra Cell (R-Biopharm Rhône Ltd, Scotland). Other extrolites were analyzed as described by Frisvad and Thrane (1987), with minor modifications according to Smedsgaard (1997), or by the improved methods described by Nielsen and Smedsgaard (2003); Nielsen, Mansson, Rank, Frisvad, and Larsen (2011); Klitgaard et al. (2014).

2.6. Partial *norB* and *cypA* gene sequence amplification

A portion of the intergenic region and the 5' coding sequences of *norB* (an aryl alcohol dehydrogenase coding gene) and *cypA* (a cytochrome P450 monooxygenase coding gene) was amplified by PCR using a slightly modified version of the protocol

described by Chang, Horn, and Dorner (2005). Briefly, amplifications were performed in a Veriti[®] Thermal Cycler (Applied Biosystems) using a 25 μ l reaction volume containing 10 ng of DNA template, 1 x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies), 0.2 μ M of primers 5' GTG CCC AGC ATC TTG GTC CA 3', and 5' AGG ACT TGA TGA TTC CTC GTC 3', at an annealing temperature of 57°C. Amplicons were resolved by electrophoresis on 1.0% agarose gels stained with ethidium bromide.

2.7. CYA medium preparation adjusted to different levels of water activity, incubation, and colony diameter measurements

CYA media were adjusted to various levels of water activity (a_w) by substituting a part of water by glycerol (w/w). An AquaLab a_w meter (Decagon Devices) was used to measure the water activity of the CYA medium in triplicate. Petri plates were inoculated at three equidistant points and incubated (25 °C, for 7 d). Colony diameters were measured from cultures grown under 12 levels of a_w (0.99, 0.98, 0.97, 0.95, 0.93, 0.91, 0.87, 0.86, 0.85, 0.84, 0.83 and 0.81) in a completely randomized factorial design (12 x 10, 120 treatments), replicated 3 times. After performing a preliminary ANOVA, the effect of treatments was partitioned into the main factors: levels of water activity (A) and strain (S); the interaction of (A x S) factors was also examined. The S factor and the interaction (A x S) were subsequently split into two groups, according to the strain species, and contrasting the two species. After verifying the existence of significant effects of all sources of variation, including the interaction effect, a polynomial regression procedure and coefficient of determination (R^2) estimations were performed.

3. Results and discussion

The genetic variation of an *A. nomius* collection isolated from Brazil nuts was investigated using RAPD and AFLP profiles and partial β -tubulin (*benA*) and calmodulin (*cmd*) nucleotide sequences. We chose RAPD and AFLP because they are multilocus approaches that provide an overview of the genome since the DNA fragments

generated are randomly distributed. Moreover, they have already been described as good discriminators of *Aspergillus* section *Flavi* strains (Barros, Chiotta, Reynoso, Torres, & Chulze, 2007; Gonçalves et al., 2012). We also used partial *benA* and *cmd* gene sequence analysis since this procedure was successfully used in a very recent overview on the taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* (Varga, Frisvad, & Samson, 2011).

Nine RAPD primers and three AFLP primer-enzyme combinations produced 226 polymorphic fragments from 40 DNA samples. Figure 1 shows one of the RAPD profiles obtained. Thirty-nine haplotypes were detected, including one that was found to be shared by two isolates (ITAL 1089 and ITAL 1108) that were collected in the same geographic region. The polymorphic markers (226) allowed use to build a Jaccard similarity matrix, used to generate an UPGMA-based dendrogram. The 40 isolates were grouped into two major clusters (A and B) supported by high bootstrap values. Model-based clustering obtained from the STRUCTURE analysis (at K=2) revealed a similar pattern of grouping (Figure 2).

The AMOVA performed with RAPD and AFLP markers confirmed the occurrence of a high level of genetic variability in the fungal isolate collection, and showed that most of the variance (~73 %) was due to differences between clusters (A and B) rather than within clusters (~27 %). The amount of between-cluster divergence relative to overall diversity (F_{ST}) was very high (0.73), which is unusual for a group of isolates belonging to the same fungal species.

As the main source of genetic variation was between clusters, five representatives from each cluster were subjected to *benA* and *cmd* partial nucleotide sequence analyses. When the sequences obtained were compared to those of the *Aspergillus* section *Flavi* type strains (22) available in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), the isolates belonging to the A-cluster determined by AFLP/RAPD analyses grouped into one cluster that includes the *A. nomius* ex type strain (NRRL 13137 = CBS 260.88), and the B-cluster isolates were included in another cluster that includes the *A. pseudonomius* ex type strain (NRRL 3353 = CBS119388) (Figure 3).

We also performed a second comparison using all the sequences available in GenBank from the clade *A. nomius* (*A. nomius*, *A. pseudonomius* and *A. bombycis*). The alignment of our *benA* sequences (10) with those deposited (40) revealed 24 polymorphic sites in a total of 459 sites (5.2 %). The alignment of our *cmd* sequences with those deposited revealed 35 polymorphic sites in a total of 528 sites (6.6 %). The Neighbor-Joining clustering analyses for both genes were congruent and revealed that the sequences of *A. nomius* strains deposited in GenBank extend over two distinct groups: one including the *A. nomius* ex type strain (NRRL 13137) and the other the *A. pseudonomius* ex type strain (NRRL 3353) (Figure 4).

The relationships among all the sequences analyzed revealed that 19 strains previously accepted as *A. nomius* (NRRL 3353; NRRL 6552, NRRL 26455; NRRL 26886; NRRL 26885; NRRL 26883; NRRL 5919; 823/07; NRRL 26454; NRRL 26452; NRRL 26450; NRRL 26451; NRRL 26881; NRRL 26879; NRRL 6343; NRRL 26878; NRRL 26882; NRRL 26880; NRRL 26884) could be recognized as *A. pseudonomius*. While NRRL 25393, isolated from tea field soil in Okinawa Prefecture, Japan, was a *A. nomius*, an isolate from silkworm excrement in Kagawa Prefecture, Japan, originally identified as *A. nomius*, (Ito, Peterson, & Goto, 1998) was in fact *A. pseudonomius*. Both species were reported to produce more aflatoxin of the G type than the B type, in addition to kojic acid, and both species were reported to produce sclerotia, but not cyclopiazonic acid, in line with the results obtained in our study.

The AMOVA performed on *the same* data set but based on the above-mentioned classification showed the structure of the genetic variation of the group strains analyzed. The fixation index (F_{ST}), which reveals the amount of between-group genetic differentiation, was very high for both partial nucleotide sequence analyses ($F_{ST} = 0.92$ and $F_{ST} = 0.99$, respectively for *benA* and *cmd*). All pairwise F_{ST} values were also high (0.87 to 1.00), indicative of complete isolation due to the absence of gene flow between these phylogenetic species, in line with the conclusions proposed by Varga et al. to the effect that the *A. nomius* clade includes at least three species. Interestingly, the *cmd* sequence data allowed better discrimination between clusters as only 0.2 % of the variance was apportioned within groups, compared to 8.1 % when the analysis was based on partial *benA* gene sequences. In regard to the genetic differentiation between

A. nomius and *A. pseudonomius* groups, the pairwise F_{ST} values were also high for both genes ($F_{ST} = 0.87$ and $F_{ST} = 0.99$, *benA* and *cmd*, respectively), suggesting an absence of gene flow (i.e. full genetic isolation) between these two phylogenetic species. The sequence variations of all taxa belonging to the *A. nomius* clade (50) allowed us to define eight distinct haplotypes based on the *benA* locus, and four based on the *cmd* locus. Among the *A. nomius* sequences analyzed (16), two distinct haplotypes were found based on the *benA* locus, and one based on the *cmd* locus. For *A. pseudonomius*, four distinct haplotypes at the *benA* locus and two at the *cmd* locus were found among the 24 sequences analyzed (Table 1). Fixed nucleotide differences between *A. nomius* and *A. pseudonomius* at both loci are shown in Figure 5.

A. pseudonomius was first described by Varga, Frisvad, and Samson (2011), reporting that the species is related to *A. nomius* and produces aflatoxin B1 (but not G-type aflatoxins), chrysogine and kojic acid. The macro and micromorphological characteristics of the strains isolated in the present study were in line with those described by these pioneering authors, except that under scanning electron microscopy the stipes were found to be rough-walled (Figure 6). The colony sizes grown on YESA, MEA and CYA (incubated 7 d at 25 °C) reached a diameter of approximately 6.0 cm; their surfaces were floccose with dominant aerial mycelium, and sporulation was remarkably poor in comparison to that of *A. nomius* strains. Conidial heads were similar to *A. nomius*, but predominantly uniseriate. Conidia were globose to subglobose and superficially rough.

In contrast to the initial description of the species, all five *A. pseudonomius* strains analyzed in the present study produced different amounts of AFB1, AFB2, AFG1, and AFG2 (Table 2). It is important to note that only one *A. pseudonomius* strain was available for mycotoxin analysis by Varga and collaborators (culture ex type CBS 119388 = NRRL 3353). Because of this inconsistency, we reexamined the metabolite profile of some strains of *A. nomius* and *A. pseudonomius* using HPLC-DAD. In general most strains of each species produced AFB1, AFB2, AFG1, and AFG2, often including their precursors, such as versicolorins, parasiticol, and 3-O-methylsterigmatocystin. *A. nomius* and *A. pseudonomius* both produced kojic acid, miyakamides (Shiomi et al., 2002; Rank et al., 2012), and tenuazonic acid (Varga, Frisvad, & Samson, 2011). The

mycotoxin tenuazonic acid is reported for the first time in *A. pseudonomius*. Anominine (Gloer, Rinderknecht, Wicklow, & Dowd, 1989) and aspernomine (Staub, Gloer, Wicklow, & Dowd, 1992) were produced by all *A. nomius* isolates, but were not found in all the *A. pseudonomius* isolates we analyzed. Anominine was first called nominine, but the name has been changed to anominine (Bradshaw, Etxebarria-Jardí, & Bonjoch, 2008). Pseurotin A was produced by two isolates of *A. nomius* (NRRL 13137 and NRRL3161), but not by any *A. pseudonomius*. Chrysogine was produced by some isolates of haplotype III (*A. pseudonomius*), while isolates of haplotype VI of the same species produce “HUTTI”, an extrolite that has not yet been fully characterized (Table 3).

As mentioned in the material and methods section, we used PCR to investigate the length of a region denoted *norB-cypA*. According to the literature, when using the primer pair *norB-cypA-F/norB-cypA-R* (Chang, Horn, & Dorner, 2005), an amplicon of approximately 1.8 kb is obtained for the *A. parasiticus* and *A. nomius* strains, both producers of B and G aflatoxins (Ehrlich, Chang, Yu, & Cotty, 2004). This region of the aflatoxin biosynthesis pathway gene cluster includes a portion of the intergenic region and the 5' coding sequences of *norB* (an aryl alcohol dehydrogenase) and *cypA* (a cytochrome P450 monooxygenase). There is already sufficient evidence that the *cypA* gene is required for the formation of G aflatoxins in *A. parasiticus*. As shown in Figure 7, we obtained a PCR product of 1.8 kb from each *A. pseudonomius* isolate, which was identical to those of *A. nomius*. The two *A. flavus* strains used as non-producers of aflatoxin G showed different gel profiles, one strain generating a 0.9 kb amplicon and the other a 0.3 kb amplicon. These results can be fully explained by the fact that *A. flavus* and *A. oryzae* lack the ability to produce G aflatoxins as a consequence of a 0.8 to 1.5 kb gap near the 5' end of the aflatoxin gene cluster (Ehrlich, Chang, Yu, & Cotty, 2004). Finally, we demonstrated that *A. pseudonomius* strains have similar PCR profiles to those obtained from other aflatoxin G producer species.

Water activity (a_w) is one of major factors controlling fungal growth. *A. pseudonomius* and *A. nomius* are capable of producing aflatoxin and their potential growth is of serious concern. Referring to a personal communication from the late C. W. Hesseltine (NRRL, USA), Varga and collaborators (Varga, Frisvad, & Samson, 2011) mention that he considered the NRRL 3353 strain (now renamed *A. pseudonomius*)

different from other *A. nomius* strains in respect to its tolerance to low water activity. According to these authors, this attribute should be further investigated in *A. pseudonomius* (Varga, Frisvad, & Samson, 2011). In order to meet this requirement, the colony diameters of five isolates each of *A. nomius* and *A. pseudonomius* were recorded after 7 days of incubation under 12 levels of a_w (0.99 to 0.81). Data from both species investigated have shown that fungal growth can occur over a wide range of a_w levels, and colony sizes were larger under 0.98 a_w . For the majority of strains the minimal required to growth was 0.83 a_w (Figure 8). Although significant differences in mean sizes of the colonies at different a_w levels were detected between the species, it is worth mentioning that intraspecific variability was also found among the strains of both species. Consequently, this trait is not suitable for easily distinguishing between isolates of *A. nomius* and *A. pseudonomius*.

4. Conclusions

Based on several approaches, our study led us to draw the following conclusions: Brazil nuts may harbor *Aspergillus pseudonomius*, a sibling species of *A. nomius*. To date, the best way of distinguishing these sibling species is to analyse β -tubulin or calmodulin gene sequences. We also concluded that *A. pseudonomius* strains might be able to produce both B and G-type aflatoxins.

5. Acknowledgements

This work was supported by grants and scholarships given by the following Brazilian institutions: CNPq, CAPES, Fundação Araucária and FAPESP.

Micromorphological observations were carried in the “Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise”, Universidade Estadual de Londrina. Steve Simmons kindly corrected the English version.

6. References

- Arrus, K., Blank, G., Clear, R., Holley, R. A., & Abramson, D. (2005). Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. *Journal of Food Protection*, *68*(5), 1060–1065.
- Baquião, A. C., de Oliveira, M. M. M., Reis, T. A., Zorzete, P., Diniz Atayde, D., & Correa, B. (2013). Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food Chemistry*, *139*(1-4), 1127–1132.
- Baquião, A. C., Zorzete, P., Reis, T. A., Assunção, E., Vergueiro, S., & Correa, B. (2012). Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. *Food Control*, *28*(2), 224–229.
- Barros, G. G., Chiotta, M. L., Reynoso, M. M., Torres, A. M., & Chulze, S. N. (2007). Molecular characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolates collected from peanut fields in Argentina using AFLPs. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(4), 900–909.
- Bradshaw, B., Etxebarria-Jardí, G., & Bonjoch, J. (2008). Polycyclic framework synthesis of anominine and tubingensin A indole diterpenoids. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *6*, 772–778.
- Calderari, T. O., Iamanaka, B. T., Frisvad, J. C., Pitt, J. I., Sartori, D., Pereira, J. L., Fungaro, M. H. P., & Taniwaki, M. H. (2013). The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Brazil nuts: from rainforest to consumer. *International Journal of Food Microbiology*, *160*(3), 267–272.
- Chang, P. K., Horn, B. W., & Dorner, J. W. (2005). Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, *42*(11), 914–923.
- Ehrlich, K. C., Chang, P., Yu, J., & Cotty, P. J. (2004). Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(11), 6518–6524.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, *10*(3), 564–567.
- Ferri, D. V., Munhoz, C. F., Neves, P. M. O., Ferracin, L. M., Sartori, D., Vieira, M. L. C., & Fungaro, M. H. P. (2012). Genetic variability of *Beauveria bassiana* and a DNA

- marker for environmental monitoring of a highly virulent isolate against cosmopolites sordidus. *Indian Journal of Microbiology*, 52(4), 569–574.
- Filttenborg, O., Frisvad, J. C., & Svendsen, J. A. (1983). Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(2), 581-585.
- Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1987). Standardezid high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkyphenone retention indices and UV-VIS spectra (diodearray detection). *Journal Chromatography*, 404(1), 195-214.
- Fungaro, M. H. P., Vieira, M. L. C., & Azevedo, J. L. de. (1996). Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD, *Applied Microbiology*, 22(6), 389–392.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied Microbiology*, 61(4), 1323-1330.
- Gloer, J. B., Rinderknecht, B. L., Wicklow, D. T., & Dowd, P. F. (1989). Nominine : A new insecticidal indole diterpene from the sclerotia of *Aspergillus nomius*. *Journal of Organic Chemistry*, 54, 2530–2532.
- Gonçalves, J. S., Ferracin, L. M., Vieira, M. L. C., Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., & Fungaro, M. H. P. (2012). Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28(4), 1817–1825.
- Hong, S. B., Cho, H. S., Shin, H. D., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2006). Novel Neosartorya species isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(2), 477–486.
- Ito, Y., Peterson, S. W., & Goto, T. (1998). Isolation and characterization of *Aspergillus nomius* from Japanese soil and silkworm excrement. *Mycotoxins*, 46, 9–15.
- John, J. A., & Shahidi, F. (2010). Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *Journal of Functional Foods*, 2(3), 196–209.
- Klitgaard, A., Iversen, A., Andersen, M. R., Larsen, T. O., Frisvad, J. C., & Nielsen, K. F. (2014). Aggressive dereplication using UHPLC-DAD-QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1, 1-11.

- Nielsen, K. F., Mansson, M., Rank, C., Frisvad, J. C., & Larsen, T. O. (2011). Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *Journal of Natural Products*, 74, 2338-2348.
- Nielsen, K. F., & Smedsgaard, J. (2003). Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography – UV – mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography*, 1002, 111–136.
- Olsen, M., Johnsson, P., Möller, T., Paladino, R., & Lindblad, M. (2008). *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? *World Mycotoxin Journal*, 1(2), 123–126.
- Peterson, S. W., Ito, Y., Horn, B. W., & Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia*, 93(4), 689-703.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D., & Glenn, D. R. (1983). An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 54(1), 109–114.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–59.
- Rank, C., Klejnstrup, M. L., Petersen, L. M., Kildgaard, S., Frisvad, J. C., Gotfredsen, C. H., & Larsen, T. O. (2012). Comparative chemistry of *Aspergillus oryzae* (RIB40) and *A. flavus* (NRRL 3357). *Metabolites*, 2(4), 39–56.
- Reis, T. A., Oliveira, T. D., Baquião, A. C., Gonçalves, S. S., Zorzete, P., & Corrêa, B. (2012). Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. *International Journal of Food Microbiology*, 159(2), 61–68.
- Rolf, F. J. NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York, 2000.
- Shiomi, K., Hatae, K., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Tomoda, H., Kobayashi, S., & Omura, S. (2002). New antibiotics miyakamides produced by a fungus. *The Journal of Antibiotics*, 55(11), 952-961.
- Smedsgaard, J. (1997). Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *Journal of chromatography A*, 760(2), 264–270.

- Staub, G. M., Gloer, J. B., Wicklow, D. T., & Down, P. F. (1992). Aspernomine: a cytotoxic antiinsectan metabolite with a novel ring system from the sclerotia of *Aspergillus nomius*. *Journal of the American Chemical Society*, *114*, 1015–1017.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(10), 2731–2739. doi:10.1093/molbev/msr121
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Iamanaka, B. T., Sartori, D., Copetti, M. V, Balajee, A., Fungaro, M. H. P., & Frisvad, J. C. (2012). *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. *PloS One*, *7*(8), 1-7.
- Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Two new aflatoxin producing species , and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, *69*, 57–80.

Table 1. Haplotypes of the *Aspergillus nomius* clade defined on the basis of β -tubulin (*benA*) and calmodulin (*cmd*) genes. Sequences from strains denoted as ITAL were obtained in the present study; all others were obtained from GenBank. Roman numerals designate identical sequences.

Species	Strain	<i>benA</i> -based haplotype	<i>cmd</i> -based haplotype
<i>A. nomius</i>	NRRL 13137 (T)	I (EF661494)	I (AY017588)
	ITAL 1230	I	I
	ITAL 1289	I	I
	ITAL 7290	I	I
	NRRL 6108	I	I
	NRRL 29212	I	I
	NRRL 25393	I	I
	NRRL 13138	I	I
	NRRL 6107	I	I
	NRRL 29213	I	I
	NRRL 3161	I	I
	NRRL 26887	II (AY017563)	I
	ITAL 1659	II	I
	ITAL 6071	II	I
	NRRL 26453	II	I
	NRRL 29238	II	I
<i>A. pseudonomius</i>	NRRL 3353 (T)	III (AY017577)	II (EF661529)
	NRRL 6552*	III	II
	ITAL 286	III	II
	ITAL 849	III	III
	NRRL 26455*	III	II
	NRRL 26886*	III	II
	NRRL 26885*	III	II
	NRRL 26883*	III	II
	NRRL 5919*	III	II
	823/07*	III	II
	NRRL 26881*	IV (AY017557)	II
	NRRL 26879*	IV	II
	NRRL 6343*	IV	II
	NRRL 26878*	IV	II
	NRRL 26882*	IV	II
	NRRL 26880*	IV	II
NRRL 26884*	IV	II	

Continuation Table 1.

Species	Strain	<i>benA</i> -based haplotype	<i>cmd</i> -based haplotype
<i>A. pseudonomius</i>	NRRL 26454*	V (AY017552)	II
	NRRL 26452*	V	II
	NRRL 26450*	V	II
	NRRL 26451*	V	II
	ITAL 638	VI	II
	ITAL 603	VI	II
	ITAL 632	VI	II
<i>A. bombycis</i>	CBS 117817 (T)	VII (EF203121)	IV (EF202029)
	NRRL 29253	VII	IV
	NRRL 29237	VII	IV
	NRRL 29235	VII	IV
	NRRL 28901	VII	IV
	NRRL 29236	VII	IV
	NRRL 28900	VII	IV
	NRRL 25593	VIII (EF661497)	IV
	NRRL 26010	VIII	IV
	NRRL 29241	VIII	IV

T: type strain;

*: a strain whose sequences were annotated as *A. nomius*, but identified as *A. pseudonomius* in this study.

Table 2. Aflatoxin production by five strains of *Aspergillus pseudonomius* grown on YESA for 7 days at 25°C.

Strain	Aflatoxin ($\mu\text{g/g}$)				
	B1	B2	G1	G2	Total
ITAL 286	117.53	5.33	210.00	6.58	339.43
ITAL 603	0.94	0.02	1.39	0.02	2.37
ITAL 632	2.74	0.18	3.74	0.16	6.82
ITAL 638	39.00	1.14	51.4	0.79	92.33
ITAL 849	1.34	0.016	1.61	0.01	2.97

Table 3. Production of mycotoxins and other extrolites by strains of *Aspergillus nomius* and *A. pseudonomius*.

Species	Strain	Mycotoxins and other extrolites
<i>A. nomius</i>	NRRL 13137	Aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , anominine, aspernomine, kojic acid, a miyakamide, 3-O-methylsterigmatocystin, parasiticol, paspaline, paspalinin, a pseurotin, tenuazonic acid, versicolorins, (NOM*, NOL*, NON*)
	NRRL 13138	Aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , anominine, aspernomine, kojic acid, a miyakamide, 3-O-methylsterigmatocystin, paspaline, paspalinine, tenuazonic acid, versicolorins, (NOM*, NOL*)
	NRRL 3161	Aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , anominine, aspernomine, kojic acid, 3-O-methylsterigmatocystin, a miyakamide, parasiticol, a pseurotin, a versicolorin, (NOM*, NOL*)
<i>A. pseudonomius</i>	NRRL 3353	Aflatoxin B ₁ , chrysogine, kojic acid, two miyakamides, (VOP*)
	ITAL 849	Aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , aspergillic acid, kojic acid, 3-O-methylsterigmatocystin, tenuazonic acid
	NRRL 5919	Aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , aspergillic acid, chrysogine, kojic acid, a miyakamide
	823/07	Aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , kojic acid, tenuazonic acid
	ITAL 638	Aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , kojic acid, tenuazonic acid, a versicolorin, (HUTTI*)
	ITAL 603	Aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , kojic acid, a miyakamide, parasiticol, tenuazonic acid, a versicolorin, (HUTTI*)
	ITAL 632	Aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , kojic acid, (HUTTI*)

*These metabolites had characteristic UV spectra, but the structures of the compounds have not yet been elucidated.

Figure legends

Figure 1. RAPD profile of *Aspergillus nomius* (A-group) and *A. pseudonomius* (B-group) strains using the 10-mer OPAM-07 primer.

Figure 2. UPGMA-based dendrogram generated from the distance matrix of the Jaccard coefficients using RAPD and AFLP data from 40 isolates collected from Brazil nuts, previously identified as *A. nomius*. Nodes supported by bootstrap values > 70% are indicated by numeric values. The column on the right corresponds to the hierarchical organization of genetic relatedness of the same group of isolates obtained using the STRUCTURE computational program ($K=2$).

Figure 3. Neighbor-Joining trees of *Aspergillus* section *Flavi* type strains and *Aspergillus* isolates from Brazil nuts based on β -tubulin (A) and calmodulin (B) sequence data. Nodes supported by bootstrap values > 70% are indicated by numeric values.

Figure 4. Neighbor-Joining of 50 taxa belonging to the *Aspergillus nomius* clade based on β -tubulin (A) and calmodulin (B) tree sequence data. *Aspergillus flavus* (CBS 100927) was chosen as an outgroup. Nodes supported by bootstrap values > 70% are indicated by numeric values.

Figure 5. Alignment of β -tubulin (A) and calmodulin (B) partial gene sequences for different haplotypes of *Aspergillus nomius* and *A. pseudonomius*. Fixed nucleotide polymorphisms between *A. nomius* and *A. pseudonomius* are indicated by arrows.

Figure 6. *Aspergillus pseudonomius* strain ITAL 286: Colonies grown on CYA (A), MEA (B), YESA (C) at 25 °C for 7 days. Scanning electron micrographs of conidiophore (D), conidia (E) and stipe (F). Bars: 1 = 50 μm ; 2 = 2 μm ; 3 = 10 μm .

Figure 7. Standard gel electrophoresis of PCR products derived from the *norB-cypA* region (~1.8 kb). 1, 1 kb plus DNA Ladder; 2-6, *Aspergillus nomius* strains; 7-11, *A. pseudonomius* strains; 12 and 13, non-aflatoxigenic and aflatoxigenic strains of *A. flavus*, respectively.

Figure 8. Polynomial regression curve showing the relationship between the variables, colony diameter means (after 7 days) (y) and levels of water activity in CYA medium (x). *Aspergillus nomius* and *A. pseudonomius* data are shaded in black and dark grey, respectively.

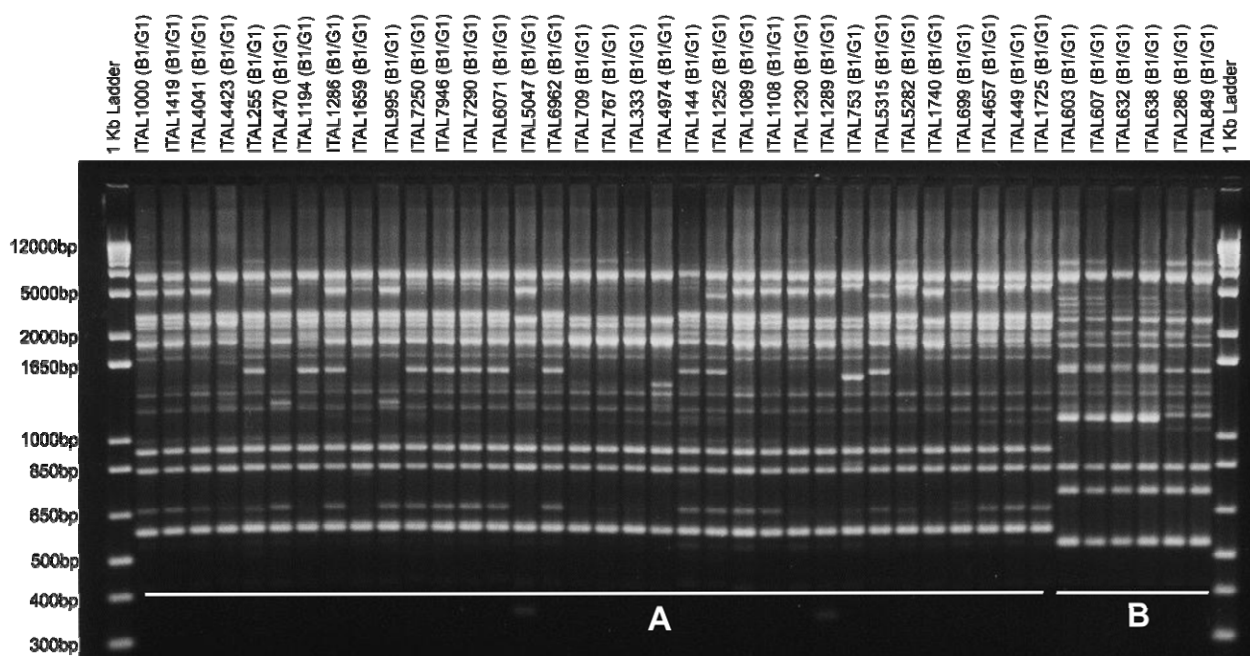


Figure 1 - RAPD profile of *Aspergillus nomius* (A-group) and *A. pseudonomius* (B-group) strains using the 10-mer OPAM-07 primer

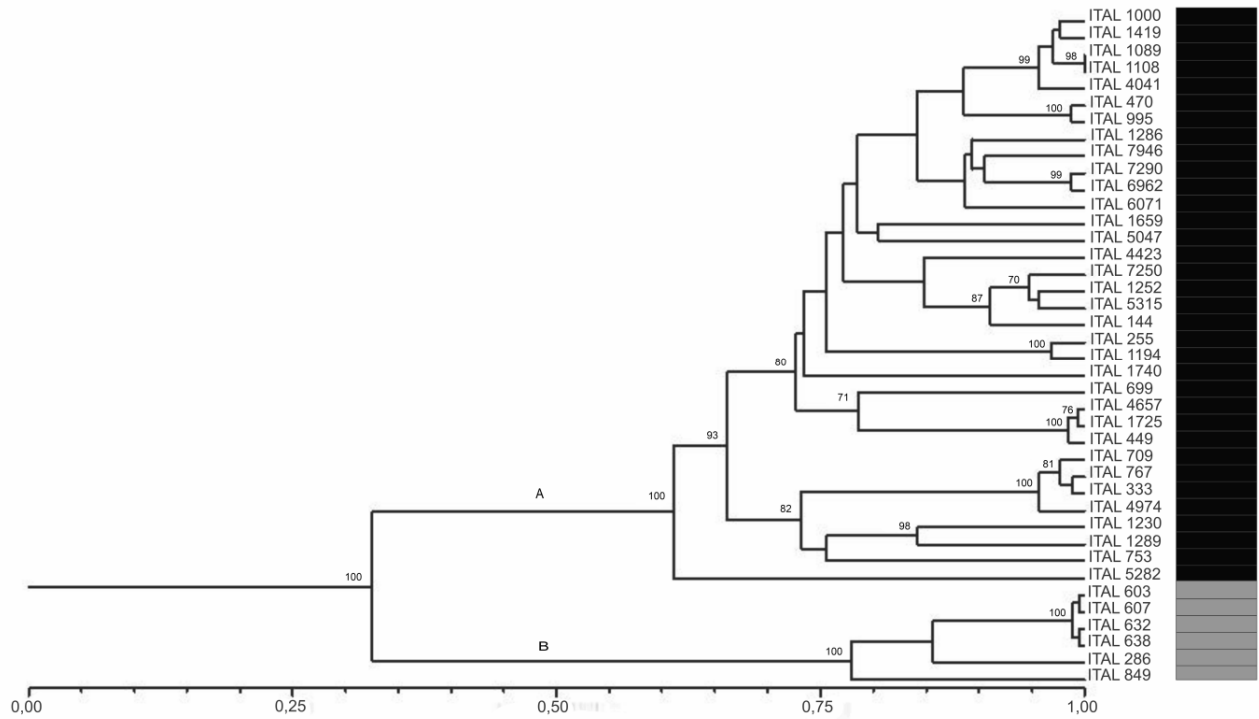


Figure 2 - UPGMA-based dendrogram generated from the distance matrix of the Jaccard coefficients using RAPD and AFLP data from 40 isolates collected from Brazil nuts, previously identified as *A. nomius*. Nodes supported by bootstrap values > 70% are indicated by numeric values. The column shown on the right corresponds to the hierarchical organization of genetic relatedness of the same group of isolates obtained using the STRUCTURE computational program (K=2)

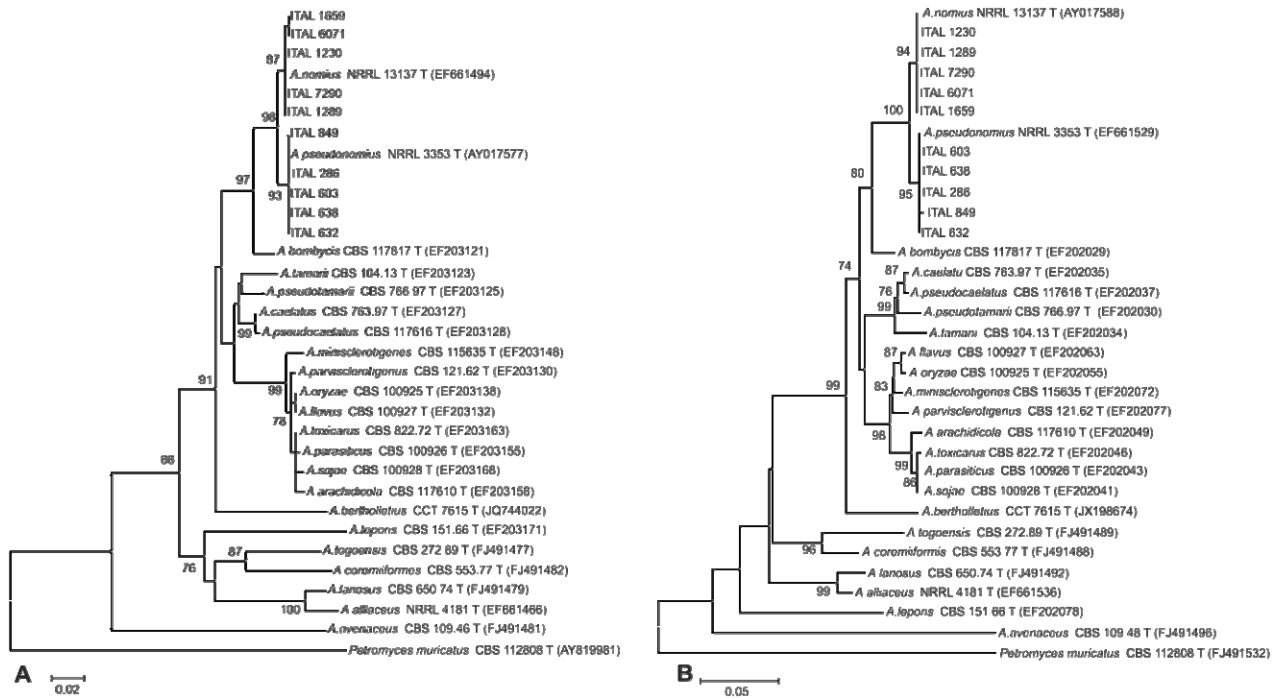


Figure 3 - Neighbor-Joining trees of *Aspergillus* section *Flavi* type strains and *Aspergillus* isolates from Brazil nuts based on β -tubulin (A) and calmodulin (B) sequence data. Nodes supported by bootstrap values > 70% are indicated by numeric values

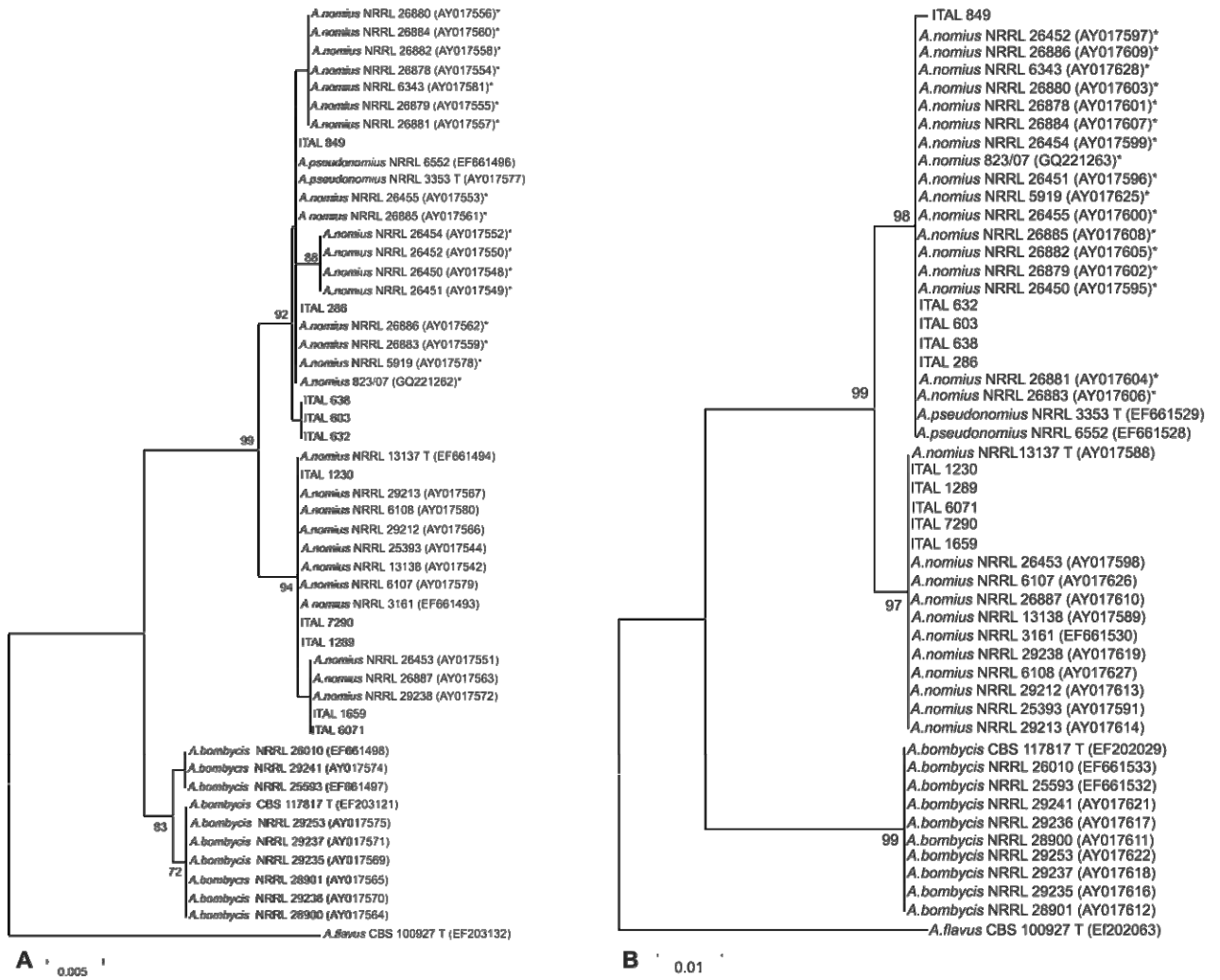


Figure 4 - Neighbor-Joining of 50 taxa belonging to the *Aspergillus nomius* clade based on β -tubulin (A) and calmodulin (B) tree sequence data. *Aspergillus flavus* (CBS 100927) was chosen as an outgroup. Nodes supported by bootstrap values > 70% are indicated by numeric values

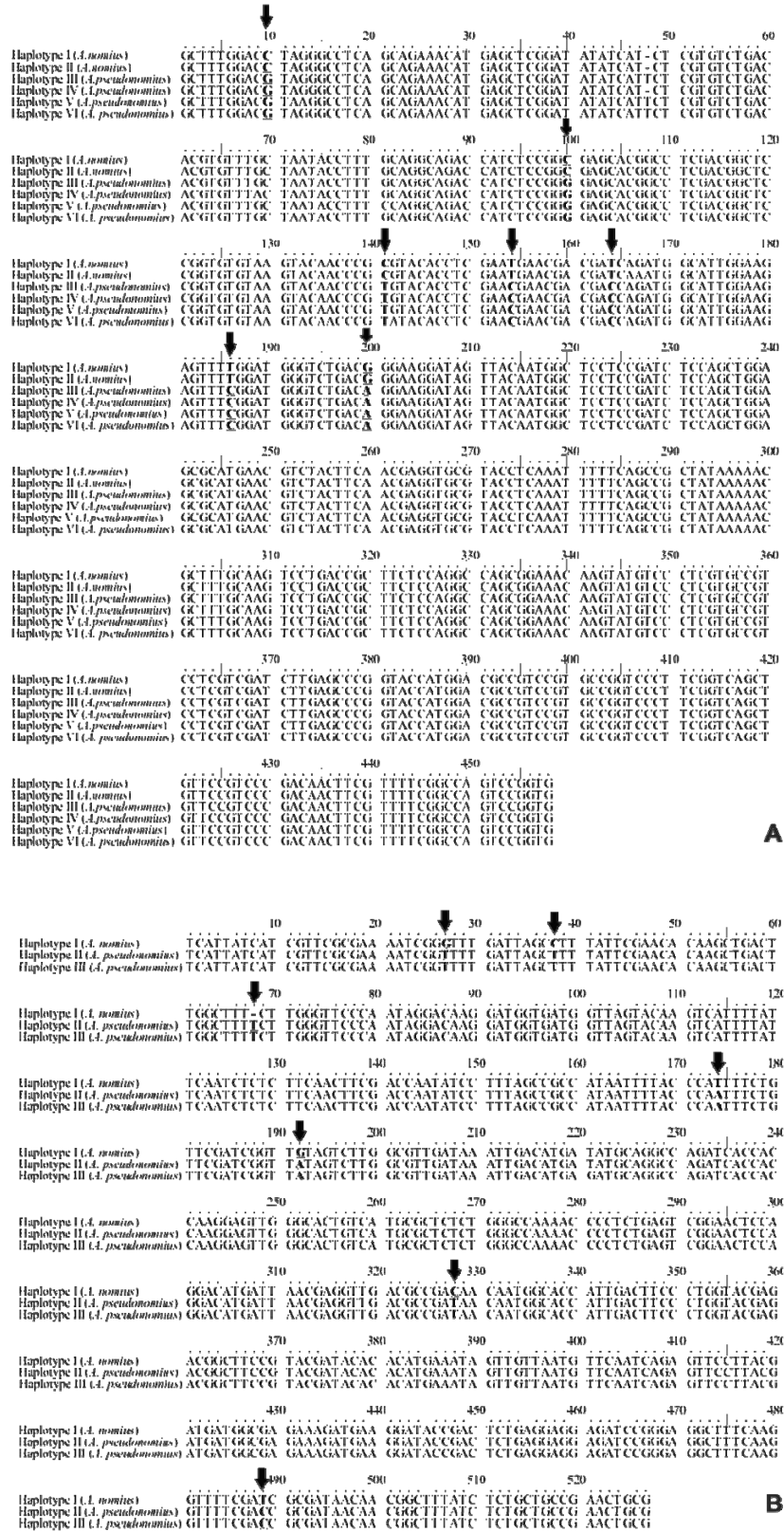


Figure 5 - Alignment of β -tubulin (A) and calmodulin (B) partial gene sequences for different haplotypes of *Aspergillus nomius* and *A. pseudonominus*. Fixed nucleotide polymorphisms between *A. nomius* and *A. pseudonominus* are indicated by arrows

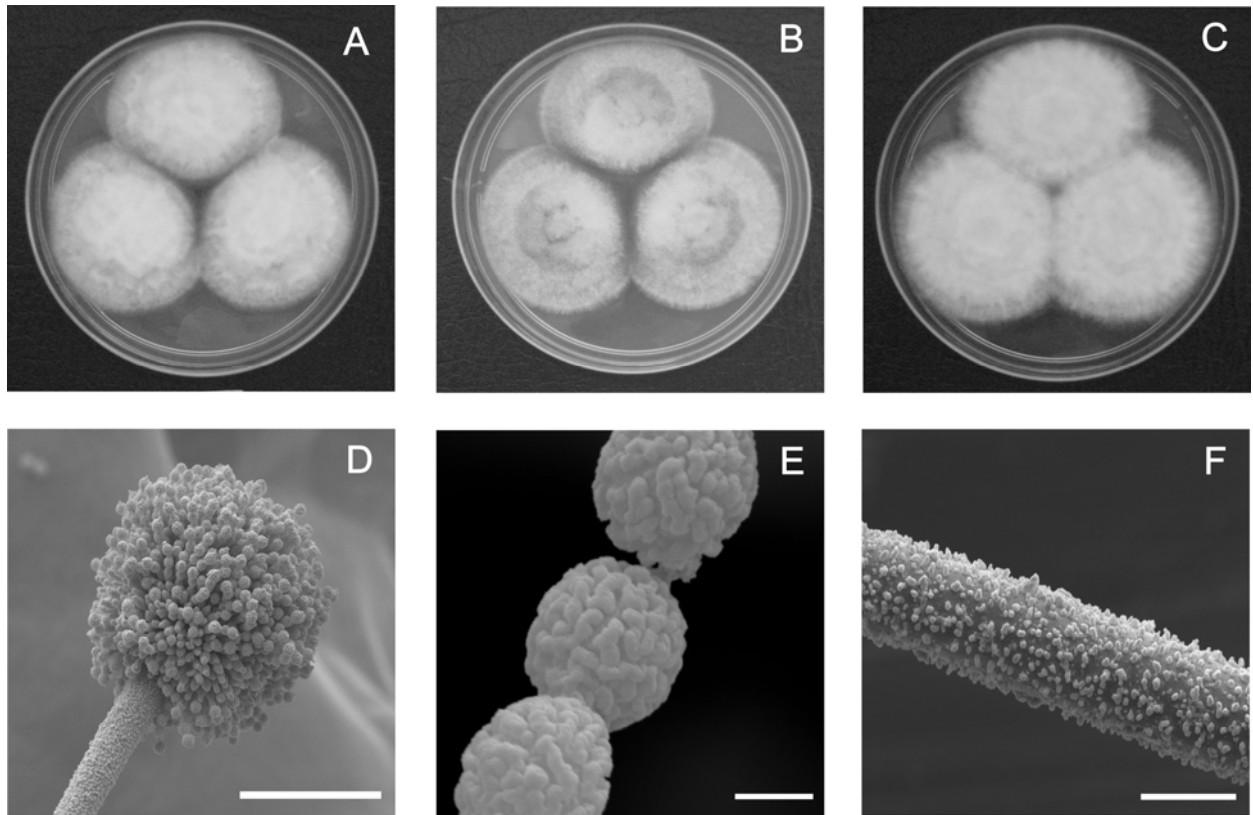


Figure 6 - *Aspergillus pseudonomius* strain ITAL 286: Colonies grown on CYA (A), MEA (B), YESA (C) at 25 °C for 7 days. Scanning electron micrographs of conidiophore (D), conidia (E) and stipe (F). Bars: 1 = 50 μm ; 2 = 2 μm ; 3 = 10 μm

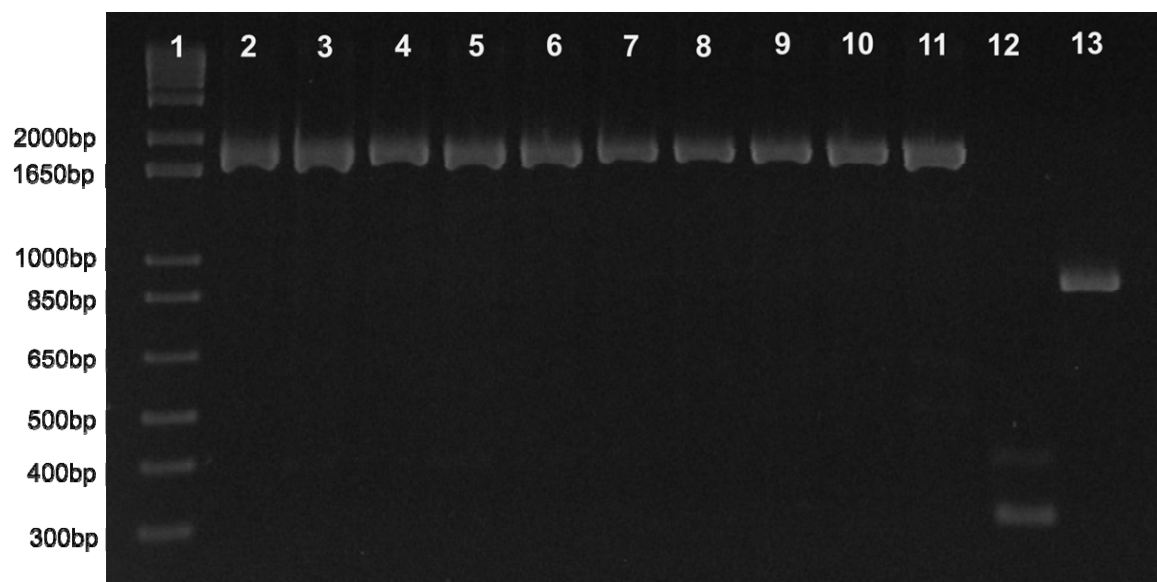


Figure 7 - Standard gel electrophoresis of PCR products derived from the *norB-cypA* region (~1.8 kb). 1, 1 kb Plus DNA Ladder; 2-6, *Aspergillus nomius* strains; 7-11, *A. pseudonomius* strains; 12 and 13, non-aflatoxigenic and aflatoxigenic strains of *A. flavus*, respectively

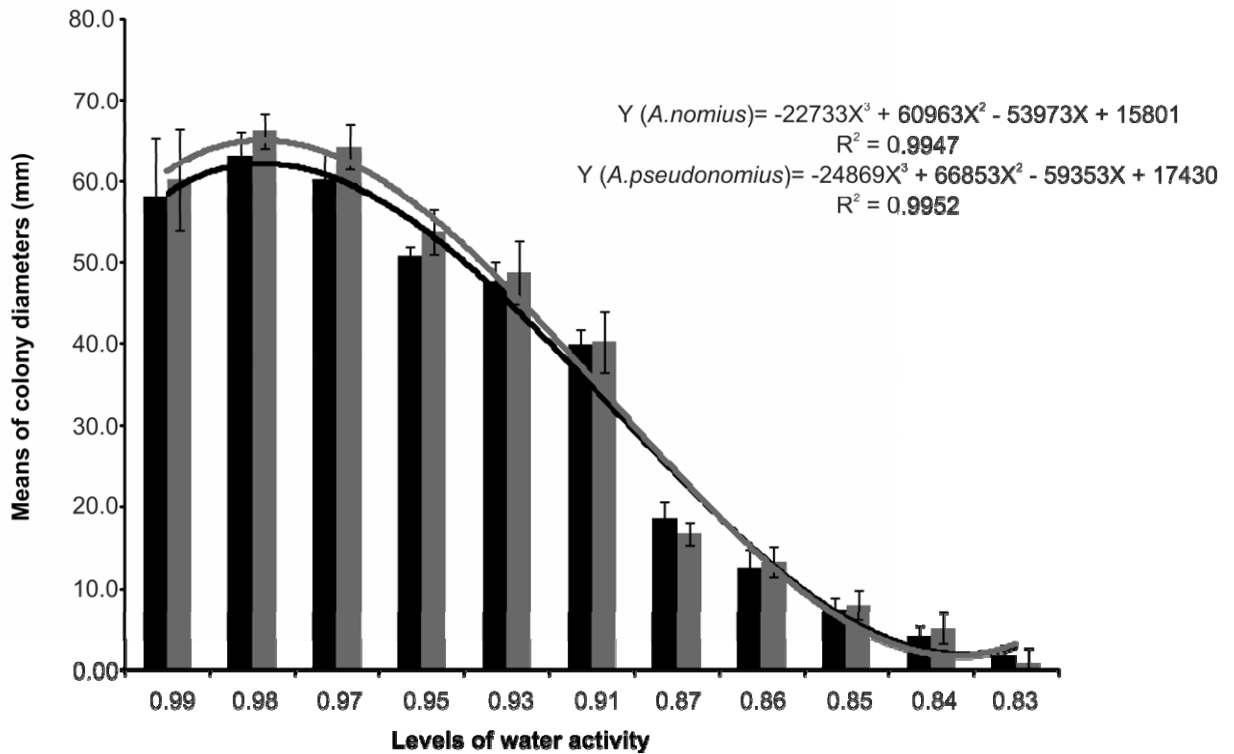


Figure 8 - Polynomial regression curve showing the relationship between the variables, colony diameter means (after 7 days) (y) and levels of water activities in CYA medium (x). *Aspergillus nomius* and *A. pseudonomius* data are shaded in black and dark grey, respectively

6 CONCLUSÕES FINAIS

- As análises dos dados de RAPD e AFLP, obtidos a partir dos 40 isolados identificados previamente por métodos morfológicos como *Aspergillus nomius* e isolados de castanha do brasil, revelaram a presença de uma alta variabilidade genética e a formação de 2 grupos principais (A e B) apoiados em um valor de bootstrap de 100%.
- As análises das sequências de nucleotídeos que codificam para os genes da β -tubulina e calmodulina, revelaram que o grupo A é formado por isolados da espécie *A. nomius* e que o grupo B é formado por isolados da espécie *A. pseudonomius*.
- As análises das sequências de nucleotídeos dos genes da β -tubulina e calmodulina para todas as sequências disponíveis no NCBI para o Clado *A. nomius* revelaram que sequências identificadas como *A. nomius* se alinharam com as espécies tipo *A. nomius* (NRRL 13137) e *A. pseudonomius* (NRRL 3353), formando 2 grupos distintos, sugerindo que 19 sequências devem ser renomeadas para *A. pseudonomius*.
- Os isolados de *A. pseudonomius* obtidos de castanha do brasil apresentaram amplificação positiva para o gene *norB-cypA*, revelando a presença do gene capaz de produzir aflatoxina do tipo G. As análises de produção de aflatoxinas também revelaram que os isolados de *A. pseudonomius* são capazes de produzir aflatoxinas do tipo B e G.
- *A. nomius* e *A. pseudonomius* são capazes de crescer em uma ampla faixa de variação nos níveis de atividade de água, com valor ótimo de 0.98. Os efeitos da

diferença na redução da atividade de água não foram significativos entre as espécies. *A. pseudonomius* revelou ser menos tolerante a baixa atividade de água.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HADI, A.; SCHMIDT-HEYDT, M.; PARRA, R.; GEISEN, R.; MAGAN, N. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 9, p. 757-767, 2012.

ABDIN, M. Z.; AHMAD, M. M.; JAVED, S. Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an update. **Archives of Microbiology**, v. 192, n. 6, p. 409–25, 2010.

AMARAL, K. A. S.; NASCIMENTO, G. B.; SEKIYAMA, B. L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI JR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v. 26, n. 2, p. 336–342, 2006.

ARRUS, K.; BLANK, G.; CLEAR, R.; HOLLEY, R. A.; ABRAMSON, D. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 5, p. 1060–1065, 2005.

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**, v. 57, p. 729-732, 2000.

BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K. C.; CLEVELAND, T. E. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 2, p. 83–93, 2003.

BLOUNT, W. P. Turkey “x” Disease. **Turkey**, v. 9, p. 55-58, 1961.

BAQUIÃO, A. C.; OLIVEIRA, M. M. M. de; REIS, T. A.; ZORZETE, P.; ATAYDE, D. D.; CORREA, B. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 1127–1132, 2013.

BAQUIÃO, A. C.; ZORZETE, P.; REIS, T. A.; ASSUNÇÃO, E.; VERGUEIRO, S.; CORREA, B. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 224–229, 2012.

BARROS, G. G.; CHIOTTA, M. L.; REYNOSO, M. M.; TORRES, A. M.; CHULZE, S. N. Molecular characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolates collected from peanut fields in Argentina using AFLPs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 900–909, 2007.

BRADSHAW, B.; ETXEBARRIA-JARDÍ, G.; BONJOCH, J.). Polycyclic framework synthesis of anominine and tubingensin A indole diterpenoids. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, p. 772–778, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC No 7, de 18 de Fevereiro de 2011. Diário Oficial da União. Brasília-DF: Seção 1, 2011.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319–323, 2002.

CALDERARI, T. O.; IAMANAKA, B. T.; FRISVAD, J. C.; PITT, J. I.; SARTORI, D.; PEREIRA, J. L.; FUNGARO, M. H. P.; TANIWAKI, M. H. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: from rainforest to consumer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 267–72, 2013.

CARBONE, I.; RAMIREZ-PRADO, J. H.; JAKOBEK, J. L.; HORN, B. W. Gene duplication, modularity and adaptation in the evolution of the aflatoxin gene cluster. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 111, p. 1-12, 2007.

CARVALHO, R. A.; BATISTA, L. R.; PRADO, G.; OLIVEIRA, B. R.; SILVA, D. M. Incidência de fungos toxigênicos e aflatoxinas em arroz. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG, v. 34, n. 4, p. 946–952, 2010.

CARY, J. W.; KLICH, M. A; BELTZ, S. B. Characterization of aflatoxin-producing fungi outside of *Aspergillus* section *Flavi*. **Mycologia**, v. 97, n. 2, p. 425–432, 2005.

CASTRILLÓN, A. L.; PURCHIO, A. Ocorrência de aflatoxinas em castanhas do Pará (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. 1808). **Acta Amazonica**, v. 18, n. 1/2, p. 49-56, 1988.

CAVALCANTE, M. C.; OLIVEIRA, F. F.; MAUÉS, M. M.; FREITAS, B. M. Pollination requirements and the foraging behavior of potential pollinators of cultivated Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) Trees in Central Amazon Rainforest. **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

CHANG, P-K.; HORN, B. W.; DORNER, J. W. Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. **Fungal Genetics and Biology: FG & B**, v. 42, n. 11, p. 914–23, 2005.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Conjunta Mensal, Abril de 2012.

COSTA, A. K. F.; FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; ANDRADE, J. A.; MENDES, F. N. P.; Fungos associados à castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza-CE, v. 40, n. 3, p. 455-460, 2009.

DALLYN, H.; FOX, A. Spoilage of materials of reduced water activity by xerophilic fungi. In *Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment*. Ed. G. H. Gould & J.E. L. Corry, **Society of Applied Bacteriology Technical Series**, n. 15, London, U.K., Academic Press, 1980.

DONNER, M.; ATEHNKENG, J.; SIKORA, R. A.; BANDYOPADHYAY, R.; COTTY, P. J. Molecular characterization of atoxigenic strains for biological control of aflatoxins in Nigeria. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 5, p. 576-590, 2010.

DOSTER, M. A; COTTY, P. J.; MICHALIDES, T. J. Description of a distinctive aflatoxin-producing strain of *Aspergillus nomius* that produces submerged sclerotia. **Mycopathologia**, v. 168, n. 4, p. 193–201, 2009.

EHRlich, K. C. Evolution of the aflatoxin gene cluster. **Mycotoxin Research**, v. 22, n. 1, p. 9-15, 2006.

EHRlich, K. C.; CHANG, P-K.; YU, J.; COTTY, P. J. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6518-6524, 2004.

EHRlich, K. C.; SCHARFENSTEIN JR, L. L.; MONTALBANO, B. G.; CHANG, P-K. Are the genes *nadA* and *norB* involved in formation of aflatoxin G₁? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1717–1729, 2008.

EHRlich, K. C.; YU, J.; COTTY, P. J. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 518–527, 2005.

- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.
- FARIAS, A. X.; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; ANDERSEN, P. M.; CORREA, T. B. S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v. 35, n. 3, p. 617-621, 2000.
- FEIBELMAN, T. P.; COTTY, P. J.; DOSTER, M. A.; MICHAILIDES, T. J. A morphologically distinct strain of *Aspergillus nomius*. **Mycologia**, v. 90, n. 4, p. 618-623, 1998.
- FERRI, D. V.; MUNHOZ, C. F.; NEVES, P. M. O.; FERRACIN, L. M.; SARTORI, D.; VIEIRA, M. L. C.; FUNGARO, M. H. P. Genetic variability of *Beauveria bassiana* and a DNA marker for environmental monitoring of a highly virulent isolate against *Cosmopolites sordidus*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 569–574, 2012.
- FERREIRA, L. M. M.; TONINI, H. Comportamento da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) e da cupiúba (*Goupia glabra*) em sistema agrosilvicultural na região da Confiança, Cantá-Roraima. **Acta Amazonica**, Manaus-AM, v. 39, n. 4, p. 835–842, 2009.
- FILTENBORG, O. L. E.; FRISVAD, J. C.; SVENDSEN, J. A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 581-585, 1983.
- FRISVAD, J. C.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 442–453, 2005.
- FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkyphenone retention indices and UV-VIS spectra (diodearray detection). **Journal Chromatography**, v. 404, n. 1, p. 195-214, 1987.
- FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C.; AZEVEDO, J. L. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. **Applied Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 389–392, 1996.

GEISEN, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 388–392, 1996.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323–1330, 1995.

GLOER, J. B.; RINDERKNECHT, B. L.; WICKLOW, D. T.; DOWD, P. F. Nominine : A new insecticidal indole diterpene from the sclerotia of *Aspergillus nomius*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 54, p. 2530–2532, 1989.

GODET, M.; MUNAUT, F. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 304, n. 2, p. 157–68, 2010.

GONÇALVES, J. S.; FERRACIN, L. M.; VIEIRA, M. L. C.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1817–1825, 2012.

HONG, S. B.; CHO, H. S.; SHIN, H. D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 477–486, 2006.

HORN, B. W.; MOORE, G. G.; CARBONE, I. Sexual reproduction in aflatoxin-producing *Aspergillus nomius*. **Mycologia**, v. 103, n. 1, p. 174–183, 2011.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Review: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101–134, 2001.

ITO, Y.; PETERSON, S. W.; GOTO, T. Isolation and characterization of *Aspergillus nomius* from Japanese soil and silkworm excrement. **Mycotoxins**, v. 46, p. 9–15, 1998.

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

JAMALI, M.; EBRAHIMI, M. A.; KARIMIPOUR, M.; SHAMS-GHAHFAROKHIL, M.; DINPARAST-DJADID, N.; KALANTARI, S.; PILEHVAR-SOLTANAHMADI, Y.; AMANI, A.; RAZZAGHI-ABYNEH, M. An insight into the distribution, genetic diversity, and mycotoxin production of *Aspergillus* section *Flavi* in soils of pistachio orchards. **Folia Microbiologica**, v. 36, n. 1, p. 27–57, 2012.

JECFA, 1998. Forty-ninth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. In: **Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminates: Aflatoxins** WHO Food Additives Series 40. WHO, Geneva, pp. 359-469.

JOHN, J. A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 3, p. 196–209, 2010.

KLITGAARD, A.; IVERSEN, A.; ANDERSEN, M. R.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; NIELSEN, K. F. Aggressive dereplication using UHPLC-DAD-QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 1, p. 1-11, 2014.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 283–300, 2003.

KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 53, n. 3, p. 147–158, 1987.

LEE, C. Z.; LIOU, G. Y.; YUAN, G. F. Comparison of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* by amplified fragment length polymorphism. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, p. 61-68, 2004.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.

LINK, H.F. Observationes in Ordines plantarum naturales. Dissertation prima, complectens Anandrarum ordines Epiphytas, Mucedines Gastomycos et Fungos Der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin. **Magazin fur die neuesten Entdeckungen in der gesamten Naturkunde**, v. 3, p. 1-42, 1809.

LOCATELLI, M.; SILVA FILHO, E. P.; VIEIRA, A. H.; MARTINS, E. P.; LUNA PEQUENO, P. L. Castanha-do-brasil: opção para solo de baixa fertilidade na Amazônia. "In: Seminário Nacional Degradação e Recuperação Ambiental, 2003". Foz do Iguaçu: Sobrade, 2003. Artigo em Anais de Congresso (ALICE). <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/915982>.

MAIA, P. P.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Aflatoxinas em rações destinadas a cães, gatos e pássaros: uma revisão. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, p. 235-257, 2007.

MELLO, F. R. de.; SCUSSEL, V. M. Characteristics of in-shell Brazil nuts and their relationship to aflatoxin contamination: criteria for sorting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 9305–9310, 2007.

MIDORIKAWA, G. E. O.; PINHEIRO, M. R. R.; VIDIGAL, B. S.; ARRUDA, M. C.; COSTA, F. F.; PAPPAS JR, G. J.; RIBEIRO, S. G.; FREIRE, F.; MILLER, R. N. G. Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 12–18, 2008.

MONTIEL, D.; DICKINSON, M. J.; LEE, H. A.; DYER, P. S.; JEENES, D. J.; ROBERTS, I. N.; JAMES, S.; FULLER, L. J.; MATSUCHIMA, K. Genetic differentiation of the *Aspergillus* section *Flavi* complex using AFLP fingerprints. **Mycological Research**, v. 107, n. 12, p. 1427–1434, 2003.

MULLER, C. H.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; KATO, A. K.; CARVALHO, J. E. U. de; STEIN, R. L. B.; SILVA, A. de B. A cultura da Castanha-do-Brasil. Brasília, DF: **EMBRAPA-SPI**, 65 p., 1995. (Coleção Plantar, 23).

NAKAMURA, H.; NARIHIRO, T.; TSURUOKA, N.; MOCHIMARU, H.; MATSUMOTO, R.; TANABE, Y.; HAGIYA, K.; IKEBA, K.; MARUYAMA, A.; HANADA, S. Evaluation of the aflatoxin biosynthetic genes for identification of the *Aspergillus* section *Flavi*. **Microbes and Environments**, v. 26, n. 4, p. 367-369, 2011.

NIELSEN, K. F.; MANSSON, M.; RANK, C.; FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 2338-2348, 2011.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography – UV – mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography**, v. 1002, p. 111–136, 2003.

OLSEN, M.; JOHNSON, P.; MÖLLER, T.; PALADINO, R.; LINDBLAD, M. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 123–126, 2008.

PACHECO, A. M.; LUCAS, A.; PARENTE, R.; PACHECO, N. Association between aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v. 30, n. 2, p. 330–334, 2010.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. Aflatoxins evaluation on in-shell and shelled dry Brazil nuts for export analysed by LC-MS/MS - 2006 and 2007 harvests. **World Mycotoxin Journal**, v. 2, n. 3, p. 295–304, 2009.

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**, v. 93, n. 4, p. 689, 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**, v. 58, n. 3, p. 725–735, 2008.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SILVA, D. M. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazonica**, Manaus-AM, v. 40, n. 1, p. 213–220, 2010.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; GLENN CSIRO, D. R. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, n. 1, p. 109–114, 1983.

PITT, J. I.; MISCAMBLE, B. F. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 1, p. 86-90, 1994.

POHLAND, A. E. Mycotoxins in review. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, p. 17-28, 1993.

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.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.

RANK, C.; KLEJNSTRUP, M. L.; PETERSEN, L. M.; KILDGAARD, S.; FRISVAD, J. C.; GOTFREDSEN, C. H.; LARSEN, T. O. Comparative chemistry of *Aspergillus oryzae* (RIB40) and *A. flavus* (NRRL 3357). **Metabolites**, v. 2, n. 4, p. 39–56, 2012.

REIS, G. M.; ROCHA, L. O.; ATAYDE, D. D.; BATATINHA, M. J. M.; CORRÊA, B. Molecular characterization by amplified fragment length polymorphism and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* isolated from freshly harvested peanut in Brazil. **World Mycotoxin Journal**, v. 5, n. 2, p.187-194, 2012a.

REIS, T. A; OLIVEIRA, T. D.; BAQUIÃO, A. C.; GONÇALVES, S. S.; ZORZETE, P.; CORRÊA, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 2, p. 61–68, 2012b.

RIGÓ, K.; VARGA, J.; TÓTH, B.; TÉREN, J.; MESTERHÁZY, A.; KOZAKIEWICZ, Z. Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences of the intergenic transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 9–16, 2002.

ROCHA, L. O.; REIS, G. M.; BRAGHINI, R.; KOBASHIGAWA, E.; ARAÚJO, J.; CORRÊA, B. Characterization of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 132, n. 3, p. 353–366, 2012.

ROHLF, F. J. NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York, 2000.

ROZE, L. V.; HONG, S. Y.; LINZ, J. E. Aflatoxin biosynthesis: current frontiers. **Food Science and Technology**, v. 4, p. 293-311, 2013.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, C. F.; ABSY, M. L. Polinizadores de *Bertholletia excelsa* (Lecythidales : Lecythidaceae): Interações com abelhas sem ferrão (Apidae : Meliponini) e nicho trófico. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 854–861, 2010.

SALOMÃO, R. P. Densidade, estrutura e distribuição espacial de castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H . & B.) em dois platôs de floresta ombrófila densa na Amazônia setentrional brasileira. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, **Ciências Naturais**, Belém-PA, v. 4, n. 1, p. 11-25, 2009.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W.; FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SHIOMI, K.; HATAE, K.; YAMAGUCHI, Y.; MASUMA, R.; TOMODA, H.; KOBAYASHI, S.; OMURA, S. New antibiotics miyakamides produced by a fungus. **The Journal of Antibiotics**, v. 55, n. 11, p. 952-961, 2002.

SKORY, C. D.; CHANG, P. K.; CARY, J.; LINZ, J. E. Isolation and characterization of a gene from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversion of versicolorin A to sterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 3527–3337, 1992.

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 760, n. 2, p. 264–270, 1997.

SOUZA, J. M. L.de.; CARTAXO, C. B. da. C.; LEITE, F. M. N.; SOUZA, L. M. Manual de Segurança e qualidade para a cultura da castanha do brasil. **Embrapa Acre**, Rio Branco-AC, 48 p., 2001.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamento de amêndoa e torta de castanha do brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v. 24, p. 120-128, 2004.

STAUB, G. M.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T.; DOWN, P. F. Aspernomine: a cytotoxic antiinsectan metabolite with a novel ring system from the sclerotia of *Aspergillus nomius*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 1015–1017, 1992.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TANIWAKI, M. H.; FONSECA, I.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Variabilidade de produção de aflatoxinas por linhagens de *Aspergillus flavus* em diferentes tempos de manutenção. **Scientia Agricola**, Piracicaba-SP, v. 50, n. 1, p. 140-150, 1993.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; IAMANAKA, B. T.; SARTORI, D.; COPETTI, M. V.; BALAJEE, A.; FUNGARO, M. H. P.; FRISVAD, J. C. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. **PloS One**, v. 7, n. 8, p. 1-7, 2012.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 57–80, 2011.

VIEIRA, A. H.; BENTES-GAMA, M. M.; ROCHA, R. B.; LOCATELLI, M.; OLIVEIRA, A. C. Fenologia reprodutiva de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. Bompl.), em Porto Velho, RO. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** Embrapa Rondônia, Porto Velho-RO, ISSN 1677-8618, 13 p., 2009.

VILHENA, M. R. Ciência, tecnologia e desenvolvimento na economia da castanha-do-brasil – A transformação industrial da castanha-do-brasil na COMARU-Região Sul do Amapá. 2004. 149 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2004.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

YU, J.; BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K. C. Aflatoxin biosynthesis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 19, n. 4, p. 191–200, 2002.

YU, J.; CLEVELAND, T. E.; NIERMAN, W. C.; BENNETT, J. W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 22, n. 4, p. 194–202, 2005.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.