



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JEFERSON HENRIQUE MOREIRA

**DIVERSIDADE DE *Aspergillus* SEÇÃO *Circumdati*
ISOLADOS NO BRASIL**

Londrina
2022



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



IDR-Paraná

Instituto de Desenvolvimento
Rural do Paraná - IAPAR-EMATER



JEFERSON HENRIQUE MOREIRA

**DIVERSIDADE DE *Aspergillus* SEÇÃO *Circumdati*
ISOLADOS NO BRASIL**

JEFERSON HENRIQUE MOREIRA

**DIVERSIDADE DE *Aspergillus* SEÇÃO *Circumdati*
ISOLADOS NO BRASIL**

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

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

Londrina
2022

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

J45d Moreira, Jeferson Henrique.
Diversidade de *Aspergillus* seção *Circumdati* isolados no Brasil / Jeferson Henrique Moreira. - Londrina, 2022.
84 f.

Orientador: Maria Helena Pelegrinelli Fungaro.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2022.
Inclui bibliografia.

1. *Aspergillus* seção *Circumdati* - Tese. 2. RPB2 - Tese. 3. CAM - Tese. 4. BENA - Tese. I. Fungaro, Maria Helena Pelegrinelli . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 574

JEFERSON HENRIQUE MOREIRA

**DIVERSIDADE DE *Aspergillus* SEÇÃO *Circumdati* ISOLADOS NO
BRASIL**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Dhiego Gomes Ferreira
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
UENP

Prof. Dr. Laurival Antônio Villas Boas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 01 de junho de 2022.

Dedico este trabalho a minha família, especialmente a pessoa que sem suas lutas eu não teria chegado até aqui. Mãe, seu apoio e seu incentivo foram a luz que me guiaram durante essa trajetória.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A todos os meus familiares que estiveram comigo durante toda minha trajetória e que lutaram comigo contra as dificuldades da vida. Em especial à minha mãe Maria Jose de Jesus, por ser meu maior exemplo e força para persistir e lutar, ao meu pai Wilson Moreira, pelo auxílio e suporte em momentos de dificuldade e a minha vó Maria Ilda Moreira, por ser a mulher mais forte e guerreira que eu conheço. A todos meus familiares, vocês são fundamentais na minha vida.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Helena Pelegrineli Fungaro, pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos, paciência e por ser um exemplo de pessoa e profissional. Seu papel foi fundamental para meu desenvolvimento na vida acadêmica e pessoal, o mundo precisa de mais pessoas a seu exemplo.

Ao Dr. Josué José da Silva pelo suporte e ajuda no desenvolvimento desse projeto, também por todo ensinamento e tempo concedido em minha orientação.

À Dr^a. Beatriz Thie lamanka e a Dr^a. Marta Taniwaki pela oportunidade, ensinamentos e por serem exemplos de competência profissional e pessoal. O suporte de vocês foi essencial para o desenvolvimento desse projeto.

Ao meu amigo e Prof. Dr^o. Dhiego Gomes Ferreira, por todos os ensinamentos, conselhos e ajuda fornecida durante o desenvolvimento da minha vida acadêmica, você é um exemplo de profissional e uma pessoa incrível.

A todos os membros, funcionários e pesquisadores do Instituto de Tecnologia de Alimentos, pelo tempo dedicado em meu ensinamento, pela companhia e suporte fornecido durante o desenvolvimento desse projeto.

À Universidade Estadual de Londrina e ao programa de Genética e Biologia Molecular, por fornecer todo o suporte e subsídio necessário para o desenvolvimento dessa pesquisa permitindo o crescimento também do pesquisador.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa de estudo.

A todos professores que exerceram sua função de maneira exemplar, zelando sempre pelo conhecimento dos alunos e incentivando a continuidade e melhoramento da vida acadêmica e pessoal.

A todos os meus amigos que me auxiliaram direta ou indiretamente durante o desenvolvimento desse projeto, vocês são minha força e felicidade, minha riqueza e história, exemplo e inspirações. Em especial aos meus amigos, Alan Cesar, Beatriz Gordiano, Fernando Otsu, Harrysson de Moraes, Heloisa Soares, Juliana Espindola, Lethicia Karolaine Vieira, Marcelo Martins e Thiago Carazzai. Amo vocês!

A todos que em mim acreditaram e me incentivaram mesmo quando eu mesmo tinha perdido as esperanças.

À TODOS MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

MOREIRA, Jeferson Henrique. **Diversidade de *Aspergillus* seção *Circumdati* isolados no Brasil**. 2022. 84p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, Londrina.

RESUMO

Neste trabalho, a diversidade de espécies de uma coleção de isolados brasileiros de *Aspergillus* seção *Circumdati* obtidos de grãos de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*), erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), foi investigada por meio da análise de sequências parciais de uma parte do gene que codifica para calmodulina (*CaM*) e para beta-tubulina (*BenA*), isoladamente e concatenadas. Quatro espécies de *Aspergillus* seção *Circumdati* foram identificadas, sendo *A. pallidofulvus* a espécie mais frequente e também a única presente em todos os substratos. *A. westerdijkiae* foi a segunda espécie mais prevalente e com maior incidência em grãos de café. *A. ochraceus* e *A. steynii* foram raros, com a primeira ocorrendo apenas em pimenta-preta e a segunda restrita ao café. Dentre os quatro isolados encontrados, apenas *Aspergillus pallidofulvus* não foi reconhecido na literatura como produtor de ocratoxina A, que é uma substância tóxica capaz de causar patologias mediante a ingestão oral. Os isolados também foram submetidos à amplificação parcial do gene que codifica a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*), visando ampliar a disponibilidade de sequências desse gene em banco de dados e analisar seu potencial para o estabelecimento de relações filogenéticas de *Aspergillus* seção *Circumdati*. Dentre as sequências de *RPB2* dos isolados de *A. pallidofulvus* foi possível identificar a formação de dois grupos suportados por alto valor de bootstrap, entretanto o mesmo não foi suportado pelos outros genes analisados. A análise de caracteres morfológicos entre os representantes dos dois grupos não revelou diferenças significativas para caracterizá-los como espécies distintas.

Palavras-chave: *Aspergillus* seção *Circumdati*, *Aspergillus pallidofulvus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *RPB2*, *CaM*, *BenA*.

MOREIRA, Jeferson Henrique. **Diversity of *Aspergillus* section *Circumdati* isolates in Brazil.** 2022. 84p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, Londrina.

ABSTRACT

In this study, the diversity of species from a collection of *Aspergillus* section *Circumdati* isolates collected in Brazil from coffee beans (*Coffea arábica* e *Coffea canephora*) yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) and black pepper (*Piper nigrum* L.) was investigated, through partial beta-tubulin (*BenA*), calmodulin (*CaM*) nucleotide sequences and, both concatenated. Four species of *Aspergillus* section *Circumdati* were identified, being *A. pallidofulvus* the most frequent specie and also the only one present in all substrates. *A. westerdijkiae* was the second most prevalent species and with the highest incidence in coffee beans. *A. ochraceus* and *A. steynii* were rare, the first coming only from black pepper and the second restricted to coffee. Among the four isolates found, only *A. pallidofulvus* was not recognized in the literature as a producer of ochratoxin A, which is a toxic substance capable of causing pathologies through oral ingestion. The isolates were also submitted to partial amplification of the gene that encodes the second largest subunit of RNA polymerase II (*RPB2*), aiming to increase the availability of sequences of this gene in the database and to analyze its potential for the establishment of phylogenetic relationships of *Aspergillus* section *Circumdati*. Among the *RPB2* sequences of *A. pallidofulvus* isolates, it was possible to identify the formation of two groups supported by a high bootstrap value, however, this was not supported by the other genes analyzed. The analysis of morphological characters between the representatives of the two groups did not reveal significant differences to characterize them as distinct species.

Key words: *Aspergillus* section *Circumdati*, *Aspergillus pallidofulvus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *RPB2*, *CaM*, *BenA*.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1- Relação entre subgênero e seção do gênero *Aspergillus*. Filogenia construída utilizando o método *Maximum Likelihood* (ML) baseado em sequências parciais concatenadas dos genes *BenA*, *CaM* e *RPB2*.....24

Figura 2- (A) Características microscópica das estruturas de *Aspergillus ochraceopetaliformis*; (B) Características macroscópicas de *Aspergillus westerdijkiae* em CYA.....27

Figura 3 – Estrutura química da Ocratoxina A (OTA) (C₂₀H₁₈ClNO₆).....33

Figura 4- Esquema mostrando a ordem dos genes HAL, Bzip, P450, NRPS e PKS, o tamanho e a direção da transcrição do cluster gênico da via biossintética da ocratoxina A em *Aspergillus steyni* e *A. westerdijkiae*. A figura também mostra os genes flanqueando o cluster, em branco HID (alfa beta-hidrolase) e OXI (oxiredutase).....34

Resultados e Discussão

Figura 5 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança de *Aspergillus* seção *Circumdati* a partir dos haplótipos (H) dos genes *BenA* e *CaM* concatenados. Apenas valores de *bootstrap* ≥ 70% são exibidos. ^T sobrescrito = cepa tipo. *Aspergillus robustus* é o *outgroup*.....47

- Figura 6** - Alinhamento de sequencias do gene *RPB2* para *A. seção Circumdati*, clado *A. ochraceus* sinalizando os sítios de ancoragem dos primers.....52
- Figura 7**- Árvore filogenética de máxima verossimilhança demonstrando os grupos de *Aspergillus pallidofulvus* a partir das sequências do gene *RPB2*. *Aspergillus auricomus* é *outgroup*. Apenas valores de *bootstrap* >70% são exibidos. ^T = cepa tipo.....54
- Figura 8**- Comparação de crescimento dos isolados de *Aspergillus pallidofulvus* em YESA, MEA, DG18 e CYA a 25° C e CYA a 37 °C e 42°C.....56

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1 – Principais micotoxinas produzidas por fungos da seção *Circumdati* (++: Forte produção, +: Produção média, F: Produção fraca, —: Produção não detectada)31

Tabela 2 - Número de isolados de *Aspergillus* seção *Circumdati* de acordo com o substrato e a localidade proveniente.....39

Tabela 3 – Condições de amplificação para o *loci CaM, BenA e RPB2*.....42

Resultados e Discussão

Tabela 4 – Números para as espécies de *Aspergillus* seção *Circumdati* molecularmente identificados nos isolados de amostras de grãos de café, pimenta-preta e erva-mate.....48

Tabela 5. Sítios polimórficos e diversidade nucleotídica (π) de sequencias de *RPB2* de *A. pallidofulvus* e *A. westerdijkiae*.....55

Tabela 6 – Principais características macromorfológicas de isolados representantes dos dois grupos filogenéticos de *RPB2* obtidas após 7 dias de cultura em CYA (25 °C e 37 °C), MEA, YESA e DG18 à 25 °C. O diâmetro está expresso pela média do tamanho das três colônias do mesmo isolado.....57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

° C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µM	Micromolar
Act1	Gene da actina
AIC	<i>Akaike information</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
a_w	Atividade de água
BA	Estado da Bahia
BDA	Ágar Batata Dextrose
<i>BenA</i>	Gene que codifica a proteína β -tubulina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BR	<i>Brasil</i>
Bt2a	<i>Primer de β-tubulina forward</i>
Bt2b	<i>Primer de β-tubulina reverse</i>
<i>CaM</i>	Gene que codifica a proteína calmodulina
CCCF	<i>Codex Committee on Contaminants in Foods</i>
cmd5	Primer de Calmodulina forward
cmd6	Primer de Calmodulina reverso
Da	<i>Dalton</i>
DG18	Meio Dichloran 18% Glycerol Agar
DNA	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ES	Estado de Espírito Santo
FAO	<i>Food Agriculture Organization</i>
H	Haplótipo
HAL	Gene da Halogenase
Hd	Diversidade haplotípica
HID	Gene da Alfa beta-hidrolase
IARC	Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
ITS	Internal Transcribed spacer
Kg	Kilogramas
LMT	Limite Máximo Tolerado
M	Molar
MEA	Meio de cultura Malt Extract Agar
MG	Estado de Minas Gerais
mg	Miligramas
MgCl ²	Cloreto de magnésio
ML	<i>Maximum Likelihood</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N	Número
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>Maximum Likelihood</i>
ng	<i>Nanogramas</i>
NRPS	Gene da Peptídeo sintetase não-ribossômica
OTA	Ochratoxina A
OXI	Oxiredutase
p/v	Peso/Volume
pb	Pares de base
PCR	Polimerase Chain Reaction
PEPCK	Enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKS	Gene da policetídeos sintetase
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
rDNA	DNA ribossômico
<i>RPB2</i>	RNA polimerase II (RNA polymerase II second largest subunit)
r.p.m	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SP	Estado de São Paulo
T ou T [†]	Espécie tipo ou <i>type strain</i>
TE	TAMPÃO Tris-EDTA

<i>TEF/tef-1α</i>	Fator de elongação 1-alfa
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UV	Ultravioleta
YESA	Meio de cultura Yeast Extract Sucrose Agar
π	Diversidade nucleotídica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	O gênero <i>Aspergillus</i> : aspectos gerais.....	22
2.2	<i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i> : Taxonomia.....	25
2.3	<i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i> : Ocratoxina A.....	30
2.4	<i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i> em cultivares brasileiras: café, pimenta-preta e erva-mate	35
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo Geral.....	38
3.2	Objetivos Específicos	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Material Biológico	39
4.2	Extração do DNA genômico	40
4.3	Quantificação de DNA genômico.....	41
4.4	Amplificação e sequenciamento parcial dos genes <i>BenA</i> , <i>CaM</i> e <i>RPB2</i> .	41
4.5	Análise de dados do sequenciamento	43
4.6	Diversidade genética	44
4.7	Análises morfológicas.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Diversidade de espécies de <i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i> isolados de amostras de grão de café, pimenta-preta e erva-mate.....	46
5.2	Diversidade do gene <i>RPB2</i>	51
6	CONCLUSÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICES	72
	APÊNDICE A - Haplótipos formados pelo concatenamento dos genes <i>BenA</i> e <i>CaM</i> , em relação ao substrato e origem geográfica.....	73
	APÊNDICE B- <i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i> isolados de café, pimenta-preta e erva-mate no Brasil e número de acesso das sequências <i>RPB2</i> no GenBank.....	77

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Aspergillus* abriga uma grande diversidade de espécies fúngicas com muitos representantes importantes economicamente, seja por sua aplicação na fermentação de alimentos, obtenção de metabólitos de interesse biotecnológicos ou por deteriorar e contaminar alimentos com substâncias tóxicas conhecidas como micotoxinas, cujo a ingestão pode causar doenças com diferentes sinais clínicos dependendo do tipo de micotoxina e quantidade ingerida. Taxonomicamente, o gênero *Aspergillus* pertence à família *Aspergillaceae*, dentro da ordem *Eurotiales*, classe *Eurotiomycetes* e o filo *Ascomycota*. Este filo, abriga 446 espécies descritas que se encontram subdivididas em seis subgêneros que posteriormente ramificam-se em 27 seções e 75 séries.

Dentro do gênero *Aspergillus*, a seção *Circumdati* abriga espécies cujo a presença em cultivos tem sido motivo de preocupação para o setor do agronegócio e a indústria de alimentos. Isto deve-se principalmente à incidência destas espécies, e também pelo seu potencial de produção de “ocratoxina A” por grande parte dos membros dessa seção. A ocratoxina A é uma micotoxina que possui como efeito mais notório a nefrotoxicidade em humanos. Além disso, propriedades hepatotóxicas, imunossupressoras e carcinogênicas têm sido relatadas em animais de laboratório. Em decorrência, vários países têm elaborado legislações estabelecendo limites máximos de ocratoxina A que seriam permitidos em produtos agrícolas e derivados, visando assim reduzir os danos à saúde de suas populações.

Um passo importante para elaboração de estratégias de controle para incidência de fungos toxigênicos em cultivos é entender a diversidade de espécies encontradas em produtos da agricultura. Esse conhecimento auxilia na compreensão da interação e frequência desses organismos com os substratos.

A taxonomia do gênero *Aspergillus* vem sofrendo constantes modificações conforme novas e mais amplas metodologias investigativas surgem. As abordagens clássicas, que pautam a classificação dessas espécies baseadas apenas em estruturas morfológicas e expressões fisiológicas específicas de cultivo, são insuficientes para distinguir todas as espécies. Sendo assim, a necessidade de

revisão da taxonomia estabelecida por abordagens clássicas tem sido objetivo de diversos estudos, dos quais as análises moleculares de sequências nucleotídicas vêm demonstrando maior precisão em estabelecer o limite das espécies.

Em um estudo de diversidade genética, a escolha do marcador molecular é um fator crítico. Para que um dado gene possa ser usado como marcador molecular é preciso que *primers* universais estejam disponíveis na literatura, que seja fácil de amplificar sua sequência via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e que possa ter variação suficiente para distinguir as espécies. Um outro aspecto relevante é a completude dos bancos de dados de sequências, ou seja, quantas espécies e linhagens foram sequenciadas para o referido marcador. A região ITS (espaçador interno da transcrição) do rDNA (gene de RNA ribossomal) proposta como *barcode* oficial para fungos, não possui variação suficiente para todas as espécies, sendo assim a maioria das seções do gênero *Aspergillus* necessitam de marcadores moleculares alternativos. Também, para evitar subjetividade na delimitação das espécies fúngicas recomenda-se buscar a concordância genealógica de múltiplos *loci*.

Seguindo esse critério, as sequências gênicas que codificam a calmodulina (*CaM*), beta-tubulina (*BenA*) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*) tem sido proposta como marcadores alternativos e, apesar de apresentarem limitações individuais, a utilização estratégica dessas regiões fornece dados com maior acurácia quanto a identificação e/ou classificação dessas espécies.

A última revisão taxonômica de *Aspergillus* seção *Circumdati* ocorreu em 2014, na qual o uso de dados moleculares culminou em mudanças significativas propostas por VISAGIE e colaboradores. Esses autores fizeram uso de taxonomia polifásica para delimitação de espécies, incluindo análises de sequências de nucleotídeos de parte dos genes β -tubulina, calmodulina e da região ITS, análises macro e micro morfológicas e produção de extrólitos. O gene *RPB2* não foi incluído na análise desses autores, provavelmente porque não é um gene fácil de ser amplificado e poucas sequências estão disponíveis no banco de dados.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (ITAL/UEL) observou-se que, no Brasil, *Aspergillus* seção *Circumdati* é frequentemente encontrado em amostras de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*), erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e pimenta-preta (*Piper nigrum* L.). Considerando que esses isolados fúngicos foram analisados apenas por morfologia e, em alguns casos com sequências de um

único gene, esta dissertação teve por objetivo analisar a diversidade de espécies de uma coleção de 133 isolados fúngicos, obtidos de grãos de café, erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e pimenta-preta, baseando-se no concatenamento de sequências de nucleotídeos de parte dos genes que codificam para beta-tubulina (*BenA*) e calmodulina (*CaM*). Além disso, também foi objetivo deste trabalho sequenciar parte do gene *RPB2* dos isolados da coleção, visando ampliar a disponibilidade de sequências desse gene em banco de dados e analisar seu potencial para o estabelecimento de relações filogenéticas de *A. seção Circumdati*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Aspergillus*: aspectos gerais

O gênero de fungos filamentosos *Aspergillus* pertence à família *Aspergillaceae*, dentro da ordem Eurotiales, classe *Eurotiomycetes* e filo *Ascomycota*. Ele possui uma grande diversidade de espécies, incluindo 446 espécies descritas atualmente (HOUBRAKEN *et al.*, 2020). As espécies desse gênero encontram-se amplamente distribuídas, possuindo versatilidade fisiológicas, geralmente aderindo melhor crescimento em baixa atividade da água (a_w), altas temperaturas (termotolerantes) e pH entre 4,0 a 7,0. Esse caráter versátil confere vantagem adaptativa quanto a colonização de vários substratos, o que está diretamente ligado a seu *status* econômico (PITT; HOCKING, 2009).

Morfologicamente, o gênero *Aspergillus* se caracteriza por possuir colônias com cores desde verde, amarelo, marrom, cinza, branco e preto (KLICH, 2002); a estrutura das hifas reprodutivas geralmente são asseptadas, formação de esporos assexuais que se expressam por meio de conidióforos; desenvolvimento a partir de células basais denominadas “células pé”. Normalmente, o conidióforo apresenta em sua extremidade uma vesícula multimórfica que pode ser globosa, piriforme, espetulada ou clavada, esta fornece suporte de inserção para as células conidiógenas, métulas e fiálides (SAMSON *et al.*, 2014).

As métulas, estrutura entre a vesícula e as fiálides, podem estar ausentes (unisseriado) ou presentes (bisseriado). As fiálides estão sempre presentes, e por meio dessa estrutura os conídios são formados. Os conídios podem apresentar diferentes tamanhos, ornamentação e pigmentação podendo ser um diferenciador entre as seções do gênero. Algumas espécies podem se reproduzir sexuadamente (meiótica) por meio do desenvolvimento de cleistotécios que possuem ascósporos agrupados dentro de ascos. Algumas espécies também podem apresentar células de Hülle e esclerócios (KLICH; PITT, 1988; KRIJGSHELD *et al.*, 2013).

O gênero *Aspergillus* abriga muitos representantes importantes economicamente, incluindo alguns com aplicações biotecnológicas, tais como para obtenção de enzimas, as pectinases (JOSHI *et al.*, 2006), lipases (SALIHU *et al.*,

2016), proteases (SOUZA *et al.*, 2017) e amilases (ANAGNOSTOPOULOS; TSALTAS, 2019). Além disso, podem fornecer, ácidos orgânicos, à exemplo do ácido cítrico (BEHERA, 2020), e também podem ser empregados em processos de fermentação de alimentos para produzir melhoras organolépticas no produto fermentado (ASHU *et al.*, 2016).

Entretanto, muitas espécies de *Aspergillus* também interagem de forma negativa, uma vez que podem contaminar muitos produtos agrícolas em diferentes estágios da sua produção, deteriorando e causando mudanças sensoriais, nutricionais e na qualidade destes produtos (PERRONE; GALLO, 2016).

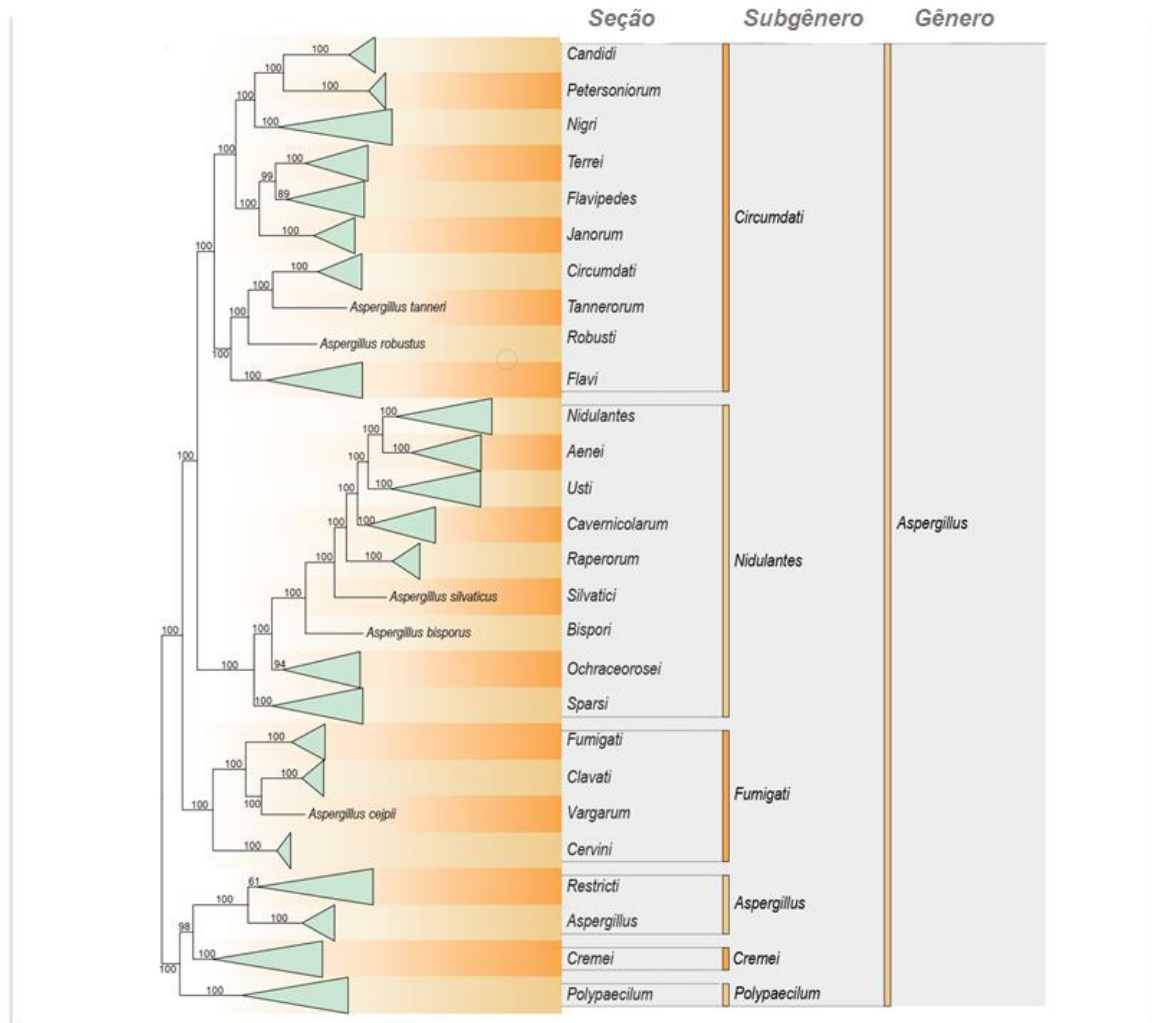
Além de contaminar os produtos agrícolas, várias espécies do gênero *Aspergillus* possuem a capacidade de produzir metabolitos tóxicos conhecidos como micotoxinas, cujo a ingestão pode causar patologias denominadas de micotoxicoses, um termo genérico utilizado para indicar doenças que podem manifestar diferentes sinais clínicos dependendo do tipo de micotoxina e da quantidade ingerida (FRISVAD *et al.*, 2018). Consecutivamente, a ocorrência de fungos toxigênicos em produtos alimentares de elevado consumo *per capita* podem gerar risco a saúde pública e também prejuízos econômicos, uma vez que podem causar a rejeição de mercadoria contaminada gerando quebras contratuais (IAMANAKA *et al.*, 2010).

Existem cerca de 300 micotoxinas descritas na literatura, sendo grande parte destas produzidas por fungos do gênero *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*; porém apenas algumas destas micotoxinas são destacadas por causar risco significativos a saúde como as aflatoxinas, fumonisina e ocratoxina A. As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário fúngico, geralmente possuem distribuição taxonômica restrita e acredita-se desempenhar, dentre outras, função competitiva entre as espécies. São compostos de baixo peso molecular com diferentes estruturas químicas e classes enzimáticas envolvidas na sua biossíntese, e sua produção normalmente parte da expressão de um cluster gênico (KELLER *et al.*, 2005; BENNETT *et al.*, 2003; FRISVAD *et al.*, 2018).

Houbraken *et al.* (2020) organizaram o gênero *Aspergillus* em seis subgêneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes*, *Cremeri*, *Polypaecilum*), 27 seções (*Aspergillus*, *Restricti*, *Candidi*, *Circumdati*, *Flavi*, *Flavipedes*, *Nigri*, *Terrei*, *Cervini*, *Clavati*, *Fumigati*, *Aenei*, *Bispori*, *Cremeri*, *Nidulantes*, *Ochraceorosei*, *Silvatici*, *Sparsi*,

Usti, Pertersoniorum, Robusti, Tannerorum, Vargarum, Carvenicolarum, Raperorum, Polypaecilum, Janorum) (FIGURA 1) e 75 séries.

Figura 1 - Relação entre subgênero e seção do gênero *Aspergillus*. Filogenia construída utilizando o método *Maximum Likelihood* (ML) baseado em sequências parciais concatenadas dos genes *BenA*, *CaM* e *RPB2*.



Fonte: adaptado de HOUBRAKEN *et al* (2020).

A importância econômica das espécies de *Aspergillus* ressalta a necessidade de uma taxonômica bem estabelecida. Entretanto, a organização taxonômica desse gênero é complexa e abordagens clássicas que pautam nas diferenças fisiológicas e morfológicas são insuficientes para distinguir todas as espécies. Nesse sentido, o emprego da taxonomia polifásica vêm sendo de grande auxílio para identificação de

espécies fúngicas. Essa abordagem adota um conceito pluralista no reconhecimento de espécie, com a conciliação de dados fenotípicos e filogenéticos (SILVA, 2019).

Os caracteres morfológicos constituem parte importante na descrição, identificação e classificação dos fungos, para isso, parâmetros como a taxa de crescimento, textura, grau de esporulação da colônia, produção de esclerócios, cores dos micélios, presença de pigmentos solúveis e exsudados, coloração do verso das colônias, presença de células Hülle e cleistotécios são exemplos de características importantes para distinguir as espécies dentro o gênero (PITT; HOCKING, 2009).

No que se refere ao conceito filogenético, pautado em sequências de nucleotídeos, este caracteriza-se por agrupar espécies de acordo com a ancestralidade, de modo que espécies que compartilham características genômicas e um mesmo ancestral comum formam grupos monofiléticos (ALDHEBIANI, 2018). O contexto filogenético oferece uma interpretação sensível para o contexto evolutivo, uma vez que, geralmente, mudanças na composição genética podem ser observadas antes da expressão diferencial morfológica e/ou fisiológica.

A aplicação da taxonomia polifásica, principalmente o uso de dados moleculares para identificação e/ou detecção de linhagens de *Aspergillus*, tem sido um importante facilitador de avaliação da qualidade de produtos, auxiliando no controle dos níveis de contaminação fúngica e de micotoxinas nos mais variados produtos destinados ao consumo humano. Além disso, a aplicação dessas técnicas fornece suporte para compreender as relações filogenéticas e como essas espécies se comportam em um contexto evolutivo e ecológico. Mesmo assim, muitas dúvidas ainda permanecem e a taxonomia dessas seções tem sido constantemente modificadas.

2.2 *Aspergillus* seção *Circumdati*: Taxonomia

A presença dos fungos pertencentes à seção *Circumdati* (subgênero *Circumdati*) em cultivares tem sido sinônimo de preocupação para o agronegócio e indústria de alimentos. Isso deve-se ao fato desta seção abrigar espécies capazes de produzir micotoxinas. Alguns dos exemplos mais relevantes para estas substâncias

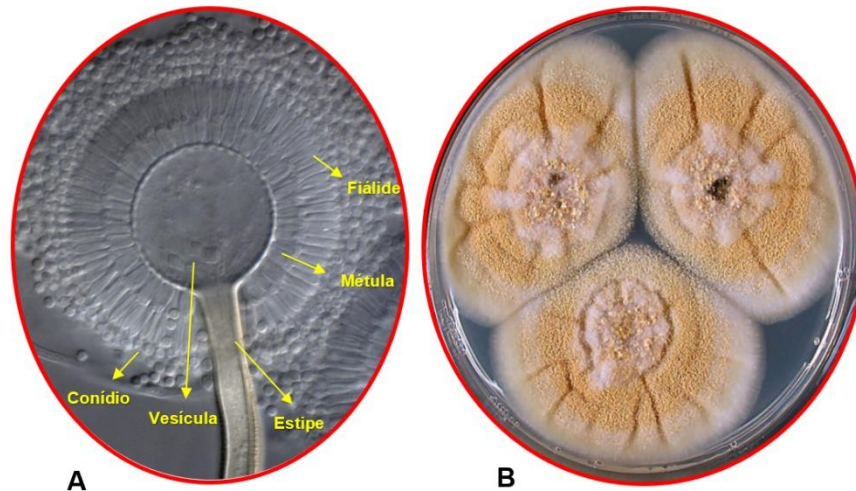
incluem a xanthomegnina, viomelleina, vioxanthina (STACK; MISLIVEC, 1978; ROBBERS *et al.*, 1978), ocratoxina A, ácido penicílico (VAN DER MERWE *et al.*, 1965; FRISVAD *et al.*, 2004), aflatoxinas (Classificado pelo IARC como carcinogênico para humanos), e um intermediário biossintético desta, a esterigmatocistina (KLICH *et al.*, 2003). Dentre estas, a ocratoxina A é uma das micotoxinas mais preocupantes produzida por membros da seção *Circumdati*, principalmente devido a sua toxicidade e relatos de sua incidência em vários substratos.

Além da produção de metabólitos tóxicos, algumas espécies dessa seção também são relatadas por causar patologias na espécie humana e em outros animais, a exemplo da onicomiose, associada as espécies *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. insulicola*, *A. melleus*, *A. ochraceopetaliformis*, *A. persii*, e *A. westerdijkiae* (GARCIA-MATOS *et al.*, 2005; BRASCH *et al.*, 2009; FRÍAS-DE-LEÓN *et al.*, 2018), otomicose por *A. sclerotiorum* (HARIMA *et al.*, 2004) e aspergilose pulmonar também pelas espécies *A. ochraceus* e *A. sclerotiorum* (NOVEY; WELLS, 1978; WIERZBICKA *et al.*, 1997).

Todavia, essa seção também possui interesse biotecnológico como para a produção de enzimas biodegradativas de corante por *A. ochraceus* (TELKE *et al.*, 2010; HUMNABADKAR *et al.*, 2008) e de enzimas tanases pela mesma espécie (GONÇALVES *et al.*, 2012). *Aspergillus melleus* é destacado pela produção de enzimas proteolítica semi-alcalina Seaprose (LUISETTI *et al.*, 1991), enquanto *Aspergillus pallidofulvus* pode estar relacionado a melhorias organolépticas em chá *Pu-erh* (ZHOU *et al.*, 2020).

Quanto às características morfológicas, a seção *Circumdati* geralmente apresenta conidióforo bisseriados com vesícula globosa, estipe rugosa. As colônias exibem esporulação baixa à moderada e conídios em tons de amarelo a ocre, podendo ser globosos, subglobosos, lisos e rugosos. Os esclerócios quando presentes podem exibir coloração variável como tons de branco, amarelo, marrom claro, rosa, creme, laranja ou roxo avermelhado (Figura 2) (FRISVAD *et al.*, 2004; VISAGIE *et al.*, 2014).

Figura 2 – (A) Características microscópica das estruturas de *Aspergillus ochraceopetaliformis*; (B) Características macroscópicas de *Aspergillus westerdijkiae* em CYA.



Fonte: Adaptado de Frisvad *et al.* (2004) e Visagie *et al.* (2014).

Aspergillus seção *Circumdati* foi revisada taxonomicamente por diversos autores nas últimas décadas (RAPER; FENNEL 1965; CHRISTENSEN; RAPER 1970; 1982; TUTHILL; CHRISTENSEN, 1986; FRISVAD; SAMSON 2000; PETERSON, 2000; VISAGIE *et al.*, 2014). Em 1965 os autores Raper e Fennell, inseriram nove espécies ao primário grupo *Aspergillus ochraceus*, incluindo *A. ochraceus*, *A. fresenii*, *A. alliaceus*, *A. sclerotiorum*, *A. auricomus*, *A. petrakii*, *A. melleus*, *A. elegans* e *A. ostianus*. Posteriormente, as espécies *A. robustus*, *A. campestris* e *A. bridgeri* foram inseridas por Christensen e Raper (1970; 1982). *A. dimorphicus*, *A. insulicola*, *A. lanosus* e *A. ochraceoroseus* foram indicadas por Samson (1979), seguida de *A. sepultus* (TUTHILL; CHRISTENSEN, 1986), *Neopetromyces muricatus* (FRISVAD; SAMSON 2000) e *A. persii* (ZOTTI; CORTE, 2002).

Com base no estudo de Peterson (2000), e também com suporte de Frisvad e Samson (2000), as espécies *Petromyces alliaceus*, *P. albertensis* e *A. lanosus*, previamente inseridas nesta seção, foram realocadas para a seção *Flavi*. As espécies *A. campestris*, *A. dimorphicus* e *A. sepultus* também foram transferidas para outra seção (PETERSON, 1995, 2000; RAHBAEK; BEINHOLT, 1999; FRISVAD; SAMSON,

2000; RAHBAEK *et al.*, 2000; VARGA *et al.*, 2000). Frisvad e colaboradores (2004) introduziram sete novas espécies à seção *Circumdati*, sendo estas *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. neobridgeri*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. steynii*, e *A. westerdijkiae*).

Dentre os principais marcadores moleculares para fungos, destacam-se os *loci* ITS1 e ITS2 (*Internal transcribed spacer*) ou Espaços Internos Transcritos do DNA nuclear ribossomal (*barcode* para fungos), parte do gene que codifica a β -tubulina (*BenA*), parte do gene que codifica para calmodulina (*CaM*), sequência codificantes da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*), fator de alongamento da tradução (*TEF/tef-1 α*) e a actina (*act1*), estes dois últimos utilizados com menor frequência em *Aspergillus* (VARGA *et al.*, 2011; SAMSON *et al.*, 2014). Em 2012, com base na análise dos loci *ITS*, *BenA* e *CaM*, Davolos e colaboradores indicaram a espécie *Aspergillus affinis* à seção *Circumdati*.

Visagie *et al.* (2014) reorganizaram a taxonomia de *Aspergillus* seção *Circumdati* propondo mudanças significativas. Estes autores empregaram dados macro e micro-morfológicos, perfil de metabólitos secundários e sequências dos genes calmodulina, beta-tubulina e região ITS em suas análises. Na revisão do referido autor, 27 espécies distribuídas em sete clados (baseados na relação filogenética e também produção de metabólitos secundários) foram aceitas. Dentro deste contexto, sete novas espécies foram adicionadas à seção, incluindo *A. occultus*, *A. pallidofulvus*, *A. pulvericola*, *A. salwaensis*, *A. sesamicola*, *A. subramanianii* e *A. westlandensis*. A espécie *A. sulphureus* (*nom. illeg.*) foi renomeada para *A. fresenii*, além disso, a espécie *A. flocculos* foi considerada sinonímia com *A. ochraceopetaliformis*, enquanto *A. onikii* e *A. petrakii* foram consideradas coespécies de *A. ochraceus*. Sendo os clados; *A. fresenii*, *A. ochraceopetaliformis*, *A. auricomus*, *A. muricatus*, *A. robustus*, *A. affinis* e clado *A. ochraceus*.

Houbraken *et al.* (2020), além de incluírem novos grupos taxonômicos ao gênero *Aspergillus*, separaram a seção *Circumdati* em três séries: *Circumdati*, *Sclerotiorum* e *Steyniorum*. Com as espécies *Aspergillus affinis*, *A. auricomus*, *A. cretensis*, *A. melleus*, *A. muricatus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. pallidofulvus*, *A. sesamicola*, *A. westerdijkiae* e *A. westlandensis* pertencentes a série *Circumdati*. A série *Sclerotiorum* abrigando as espécies *Aspergillus bridgeri*, *A. fresenii*, *A. neobridgeri*, *A. persii*, *A. pseudosclerotiorum*, *A. roseoglobulosus*, *A. salwaensis*, *A.*

sclerotiorum e *A. subramanianii*, e por último, a série *Steyniorum* abrigando as espécies *A. elegans*, *A. insulicola*, *A. occultus*, *A. ochraceopetaliformis*, *A. pseudoelegans*, *A. pulvericola* e *A. steynii*. A produção de metabolitos é similar entre as séries, com ocratoxina A sendo produzida em todas as três. As três séries, foram propostas com base em análises filogenéticas de múltiplos genes, e a espécie *A. robustus* clado *A. robustus* (VISAGIE *et al.*, 2014) composta somente por esta espécie foi elevada a nível de seção filogeneticamente irmã da seção *Tanneroum* e *Circumdati*.

Como já se pode notar, a seção *Circumdati* vem sofrendo constantes modificações taxonômicas ao longo do tempo. Mesmo com o emprego de dados moleculares, muitas dúvidas ainda permanecem e muitos trabalhos podem ter pautado a estruturação taxonômica utilizando *loci* pouco informativos, insuficientes para identificar o limite das referidas espécies ou *loci* pouco estabelecidos para análises taxonômicas. Na tentativa de evitar subjetividade na delimitação de espécies fúngicas, recomenda-se buscar concordância genealógica de mais de um gene, pois a análise de múltiplos *loci* permite uma construção mais fidedigna de linhas evolutivas e do processo de especiação (AVISE; BALL 1990 *apud* TAYLOR *et al.*, 2000).

A escolha do loco a ser analisado um fator crítico para estudos taxonômicos e filogenéticos. Deste modo, a região do genoma escolhida deve ser de fácil amplificação, possuir variação suficiente entre as espécies, e ser conservada entre indivíduos de uma mesma espécie e, no caso de identificação molecular, permitir o desenvolvimento de *primers* espécie-específico (MASSI, 2018).

Embora os estudos utilizando a região ITS têm fornecido dados fundamentais para diversidade e filogenia de fungos (SCHOCH *et al.*, 2012), esse marcador não possui variação suficiente para distinguir todas as espécies da seção *Circumdati*. Apenas 18 espécies da seção *Circumdati* podem ser identificadas por ITS, deixando assim, nove espécies sem identificação por este marcador (VISAGE *et al.*, 2014). Esse é um dos motivos pelos quais o uso de marcadores alternativos faz-se necessário. Para *Aspergillus* seção *Circumdati*, apenas os genes *CaM* e *BenA* vêm sendo utilizados como marcadores alternativos para a descrição e/ou identificação de espécies, pois os repositórios de sequências de outros genes ainda precisam expandir substancialmente para esse grupo de fungos. Os genes *CaM* e *BenA* são fáceis de serem amplificados e sequenciados e possuem variações para distinguir grande parte

das espécies. Apesar de algumas limitações e variações, estes marcadores possuem banco de dados bem estabelecido e polimorfismo dentro e entre as espécies, o uso desses em conjunto fornece dados importantes para o processo de identificação de *A. seção Circumdati*.

Embora sequências do gene *RPB2* estejam sendo utilizadas na reconstrução filogenética de vários fungos, o mesmo não acontece para *A. seção Circumdati*, provavelmente devido à dificuldade de amplificação e, conseqüentemente, da falta de sequências disponíveis em bancos de dados que permitam conhecer a diversidade intra e interespecífica da seção.

Considerando a importância econômica das espécies da seção *Circumdati*, a condução de uma análise filogenética por múltiplos *loci* é importante para permitir uma resolução taxonômica bem estabelecida, e para tanto é necessário ampliar os depósitos de sequências de *RPB2* dos fungos dessa seção nos bancos públicos de dados de sequências.

2.3 *Aspergillus* seção *Circumdati*: Ocratoxina A

Grande quantidade de espécies pertencentes a *Aspergillus* seção *Circumdati* são passíveis de produzir ocratoxinas, que por sua vez, têm sido encontradas em quantidade significativas em cultivares brasileiras, inferindo um importante *status* econômico a essa seção e evidenciando a necessidade de uma taxonomia bem estabelecida. A ocratoxina A (OTA) foi primariamente descrita por Van der Merwe *et al.* (1965) durante uma extensa triagem com o objetivo de encontrar novas micotoxinas. Esta foi então encontrada a partir do cultivo de *A. ochraceus*, atual seção *Circumdati* renomeada como *A. westerdijkiae*. Posteriormente, outras espécies dessa seção e do gênero *Aspergillus*, além de algumas do gênero *Penicillium* foram identificadas como produtoras dessa micotoxina (CIEGLER *et al.*, 1972; ABARCA *et al.*, 1994; HORIE, 1995).

Segundo Visagie *et al.* (2014), das 27 espécies descritas, 12 são produtoras de ocratoxina A, a saber: *A. affinis*, *A. cretensis*, *A. fresenii*, *A. muricatus*, *A. occultus*, *A. ochraceopetaliformis*, *A. ochraceus*, *A. pseudoelegans*, *A. pulvericola*, *A. roseoglobulosus*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae*. Além disso, via de nota, outras oito

espécies produzem OTA em menores quantidades ou inconsistentemente; *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. persii*, *A. salwaensis*, *A. sesamicola*, *A. subramanianii*, *A. sclerotiorum* e *A. westlandensis*. Além disso, a forte produção de ácido penicílico, xanthomegnina, viomellein e vioxantina também é conotada a algumas espécies (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais micotoxinas produzidas por fungos da seção *Circumdati* (++: Forte produção, +: Produção média, F: Produção fraca, —: Produção não detectada).

Espécies	MICOTOXINAS		
	Ocratoxina A	Ácido Penicílico	Xanthomegnin, viomellein, vioxantina
<i>A. Affinis</i>	+	++	—
<i>A. auricomus</i>	—	++	++
<i>A. bridgeri</i>	—	++	—
<i>A. cretensis</i>	+	++	—
<i>A. elegans</i>	—	—	++
<i>A. fresenii</i>	+	—	+
<i>A. insulicola</i>	—	++	++
<i>A. melleus</i>	F	++	++
<i>A. muricatus</i>	+	++	++
<i>A. neobridgeri</i>	—	++	++
<i>A. occultus</i>	++	++	—
<i>A. ochraceopetaliformis</i>	—	++	++
<i>A. ochraceopetaliformis</i> (<i>A. flocculosus</i>)	+	++	++
<i>A. ochraceus</i>	+	++	++
<i>A. ostianus</i>	F/—	++	++
<i>A. pallidofulvus</i>	—	++	++
<i>A. persii</i>	F/—	++	++
<i>A. pseudoelegans</i>	+	—	—
<i>A. pulvericola</i>	++	+	+
<i>A. roseoglobulosus</i>	++	++	++

Tabela 1 - Continuação

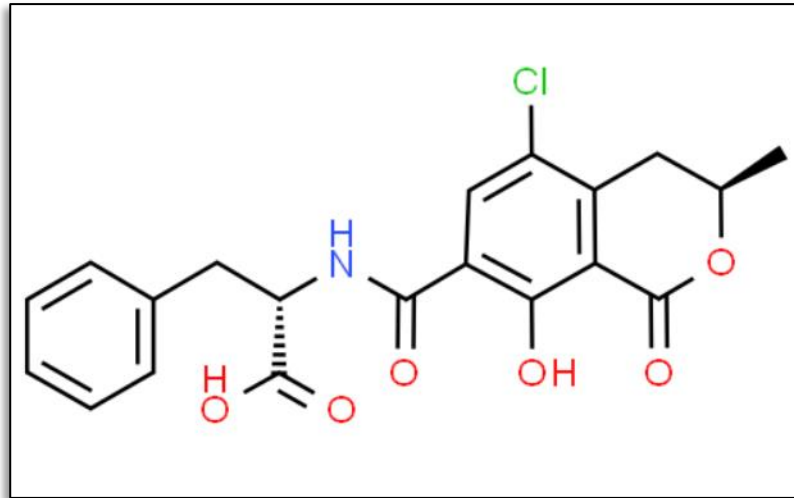
Espécies	MICOTOXINAS		
	Ocratoxina A	Ácido Penicílico	Xanthomegnin, viomellein, vioxantina
<i>A. salwaensis</i>	F	+	—
<i>A. sclerotiorum</i>	F	+	+
<i>A. sesamicola</i>	F	—	++
<i>A. steynii</i>	++	—	++
<i>A. subramanianii</i>	F	+	—
<i>A. westerdijkiae</i>	++	++	++
<i>A. westlandense</i>	—	++	++

Fonte: Utilizou-se informações dos trabalhos de Frisvad *et al.* (2004) e Visagie *et al.* (2014).

Essa micotoxina tem sido relatada em diversos substratos, em níveis variáveis, principalmente em grãos de café (LEVI *et al.*, 1974, 1980; TSUBOUCHI *et al.*, 1985; TANIWAKI *et al.*, 2003; FRISVAD *et al.*, 2004; MAGNANI *et al.*, 2005; MATA *et al.*, 2007; MORELLO *et al.*, 2007; FUNGARO; SARTORI, 2009), mas também em frutas secas, milho, soja, feijão, amendoim, trigo, arroz, cereais, uvas, pimentas e outras especiarias (MIYAKI *et al.*, 1969; REFAI *et al.*, 1996; MACDONALD *et al.*, 1999; IAMANAKA *et al.*, 2005; GIL-SERNA *et al.*, 2011; VISAGIE *et al.*, 2014; JALILI, 2016; ALSHANNAQ; YU, 2017; PERRONE; GALLO, 2017; SILVA *et al.*, 2021).

O grupo de micotoxinas denominado “classe das ocratoxinas” é formado principalmente pelas ocratoxinas A, B e C. Sendo a ocratoxina A (OTA) o composto mais tóxico destas. A OTA (L-fenilalanina-N - [(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il) carbonil] - (R) - isocumarina) (Figura 3) é um metabólito de aproximadamente 403.813 Da (Daltons), com potencial nefrotóxico, imunotóxico, teratogênico, hepatotóxico (VARGA *et al.*, 2001; 2015; BENNETT; KLICH 2003) e possível carcinogênico para humanos (IARC, 1993).

Figura 3 – Estrutura química da Ocratoxina A (OTA) (C₂₀H₁₈ClNO₆)



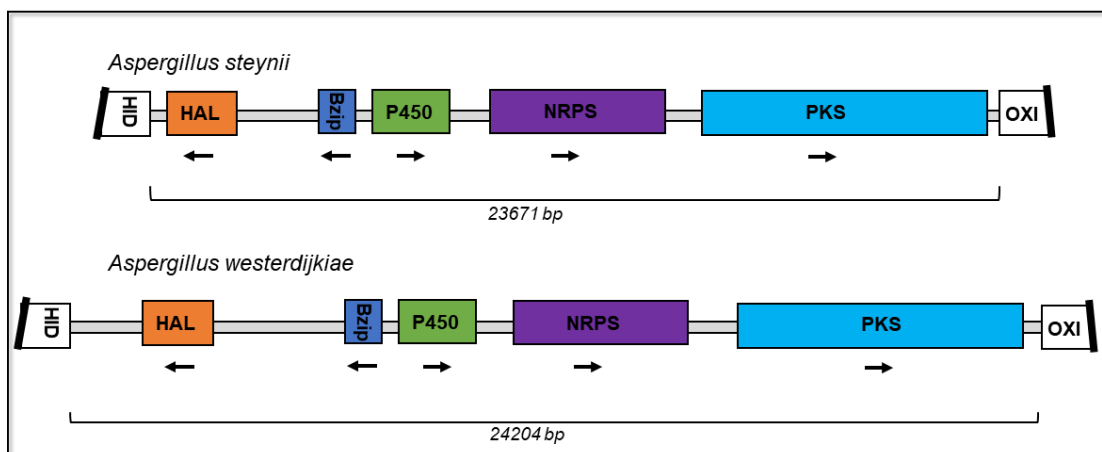
Fonte: Modificada pelo autor. Retirada de ChemSpider ID: 390954.

A OTA é uma molécula híbrida derivada de policetídeos, composta por uma di-hidroisocumarina clorada ligada a fenilalanina. Geralmente os genes envolvidos na biossíntese de micotoxinas estão localizados fisicamente próximos, em arranjos chamados de *cluster* gênicos. Suponha-se que o cluster de biossíntese da OTA por *Aspergillus* seja composto por um pequeno número de genes, que inclui a região codificadora de uma policetídeo sintetase (PKS), uma monoxigenase P450, uma peptídeo sintetase não-ribossômica, (NRPS), uma halogenase (HAL) e também um fator de transcrição bZIP (Figura 4) (BACHA *et al.*, 2009; GIL-SERNA *et al.*, 2018; 2020).

A exposição humana pode se dar devido ao consumo de alimentos contaminados com essa micotoxina e o efeito patológico pode estar associado ao lento processo de eliminação e efeito acumulativo dessa toxina pelo organismo quando consumida consecutivamente (HAGELBERG; HULT, 1989; HUSSEIN; BRASEL, 2001). O efeito nefrotóxico é a primeira manifestação nos organismos estudados (BENNETT; KLICH 2003), podendo causar nefropatias e estar associado ao câncer do trato urinário superior. Devido a sua estrutura, a ocratoxina A pode causar distúrbios na fisiologia celular de várias formas, mas parece que a via enzimática associada ao metabolismo da fenilalanina é a primeira afetada, ocasionando a inibição de inúmeras enzimas e processos que utilizam este

aminoácido. Também pode inibir a atividade da renal PEPCK e síntese proteica, além de estimular a peroxidação lipídica (MEISNER; MEISNER, 1981; RAHIMTULA *et al.*, 1988; ZANIC-GRUBISIC *et al.*, 2000; BENNETT; KLICH, 2003).

Figura 4- Esquema mostrando a ordem dos genes HAL, Bzip, P450, NRPS e PKS, o tamanho e a direção da transcrição do cluster gênico da via biossintética da ocratoxina A em *Aspergillus steynii* e *A. westerdijkiae*. A figura também mostra os genes flanqueando o cluster, em branco HID (alfa beta-hidrolase) e OXI (oxireductase).



Fonte: adaptado de GIL-SERNA *et al.*, (2018).

Baseado nos relatos de exposição humana, associado a dados toxicológicos referente a estudos com testes em animais e possíveis efeitos na saúde humana, diversos países inseriram limite máximos tolerados (LMT) para OTA em suas diretrizes de controle. A recomendação varia de acordo com o gênero alimentício. No Brasil, por exemplo, foi estipulado a LMT de: 10 µg/kg para cereais e produtos de cereais, feijão, café torrado e café solúvel, amêndoa de cacau, frutas secas e desidratadas; 2 µg/kg para vinho e seus derivados, incluindo suco de uva e polpa de uva e alimentos à base de cereais para alimentação infantil; 30 µg/kg para especiarias; 5,0 µg/kg para produtos de cacau e chocolate (BRASIL, 2017). O controle de micotoxinas em alimentos depende da análise de uma série de fatores, e deve ser feito durante os diversos estágios da produção alimentar, considerando as particularidades de cada substrato.

2.4 *Aspergillus* seção *Circumdati* em cultivares brasileiras: café, pimenta-preta e erva-mate

A partir da descoberta de que grande parte das espécies pertencentes a *A. seção Circumdati* são capazes de produzir micotoxinas, ressaltando a OTA (FRISVAD *et al.*, 2004; VISAGE *et al.*, 2014), a ocorrência desses fungos em produtos destinados a alimentação humana se tornou objeto de estudo e preocupação de diversas instituições e empresas. Essa preocupação está alinhada ao fato de que a presença dessas micotoxinas, em níveis acima do limite máximo permitido, podem gerar impactos financeiros por atrapalhar a logística de vendas, gerar quebras contratuais, embargos durante negociações e despesas com procedimentos de controle e segurança (IAMANAKA *et al.*, 2010).

Com os avanços das técnicas de Biologia Molecular, a identificação de isolados fúngicos se tornou mais acurada e precisa, possibilitando uma maior compreensão dos contaminantes responsáveis pela incidência de micotoxinas em produtos agrícolas. Deste modo, aplicar esse conhecimento para entender a diversidade de espécies fúngicas e como estas interagem com os produtos da agricultura é fundamental para prevenir perdas financeiras e evitar riscos à saúde humana e de animais.

De certa forma, a incidência de fungos ocratoxigênicos pertencentes a seção *Circumdati* em importantes culturas, tem sido relatada em diversos estudos realizados com grãos de café verde, frutas secas, alho, uvas, pimenta-preta, páprica, feijão, erva-mate e cevada (URBANO *et al.*, 2001; FUNGARO *et al.*, 2004; IAMANAKA *et al.*, 2005; MAGNANI *et al.*, 2005; DÍAZ *et al.*, 2009; MATEO *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011; TANIWAKI *et al.*, 2014; VANZELA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2021).

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, seu consumo praticamente dobrou nos últimos 50 anos. O Brasil, de modo particular, destaca-se como importante produtor, consumidor e exportador desta bebida. Apenas em 2019/20, brasileiros consumiram em torno 1,3 milhões de toneladas de café (Fairtrade Foundation, 2021), evidenciando a importância econômica dessa *commoditie* para o país. As duas espécies de café mais cultivadas no mundo são *Coffea arabica* (Arábica)

e *Coffea canephora* (Robusta). As principais diferenças estão pautadas em termos organolépticos, na qual o café arábica é reconhecido pelos consumidores por possuir melhor qualidade de sabor e acidez, enquanto o café robusta possui maior amargor, aroma mais intenso e maior nível de cafeína (PERROIS *et al.*, 2015).

Em países tropicais, fungos do gênero *Aspergillus* têm sido considerado os principais responsáveis pela incidência de OTA em café (TANIWAKI *et al.*, 2003). Nas últimas décadas, vários estudos têm procurado identificar as principais espécies responsáveis pela incidência da OTA em grãos de café, das quais a presença de fungos da seção *Circumdati*, consecutivamente a capacidade de produção de OTA dos isolados têm se destacado nos relatos (URBANO *et al.*, 2001; TANIWAKI *et al.*, 2003; BATISTA *et al.*, 2003; MAGNANI *et al.*, 2005; VILELA *et al.*, 2010; REZENDE *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013; TANIWAKI *et al.*, 2014; VIEGAS *et al.*, 2017; BARCELO *et al.*, 2017).

Considerando os *Aspergillus* da seção *Circumdati*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii* e *A. ochraceus* são as espécies que mais contribuem para produção de OTA na seção *Circumdati* (FRISVAD *et al.*, 2004; VISAGIE *et al.*, 2014; PERRONE; GALLO, 2016). Neste contexto, também é relevante mencionar que *A. ochraceus* foi indicado como maior responsável pela incidência de OTA em café por muitos estudos, porém após a subdivisão de *A. ochraceus* em *A. westerdijkiae* (FRISVAD *et al.*, 2004), muitos isolados previamente identificados como *A. ochraceus* hoje são identificados como *A. westerdijkiae* (MORELLO *et al.*, 2007). Novos estudos relatam que a produção de OTA por *A. ochraceus*, quando não ausente, é de forma inconsistente ou em baixo nível (GIL-SERNA *et al.*, 2018; 2020).

Outra cultura importante economicamente, principalmente para região sul do Brasil é a erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Segundo o IBGE (2020), a erva-mate representou um mercado que movimentou aproximadamente R\$: 576.805,00 com a produção atingindo cerca de 527.546 mil toneladas no ano de 2020. Essa bebida é consumida principalmente na forma de bebidas típicas como o “chimarrão”, “tererê” ou na forma de chá-mate (GUGLIUCCI, 1996). O processamento da erva-mate envolve várias etapas e durante o processamento algumas destas podem fornecer condições ideais para contaminação fúngica e consecutivamente, a presença desses podem diminuir a qualidade organolépticas do produto (SILVA, 2019). Ainda

não se sabe se esses fungos podem contaminar a erva-mate com OTA, é uma lacuna na literatura.

Existem poucos estudos que visam investigar a microbiota da erva-mate e a maioria se restringe a identificação morfológica dos fungos isolados, fornecendo pouca confiabilidade para identificação em nível de espécies (VIEIRA *et al.*, 2010). Alguns destes estudos identificaram a nível de gênero alguns membros de *Aspergillus* em amostras de erva-mate (BORGES *et al.*, 2002; BERNARDI *et al.*, 2005; PIMENTEL *et al.*, 2006). Por outro lado, Silva *et al.*, (2019) conseguiram chegar ao nível de espécies *Aspergillus* usando análises moleculares em amostras deste produto. Neste estudo apenas *A. pallidofulvus* da seção *Circumdati* foi identificada, porém a presença dessa espécie demanda atenção, uma vez que é produtora de ácido penicílico, xanthomegnin, viomellein e vioxantina e muitas espécies do mesmo clado são produtores de OTA (VISAGIE *et al.*, 2014).

A pimenta-preta (*Piper nigrum* L) é uma das espécies mais consumidas no mundo, seu cultivo ocorre principalmente em países tropicais e semitropicais (SANTOS *et al.*, 2011), sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial com a produção atingindo o marco de 40.000 toneladas por ano, com 85% dessa produção sendo para a exportação (agrospice.com.br/ver-produto.asp?cod=50). Em 2011 a ANVISA estabeleceu Limite Máximo Tolerado (LMT) de 30 µg/kg para OTA em pimentas. Contudo, poucos estudos em solo nacional se propuseram a analisar a incidência de micotoxinas e contaminação por espécies toxigênicas em pimenta-preta, e quando realizados também pautaram apenas na identificação morfológica (FREIRE *et al.*, 2000; GATTI *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2018).

SILVA *et al.* (2021) investigaram a ocorrência de OTA em pimenta-preta e fizeram o uso de sequências de nucleotídeos de um loco (*CaM*) para auxiliar na identificação das espécies presentes. Em tal estudo, 1.212 isolados pertencentes a *Aspergillus* seção *Nigri* e *Aspergillus* seção *Circumdati* foram encontrados. Os membros da seção *Circumdati* foram encontrados em menor frequência, porém mostraram ocorrência significativa, principalmente em grãos não desinfetados, incluindo as espécies *A. pallidofulvus*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*.

Por fim, a presença de fungos *Aspergillus* seção *Circumdati* em culturas deve ser constantemente monitorada e investigada, para que seja possível zelar pela qualidade e práticas legais de comércio dos produtos agrícolas. A escassez de

estudos de caracterização da microbiota da erva-mate e pimenta-preta, em nível de espécie, é um fator limitante para compreender a influência e interação de fungos da seção *Circumdati* com esses produtos. Apesar de diversos estudos desse cunho terem sido realizados no café, ainda residem dúvidas em nível de espécie dos principais fungos que contribuem para a contaminação com ocratoxina A nessa importante *commodities*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo a investigação a diversidade de espécies de uma coleção de *Aspergillus* seção *Circumdati*, isolados de grãos de café, erva-mate e pimenta-preta produzidos em diferentes regiões, baseando-se no concatenamento de sequências de nucleotídeos de parte dos genes que codificam para beta-tubulina (*BenA*) e calmodulina (*CaM*). Adicionalmente, foi objetivo deste trabalho sequenciar parte do gene *RPB2* (segunda maior subunidade da RNA polimerase II) dos isolados da coleção, visando ampliar a disponibilidade de sequências desse gene em banco de dados e analisar seu potencial para o estabelecimento de relações filogenéticas de *Aspergillus* seção *Circumdati*.

3.2 Objetivos Específicos

- Sequenciar parte dos genes *BenA* e *CaM* de uma coleção de isolados de *Aspergillus* seção *Circumdati* ($n=133$);
- Analisar as relações filogenéticas fazendo uso de sequências concatenadas dos genes *BenA* e *CaM*, com vistas à acurada identificação das espécies de *Aspergillus* seção *Circumdati* presentes em café, pimenta-preta e erva-mate, produzidos no Brasil;

- Selecionar um par de *primers* para amplificar uma porção do gene *RPB2* de isolados de *Aspergillus* seção *Circumdati* (especificamente do clado *A. ochraceus*) e analisar a diversidade genética das espécies mais frequentes;
- Disponibilizar as sequências parciais do gene *RPB2*, visando contribuir para a literatura mundial e para o entendimento do poder desse gene em suportar as relações filogenéticas de espécies pertencentes *A.* seção *Circumdati*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

As linhagens de *Aspergillus* seção *Circumdati* analisadas foram isoladas por pesquisadores do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) e da Universidade Estadual de Londrina (UEL), a partir de amostras de grãos de café (*Coffea arabica* e *Coffea robusta*), obtidas em quatro estados brasileiros, a saber, Minas Gerais, Espírito Santos, Bahia e São Paulo, correspondentes as safras de 2016 e 2017; amostras de pimenta-preta (*Piper nigrum* L.) obtidas a granel de lojas de especiarias e de marcas comerciais embaladas, nos estados de São Paulo, Maranhão e Rio Grande do Sul e; amostras comerciais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) obtidas no Rio Grande do Sul e Paraná. A Tabela 2 relaciona o número de isolados de cada substrato e seu estado proveniente.

Tabela 2 - Número de isolados de *Aspergillus* seção *Circumdati* de acordo com o substrato e a localidade proveniente.

Estado brasileiro		Substratos			
		Café arábica	Café robusta	Pimenta-preta	Erva-mate
São Paulo	(SP)	12	16	32	*
Minas Gerais	(MG)	43	*	*	*
Espirito Santos	(ES)	*	7	*	*

Tabela 2 – Continuação

Bahia	(BA)	*	2	*	*
Rio Grande do Sul	(RS)	*	*	2	2
Maranhão	(MA)	*	*	1	*
Paraná	(PR)	*	*	*	16
Total de isolados					133

Para identificação molecular (BLASTn e filogenia dos genes *BenA* e *CaM*) e posterior análise de variação do gene *RPB2*, foram selecionados 133 isolados previamente identificados como pertencentes a seção *Circumdati*.

4.2 Extração do DNA genômico

Para extração do DNA, os isolados foram cultivados a 25 °C em placas de Petri contendo o meio de cultura *Czapek Yeast Autolysate Agar* (CYA) (PITT, 1979) ou meio Ágar Batata Dextrose (BDA) (<https://microbiologyinfo.com/potato-dextrose-agar>) durante sete dias. A partir dessas culturas, utilizou-se uma alça para coletar conídios e inocula-los em tubos de ensaio contendo aproximadamente 5 mL de meio de cultura líquido. Os tubos foram incubados em estufa a 25 °C até se obter uma película de micélio (2 ou 3 dias). Após esse período, o micélio de cada isolado foi coletado para subsequente maceração em nitrogênio líquido. O material foi transferido para microtubos (2 mL), onde foram adicionados 800 µl de tampão de extração (Tris-HCl 1M, pH 8,0; EDTA 0,5 M, pH 8,0; NaCl 5 M; SDS 10%). Os componentes foram homogeneizados e incubados em banho maria a 65 °C durante 15 a 20 minutos. Posteriormente, 800 µl de fenol (Invitrogen®) foram adicionados ao microtubo, homogeneizado, e submetido a centrifugação a 12.000 r.p.m. por 15 minutos.

Após a centrifugação, a fase aquosa (superior) foi transferida para outro microtubo, e em seguida, 800 µl da mistura fenol (Invitrogen®), clorofórmio (Anidrol®) e álcool isoamílico (Vetec®) na proporção 25:24:1, respectivamente, foram adicionados. Novamente, foi realizada a homogeneização e centrifugação à 12.000 r.p.m por 15 minutos.

A fase aquosa foi transferida para outro microtubo, seguido da adição de 800 µl de clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 24:1, respectivamente. Repetiu-se a homogeneização e centrifugação sob as mesmas condições anteriormente citadas, e então, a fase aquosa resultante, foi transferida para outro microtubo e adicionado 1:10 do volume de NaCl 3 M e dois volumes de etanol absoluto gelado. Para a precipitação do DNA os tubos foram mantidos a - 20 °C por 60 minutos.

Após esse período, o material foi centrifugado à 12.000 r.p.m. por 5 minutos, e ao *pellet*, 300 µl de etanol 70% foram adicionados para lavagem, seguido de centrifugação a 12.000 r.p.m. por 5 minutos. Após secagem a 25 °C, o *pellet* foi ressuspenso em 100 µl de tampão TE (Tris-HCl 1 M pH 8,0; EDTA 0,5 M pH 8,0) e armazenado a - 20 °C.

4.3 Quantificação de DNA genômico

A quantificação do DNA extraído foi realizada a partir de eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) em tampão TBE 1x (108 g de Tris-base; 55 g de H₃BO₃; 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, 100 e 200 ng. O gel foi corado com Brometo de Etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz UV. A quantificação foi feita a partir da comparação da intensidade da fluorescência das bandas do DNA extraído em relação as amostras de DNA padrão (lambda DNA). Após a quantificação, todos os DNAs foram diluídos para uma concentração padrão de 10 ng/µL.

4.4 Amplificação e sequenciamento parcial dos genes *BenA*, *CaM* e *RPB2*

Para identificação dos isolados, foi realizada a amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de parte dos genes que codificam as proteínas beta-tubulina (*BenA*), e calmodulina (*CaM*), usando os *primers* Bt2a/Bt2b (GLASS e DONALDSON, 1995), cmd5/cmd6 (HONG et al., 2006), respectivamente. As condições de amplificação estão resumidas na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições de amplificação para o *loci CaM, BenA e RPB2*.

Programa Termociclador										
Primers	35 Ciclos									
	Temperatura / Tempo									
	Desnaturação inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão final	
cmd5/cmd6	94 °C	1min	94 °C	45 s	55 °C	45 s	72 °C	1 min	72 °C	5 min
Bt2a/Bt2b	95 °C	3 min	94 °C	45 s	55 °C	45 s	72 °C	1 min	72 °C	3 min
5Feur/7CReur	95 °C	3 min	95 °C	40 s	55 °C	40 s	72 °C	1,20 min	72 °C	5 min
RPB2 (este estudo)	95 °C	3 min	95 °C	40 s	58 °C	40 s	72 °C	1,20 min	72 °C	5 min
Reação de sequenciamento	96 °C	1 min	95 °C	20 s	50 °C	20 s	60 °C	1,30 min	60 °C	1,30 min
Produtos de amplificação	Reação da PCR – Volume final 25 µL					Reação de Sequenciamento – Volume final 10 µL				
Taq DNA polimerase	0,2 µL					----				
Tampão	2,5 µL					2 µL				
Primer	1 µL (cada primer)					1 µL (<i>forward</i> ou <i>reverse</i>)				
dNTP	2 µL					----				
MgCl ₂	1,5 µL					----				
DNA	1 µL					2 µL				
Água	15,8 µL					4 µL				
BigDye	----					1 µL				

Após o término da reação de amplificação, os produtos foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v).

No caso do gene da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*), parte da região codificante foi amplificada para quase todos os isolados usando os

primers 5Feur/7CReur descritos por HOUBRAKEN et al. (2012). Excepcionalmente, para *A. pallidofulvus*, a amplificação de *RPB2* não foi possível de ser realizada com os referidos *primers*, uma vez que gerou *amplicons* inespecíficos, tendo sido necessário o desenho de *primers* com menor grau de degeneração, para evitar inespecificidades. Para o desenho desses *primers* foi construído um alinhamento, utilizando o algoritmo ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994), de sequências de *A. seção Circumdati* (apenas clado *A. ochraceus*) disponíveis em banco de dados.

Os amplicons foram purificados utilizando Exosap-IT Express (ThermoFisher). Para isso, utilizou-se 5 µL do produto de reação e 1 µL do reagente Exosap-IT Express e incubação a 37 °C por oito minutos para degradação dos *primers* e nucleotídeos remanescentes, seguido de outro período de incubação a 80 °C por um minuto para inativação do reagente. As reações de sequenciamento foram realizadas para ambas as fitas da dupla hélice, utilizando o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA) as condições da reação podem ser observadas na Tabela 3.

Após o término da reação de sequenciamento foi realizada a precipitação do produto sequenciado. Inicialmente foram adicionados 2,5 µL de acetato de amônio e 30 µL de etanol absoluto. O material foi mantido à temperatura de – 20 °C por aproximadamente 45 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2200 r.p.m por 40 minutos. Ao tubo contendo o *pellet* resultante foram adicionados 150 µL de etanol 70% e submetido a centrifugação a 2200 rpm por 15 minutos, seguido de uma segunda adição do mesmo volume de etanol 70% e centrifugação por 10 minutos. Após a secagem do material em estufa a 42 °C por 25 minutos, o material foi ressuspendido em 10 µL de formamida e submetida ao sequenciador utilizando o equipamento SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

4.5 Análise de dados do sequenciamento

A qualidade das sequências foi analisada utilizando o software *BioEdit* v.7.1.3.0 (HALL, 1999), o qual também, foi utilizado para montar as sequências consenso. A identidade das sequências de cada um dos três *loci* (*BenA*, *CaM* e *RPB2*) foi

confirmada empregando a ferramenta *BLASTn* no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (ALTSCHUL *et al.*, 1990), e o alinhamento das sequências foi conduzido utilizando o algoritmo ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) no software BioEdit v.7.1.3.0.

Para a identificação molecular, sequências concatenadas dos genes *BenA* e *CaM* obtidas dos isolados foram organizadas em haplótipos utilizando o software DnaSP v.6 (ROZAS *et al.*, 2017). Para a identificação da posição taxonômica de cada um dos haplótipos, uma árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) foi reconstruída utilizando um representante de cada haplótipo, incluindo também sequências de *BenA* e *CaM* concatenadas dos holótipos/neótipos das espécies formalmente aceitas em *Aspergillus* seção *Circumdati* pela *International Commission of Penicillium and Aspergillus* (<https://www.aspergilluspenicillium.org/>). A reconstrução das árvores ML foi conduzida utilizando o melhor modelo evolutivo para cada um dos conjuntos de dados com base no critério AIC (*Akaike information*), no programa MEGA 7.0 (KUMAR *et al.*, 2016). Para determinar o suporte estatístico de cada ramo, as análises foram executadas com 1.000 réplicas (*bootstraps*).

4.6 Diversidade genética

As sequências parciais do gene *RPB2* também foram utilizadas para investigar a diversidade genética de *Aspergillus* seção *Circumdati*, fornecida pelas estimativas de diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π) e número de sítios polimórficos calculados no software DnaSP v.6 (ROZAS *et al.*, 2017).

4.7 Análises morfológicas

As análises morfológicas foram conduzidas de acordo com diretrizes propostas por Samson *et al.* (2014). Para observação macromorfológicas, foram selecionados um representante dos dois grupos filogenético revelado pela análise do gene *RPB2* o isolado ITAL 1337 e o ITAL 2853 e comparados também a um isolado da linhagem IBT *Culture Collection of Fungi* nomeado IBT32885, identificado como *A. pallidofulvus*

e gentilmente cedido por Dr. Jens Frisvad, Technical University of Denmark. Os isolados selecionados foram inoculados em três pontos no meio *Czapek Yeast Autolysate agar* (CYA), *Malt Extract Agar* (MEA), *Yeast Extract Sucrose Agar* (YESA) e *Dichloran Glicerol* (DG18) e incubados por sete dias à 25°C no escuro. Duas temperaturas adicionais, 37 °C e 42 °C, também foram utilizadas a fim de examinar os padrões de crescimento. Para análise micromorfológica (microscopia óptica), foram montadas lâmina com ácido láctico, a partir do meio MEA e CYA (sete dias à 25 °C). As microestruturas: vesícula, conidióforos, estipes, conídios, métulas e fiálides foram mensuradas utilizando o software AxioVision Release 4.8.2.

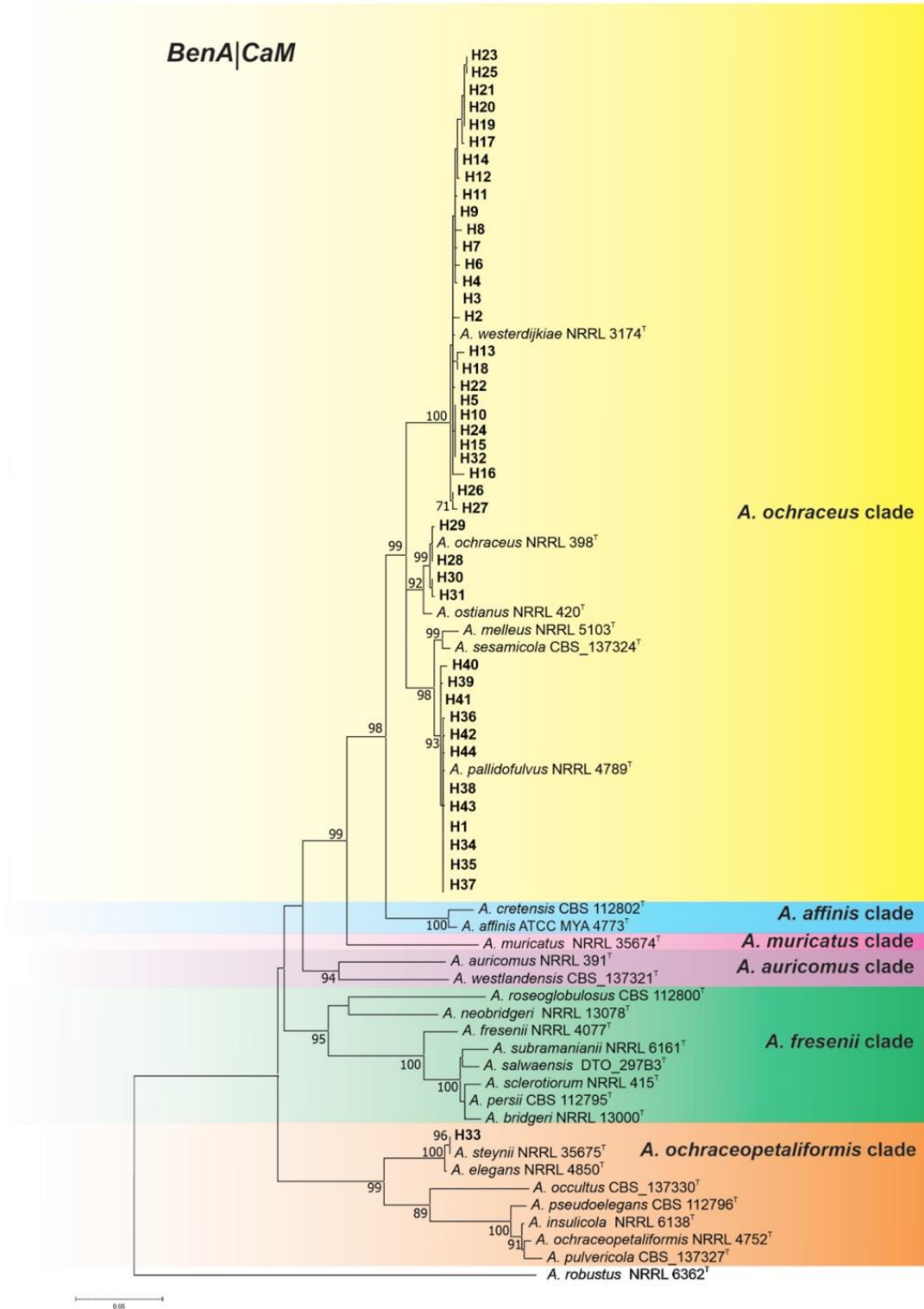
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diversidade de espécies de *Aspergillus* seção *Circumdati* isolados de amostras de grão de café, pimenta-preta e erva-mate.

Sequências dos genes *BenA* (425 pb) e *CaM* (435 pb) foram eficientemente obtidas para todos 133 isolados fúngicos analisados, resultando em uma matriz concatenada de 860 pb, a qual incluiu 132 sítios polimórficos e 121 sítios parcimoniosamente informativos. A análise do alinhamento concatenado revelou 44 haplótipos, distribuídos entre os sete estados de coleta, incluindo 32 únicos (*singletons*) e 12 com frequência variando de 2 a 43 vezes. O número de isolados por cada haplótipo encontrado, substrato e origem geográfica podem ser observados no Apêndice A.

A árvore filogenética reconstruída no presente estudo mostrou os haplótipos obtidos formando ramos bem suportados com as sequências das “cepas tipos” de *A. pallidofulvus*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii* e *A. ochraceus* (Figura 5).

Figura 5. Árvore filogenética de máxima verossimilhança de *Aspergillus* seção *Circumdati* a partir dos haplótipos (H) dos genes *BenA* e *CaM* concatenados. Apenas valores de *bootstrap* $\geq 70\%$ são exibidos. ^T sobrescrito = cepa tipo. *Aspergillus robustus* é o *outgroup*.



O haplótipo 1, cujo a sequência é idêntica à cepa tipo de *A. pallidofulvus* (NRRL 4789), foi o mais frequente (n=43) (Apêndice A). Esse haplótipo foi possui representantes isolados a partir de todos os substratos analisados e com distribuição geográfica em quase todos estados analisados, exceto Maranhão e Bahia. O haplótipo 11 (n= 13), identificado como *A. westerdijkiae*, foi o segundo mais frequente. Considerando a totalidade dos substratos, a espécie mais comum foi *A. pallidofulvus* (48,9%), seguida de *A. westerdijkiae* (45,86%). Enquanto isso, *A. ochraceus* (3,76%) e *A. steynii* (1,5%) foram raras (Tabela 5).

Tabela 4 – Números para as espécies de *Aspergillus* seção *Circumdati* molecularmente identificados nos isolados de amostras de grãos de café, pimenta-preta e erva-mate.

Substrato	<i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i>				Total
	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>A. pallidofulvus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. steynii</i>	
Café arábica	44 (80,0%)	10 (18,2%)	—	1 (1,8%)	55
Café robusta	13 (52,0%)	11 (44%)	—	1 (4,0%)	25
Pimenta-preta	4 (11,4%)	26 (74,3%)	5 (14,3%)	—	35
Erva-mate	—	18 (100%)	—	—	18
Total	61 (45,86%)	65 (48,9%)	5 (3,76%)	2 (1,5%)	133

A. pallidofulvus foi a única espécie encontrada em todos os substratos, sendo sua maior incidência em pimenta-preta e erva-mate (Tabela 5). *A. pallidofulvus*, juntamente com outras seis novas espécies, foi incluído na seção *Circumdati* por Visagie *et al.* (2014). Esses autores também examinaram o potencial toxigênico de *A. pallidofulvus* e, apesar dessa espécie estar inclusa no clado *A. ochraceus*, onde os demais representantes são produtores de OTA, *A. pallidofulvus* se demonstrou incapaz de produzir essa substância. Adicionalmente, SILVA *et al.* (2019) também confirmaram a incapacidade de *A. pallidofulvus* produzir OTA em meio de cultura. Contudo, há de se ressaltar, que o número de isolados analisados em ambos os estudos foi pequeno e a literatura ainda carece de mais informações.

A presença de *A. pallidofulvus* já foi relatada em amostras processadas de erva-mate comercial (SILVA *et al.*, 2019) e de chá escuro *Pu-erh*, uma bebida

tradicional chinesa, na qual a presença dessa espécie tem sido associada com melhorias organolépticas desse produto (ZHOU *et al.*, 2020). O uso da fermentação em estado sólido por *A. pallidofulvus* em chá Pu-erh pode auxiliar na biossíntese de ácido gálico e de vários flavonoides presentes no metabolismo de compostos fenólicos (MA *et al.*, 2021). *A. pallidofulvus* também foi relatado por Silva *et al.* (2021) em pimenta-preta amostrada no Brasil, encontrada em amostras clínicas humanas na Índia (MASIH *et al.*, 2016) e no Paquistão (SALAH *et al.*, 2019). Contudo, ainda há necessidade de estudos que busquem entender como essa espécie pode interagir químico-fisicamente com o substrato.

Dentre as espécies com potencial ocratoxigênico, *A. westerdijkiae* foi a espécie prevalente. Dos 61 isolados pertencentes a essa espécie, 72,13% foram provenientes de café arábica, 21,31% de café robusta e apenas 6,55% de pimenta-preta. *A. westerdijkiae* é uma espécie decorrente do desmembramento de *A. ochraceus*. Os primeiros indícios da necessidade de desmembramento dessas espécies foram revelados por Fungaro *et al.* (2004), quando estudaram fungos contaminantes de café e observaram dois grupos moleculares de *A. ochraceus*. Pautados em dados adicionais de fisiologia, morfologia e sequências do gene *BenA*, Frisvad *et al.* (2004) propuseram este desmembramento.

A. westerdijkiae tem sido isolado em vários países e substratos e tem se destacado por sua alta capacidade de produzir OTA, como por exemplo em amostras de café na Etiópia, onde foi constatada uma maior capacidade de produzir OTA do que os isolados de *A. ochraceus* (GEREMEW *et al.*, 2016), no café brasileiro (TANIWAKI *et al.*, 2014), em uvas obtidas de vinícolas no Chile (DÍAZ *et al.*, 2009), em pimenta-preta obtidas no Brasil (SILVA *et al.*, 2021), em páprica coletadas na Espanha (SANTOS *et al.*, 2011), em locais de maturação de queijos artesanais na Itália (ANELLI *et al.*, 2019), em amostras de ar e superfície em fábricas de fermentação de linguiça no Brasil (PARUSSOLO *et al.*, 2019) e em amostras de feijão coletadas no Brasil (SANTOS-CISCON *et al.*, 2019). Além disso, essa espécie também foi relatada em poeira residencial podendo estar ligada a problemas de saúde (MIKKOLA *et al.*, 2015). Deste modo, *A. westerdijkiae* tem se destacado como uma das principais preocupações relacionadas à contaminação de alimentos e bebidas com OTA, destacando principalmente o café (GIL-SERNA *et al.*, 2011; 2015; TANIWAKI *et al.*, 2014; PERRONE; GALLO, 2016).

A frequência de *A. ochraceus*, uma das espécies que mais preocupam quanto a produção de OTA, foi baixa (3,76%). Curiosamente uma alta incidência tem sido frequentemente relatada para essa espécie em amostras de grãos de café produzidos no Brasil (URBANO *et al.*, 2001; TANIWAKI *et al.*, 2003; BATISTA *et al.*, 2009; VILELA *et al.*, 2010; REZENDE *et al.*, 2013), incluindo também registros de contaminação de café na Filipinas e na Etiópia (BARCELO *et al.*, 2017). Apesar disto, nenhum dos isolados obtidos a partir de amostras de café no presente estudo foi identificado como *A. ochraceus sensu stricto*. Conforme já mencionado, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* possuem similaridade morfológica e eram considerados a mesma espécie até o ano de 2004. Apesar de vários relatos da literatura indicarem *A. ochraceus* como o principal culpado pela presença de OTA em café, vale salientar que muitos isolados primariamente identificados como *A. ochraceus* foram posteriormente reconhecidos como *A. westerdijkiae*. MORELLO *et al.* (2007), por exemplo, analisaram sequências do gene da beta-tubulina de vários isolados previamente reconhecidos como *A. ochraceus* em amostras de café, identificando que 84% destes eram *A. westerdijkiae*, incluindo 71% com capacidade de produzir OTA. De fato, atualmente tem sido consenso que identificar espécies da seção *Circumdati* baseando-se apenas critérios morfológicos e/ou no marcador ITS (barcode oficial de fungos) pode resultar em erros de identificação (VISAGE *et al.*, 2014; PERRONE; GALLO, 2016; DURAND *et al.*, 2018).

Todos os isolados identificados como *A. ochraceus* (n=5) no presente estudo ocorreram em pimenta-preta, englobando 14,3% dos isolados de *Aspergillus* seção *Circumdati* obtidos para esse substrato. Silva *et al.* (2021), em uma análise prévia de parte da sequência do gene *CaM*, já havia isolado e identificado *A. ochraceus* em amostras de pimenta-preta do Brasil, confirmando também a produção de OTA entre os isolados a partir de cromatografia em camada delgada (TLC). Além disso, *A. ochraceus* também foi identificado em amostras de algumas especiarias, canela e orégano, obtidas de supermercados brasileiros (GARCIA *et al.*, 2018). Na Índia, por sua vez, *A. ochraceus* foi isolado em amostras de pimenta chili, pimenta-preta e outras especiarias (JESWAL; KUMAR, 2015).

Apenas dois isolados aqui obtidos (1,5% do total de fungos analisados) foram identificados como *A. steynii*, ambos provenientes de amostras de café. Essa espécie foi inserida na seção *Circumdati* juntamente com *A. westerdijkiae* por Frisvad *et al.*

(2004), e ambas, de modo particular, têm recebido o título de maiores produtoras de OTA da seção, com a produção de *A. steynii* sendo superior à de *A. westerdijkiae* (GIL-SERNA *et al.*, 2011; 2020). Entretanto, *A. steynii* tem baixa ocorrência e infecta poucos substratos, tais como café (LEONG *et al.*, 2007; NOONIM *et al.*, 2008), páprica (SANTOS *et al.*, 2011) e cevada (MATEO *et al.*, 2011). Devido a sua alta capacidade de produzir OTA, *A. steynii*, assim como outras espécies da seção *Circumdati*, devem ser constantemente monitoradas quanto a presença em produtos destinados à alimentação humana e animal.

De modo geral, os dados aqui obtidos contribuem para entender a distribuição de espécies de *Aspergillus* seção *Circumdati* em substratos de importância econômica no Brasil, salientando que o monitoramento e estudo de diversidade de espécies fúngica devem ser feitos de forma constante, auxiliando assim as medidas de manejo para evitar a contaminação e produção de micotoxinas. O presente estudo também é o primeiro a empregar sequências gênicas *BenA* e *CaM* concatenadas na identificação de espécies de *Aspergillus* seção *Circumdati* em território brasileiro. Dados aqui gerados, também mostram que, no âmbito da seção *Circumdati*, *A. westerdijkiae* e *A. steynii* são as espécies que podem ser responsáveis pela incidência de OTA em café no Brasil. Além disso, o presente estudo relata pela primeira vez, a presença de *Aspergillus Pallidofulvus* em grãos do café brasileiro. Como já comentado, até o momento *A. pallidofulvus* é considerado não-produtor de OTA, porém é uma espécie sabidamente capaz de produzir uma micotoxina denominada ácido penicílico (VISAGE *et al.*, 2014; EZEKIEL *et al.*, 2020), o que chama a atenção, pois o ácido penicílico, embora mostre baixa toxicidade oral, tem efeito sinérgico aos efeitos da ocratoxina A (BIANCHINI; BULLERMAN, 2014).

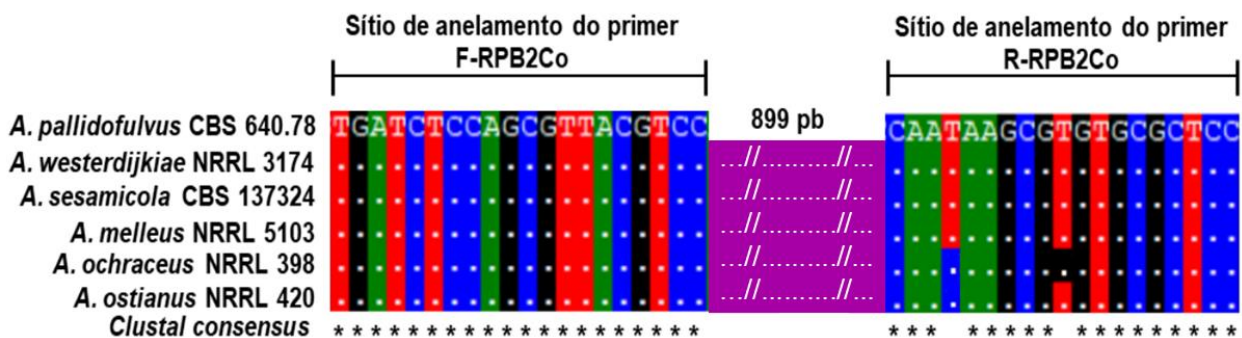
5.2. Diversidade do gene *RPB2*

Embora o gene que codifica a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*) tenha sido proposto como marcador secundário para vários grupos fúngicos, incluindo *Aspergillus* (VETROVSK *et al.*, 2016, RAJA *et al.*, 2017), o mesmo não tem sido utilizado para auxiliar na identificação das espécies pertencentes a *Aspergillus*

seção *Circumdati*. Há incompletude de informação de sequências de *RPB2* nos bancos públicos de sequências, ou seja, não há esse tipo de informação para todas as espécies da seção e poucas linhagens das diferentes espécies foram sequenciadas para esse marcador, o que impossibilita estudos indispensáveis para entender o poder desse gene em suportar as relações filogenéticas de espécies pertencentes à referida seção. A título de exemplo, somente duas linhagens de *A. pallidofulvus* têm sequência de *RBP2* disponível no NCBI (Número de acesso: MN969085 e FR732062, acesso em 10-04-2022).

Diante desse quadro, tornou-se relevante sequenciar parte do gene *RPB2* para todos os isolados fúngicos desse trabalho. Os primers degenerados sugeridos por HOUBRAKEN *et al.* (2012) permitiu amplificação específica e sequenciamento de todos os isolados brasileiros exceto para aqueles identificados como *A. pallidofulvus*. Os produtos de amplificação usando esses primers foram inespecíficos para *A. pallidofulvus* e, portanto, se fez necessário o desenvolvimento e avaliação de um par de *primer* para amplificar parte do gene *RPB2* dessa espécie. Para tanto, um alinhamento das poucas sequências do clado *A. ochraceus* disponíveis no NCBI (em 10/12/2022) foram usadas para a busca de regiões pouco polimórficas para ancorarem os primers. A Figura 6 mostra as regiões (distando 899 pares de bases) que permitiram a idealização dos primers F-RPB2Co (5`TGATCTCCAGCGTTACGTCCA3`) e R-RPB2Co (5`GGA GCG CAC (AC)CG CTT (AG)TTG3`) para a amplificação de fungos do clado *A. ochraceus*.

Figura 6. Alinhamento de sequências do gene *RPB2* para *A. seção Circumdati*, clado *A. ochraceus* sinalizando os sítios de ancoragem dos primers.

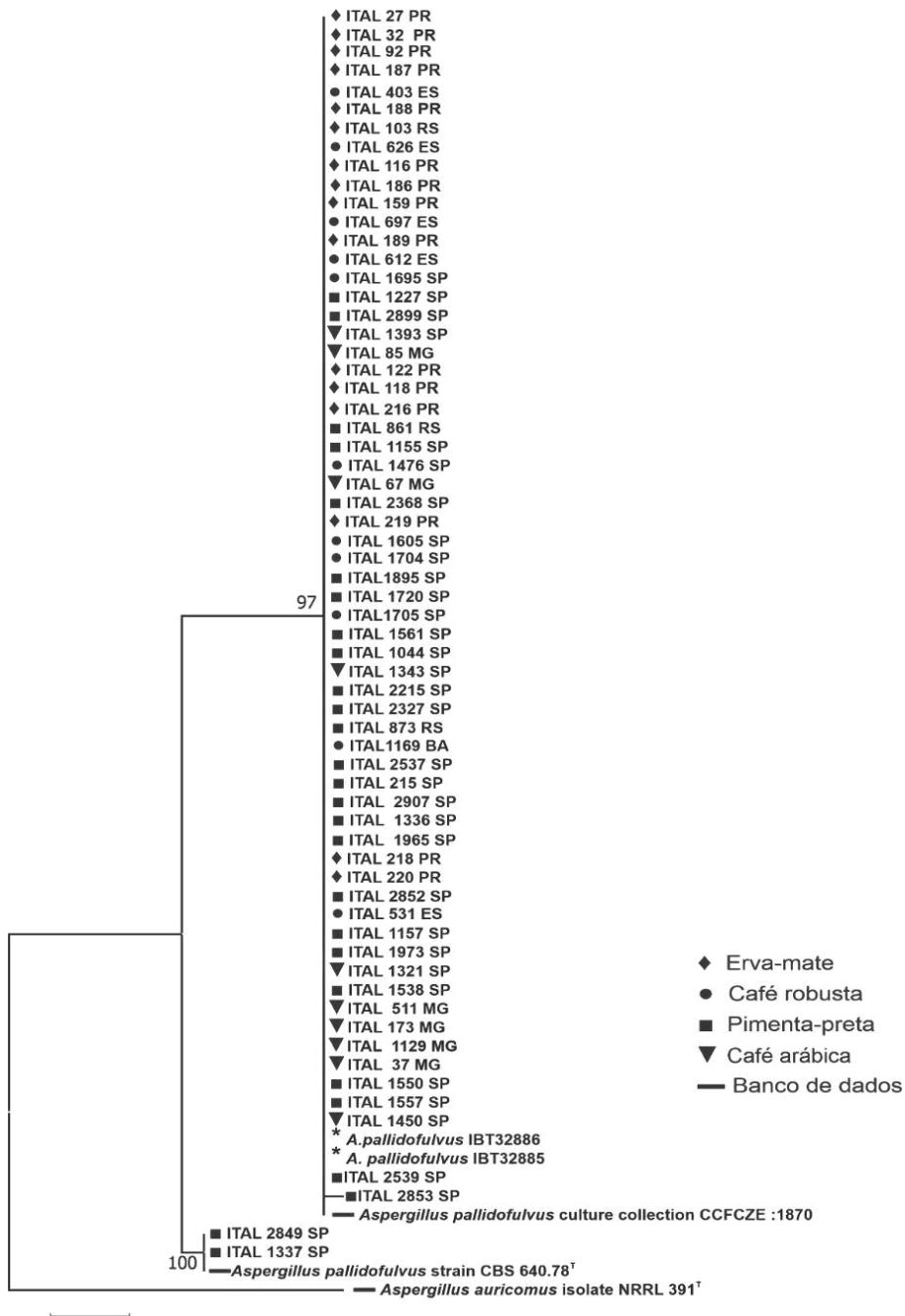


O uso do par de primer idealizados neste trabalho (F-RPB2Co e R-RPB2Co) permitiu amplificação específica e sequenciamento de todos os isolados de *A. pallidofulvus*.

A análise das sequências do gene *RPB2* por meio de BLASTn no NCBI revelou alta identidade com sequências depositadas no GenBank, identificando as espécies. *A. pallidofulvus* (n=65), *A. westerdijkiae* (n=61), *A. ochraceus* (n=5) e *A. steynii* (n=2) de modo concordante com a filogenia de *BenA/CaM*, sugerindo alto potencial para a estratégia do presente estudo (concatâmero de *BenA/CaM*) em estudos filogenéticos de *Aspergillus* seção *Circumdati*. Contudo, é necessário ressaltar que, dentre os 65 isolados reconhecidos como *A. pallidofulvus* a partir da filogenia do concatâmero de *BenA/CaM*, apenas dois isolados (ITAL 1337 e ITAL 2849) demonstraram 100% de identidade com a sequência de *RPB2* da “cepa tipo” de *A. pallidofulvus*, CBS 640.78, (Número de acesso no NCBI, MN969085) (HOUBRAKEN *et al.*, 2020). Enquanto isto, as sequências de *RPB2* dos demais isolados revelaram alta identidade (~100%) com *A. pallidofulvus* CCF<CZE 1870 (número de acesso no NCBI, FR732062). Curiosamente, o valor de identidade entre a “cepa tipo” *A. pallidofulvus*, CBS 640.78 e *A. pallidofulvus* CCF<CZE 1870 é de apenas 96,86% para os 688 nucleotídeos que se sobrepõem.

Os isolados ITAL 1337 e 2849 são provenientes da pimenta-preta no estado de São Paulo, entretanto, o isolado ITAL 1337 foi obtido de amostras a granel enquanto ITAL 2849 foi isolado em um produto comercializado em supermercado, em localidades diferentes. O grupo de isolados que apresentou alta identidade com *A. pallidofulvus* CCF<CZE 1870 possui representantes em todos os substratos analisados e de diferentes origens geográficas, ou seja, não possui distribuição restrita a substrato ou região (Figura 7).

Figura 7. Árvore filogenética de máxima verossimilhança demonstrando os grupos de *Aspergillus pallidofulvus* a partir das sequências do gene *RPB2*. *Aspergillus auricomus* é *outgroup*. Apenas valores de *bootstrap* >70% são exibidos. ^T = cepa tipo.



PR = Paraná; SP = São Paulo; RS = Rio Grande do Sul; BA = Bahia; MG = Minas Gerais; ES = Espírito Santo. * Amostras cedidas pelo Dr. Jens Frisvad, — Banco de dados da NCBI.

Atipicamente, um grande número de sítios polimórficos (23) foi observado entre os grupos de isolados iguais à “cepa tipo” de *A. pallidofulvus* CBS 640.78, e os isolados com alta identidade com *A. pallidofulvus* CCF<CZE 1870. Dentre os isolados

de cada um dos grupos, apenas um polimorfismo foi observado no grupo com alta identidade com *A. pallidofulvus* CCF<CZE 1870. A variação nas sequências entre os grupos está longe da esperada para incorporações erradas da Taq DNA polimerase. Todas as variações foram do tipo substituição e as sequências de aminoácidos preditos foram idênticas entre os grupos.

Um marcador ideal para identificação molecular e/ou para estudos filogenéticos deve ser homogêneo dentro da espécie, e a variação intraespecífica não pode exceder a variação interespecífica (HE *et al.*, 2017). Considerando o grande número de sequências de *A. pallidofulvus* e *A. westerdijkiae* geradas neste trabalho; e que os isolados analisados foram obtidos de quatro substratos distintos e de várias localidades do Brasil, que é um país continental, os dados gerados forneceram amparo para estimar a variação nucleotídica do gene *RPB2*. Dentre os 618 sítios de *RPB2* analisados, 24 foram polimórficos. Os isolados ITAL 1337 e ITAL 2849, foram os responsáveis por 23 (96%) dos sítios polimórficos, ou seja, apenas um dos sítios polimórficos foi resultante da análise das sequências dos demais isolados (62). Variações atípicas nas sequências de *RPB2* de *Aspergillus westerdijkiae* não foram observadas. De fato, o número de sítios polimórficos e a diversidade nucleotídica (π) de *A. pallidofulvus* foi muito superior à de *A. westerdijkiae* (Tabela 6).

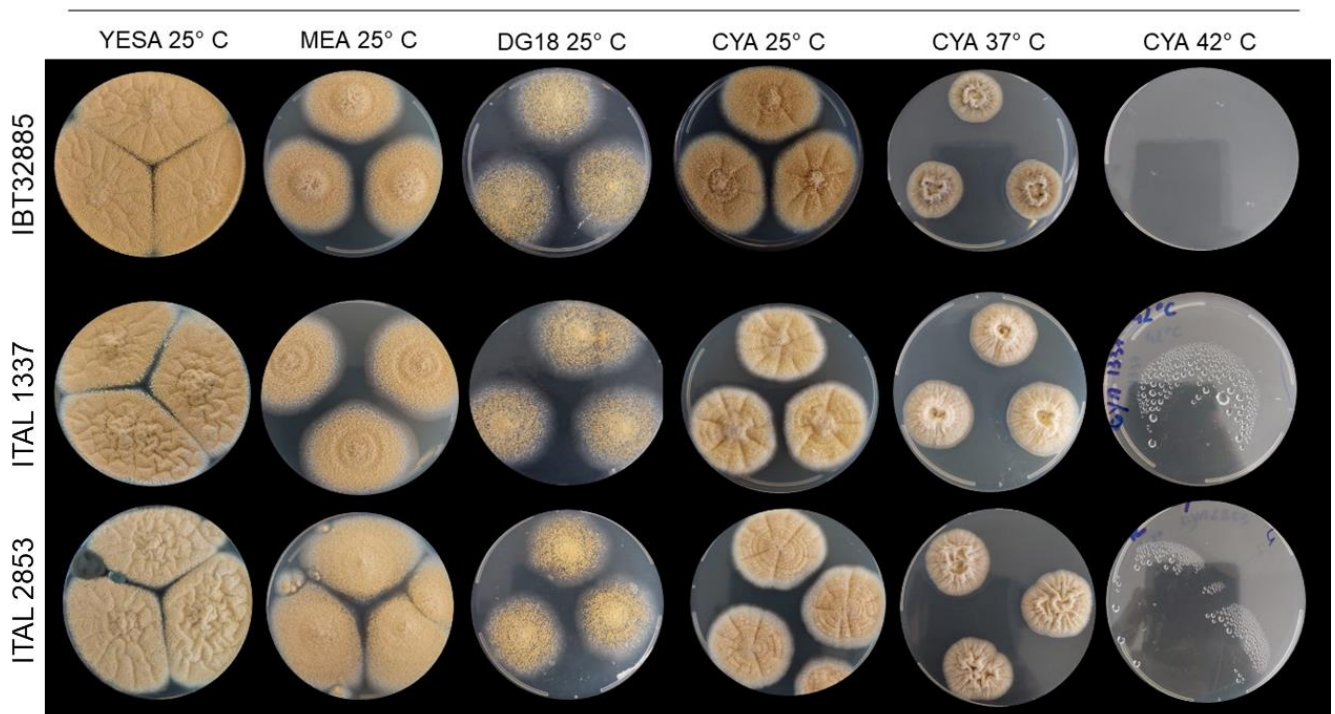
Tabela 5. Sítios polimórficos e diversidade nucleotídica (π) de sequências de *RPB2* de *A. pallidofulvus* e *A. westerdijkiae*.

Espécies	Nº de isolados	Nº de sítios	Nº de sítios polimórficos	Diversidade nucleotídica (π)
<i>A. pallidofulvus</i>	64	618	24 (3,88%)	0,00236
<i>A. westerdijkiae</i>	61	618	0 (0,00%)	0,00027

Assim como a maioria dos isolados de *A. pallidofulvus* no presente estudo, as duas linhagens de *A. pallidofulvus* (IBT32885 e IBT32886) do IBT *Culture Collection of Fungi*, aqui também sequenciada para o gene *RPB2*, mostraram maior identidade com *A. pallidofulvus* CCF<CZE 1870 depositada por Hubka em 2015. Estas linhagens, juntamente com as sequências de *RPB2* dos isolados do presente estudo e do NCBI, destacaram dois grupos bem suportados pelas estatísticas *bootstrap* na árvore filogenética (Figura 7). A partir disso, uma análise de macro e micromorfologia

comparativa foi conduzida incluindo um isolado brasileiro de cada um destes grupos (ITAL 1337 e ITAL 2853) e um isolado da coleção IBT (IBT32885). Contudo, esta análise não mostrou nenhuma variação morfológica suficiente para caracterizar os isolados de cada grupo como espécies distintas. A coloração, por exemplo, foi semelhante entre as colônias, incluindo singela variação entre amarelo pálido a opaco e uma tonalidade ocre em CYA 37 °C (Figura 8), o reverso apresentou uma variação de amarelo claro a amarelo escuro.

FIGURA 8 – Comparação de crescimento dos isolados de *Aspergillus pallidofulvus* em YESA, MEA, DG18 e CYA a 25° C e CYA a 37 °C e 42°C.



A presença de exodatos foi restrita ao meio CYA 25 °C, estes quando presentes expressaram coloração amarela ou transparente. Esclerócios, quando encontrados foram na cor amarela ou transparente, esses padrões também foram observados no trabalho de descrição da espécie *A. pallidofulvus* (VISAGIE *et al.*, 2014) (Tabela 7).

Tabela 6 – Principais características macromorfológicas de isolados representantes dos dois grupos filogenéticos de *RPB2* obtidas após 7 dias de cultura em CYA (25 °C e 37 °C), MEA, YESA e DG18 à 25 °C. O diâmetro está expresso pela média do tamanho das três colônias do mesmo isolado.

MACROMORFOLOGIA						
	Cor da colônia	Reverso	Exudatos	Esporulação	Esclerócios	Diâmetro da colônia (mm)
IBT32885						
MEA 25 °C	Amarelo	Amarelo	Ausente	Alta	Ausente	45
CYA 25 °C	Amarelo	Amarelo	Ausente	Alta	Ausente	50
YESA25 °C	Amarelo	Amarelo	Ausente	Alta	Ausente	70
CYA 37 °C	Ocre	Amarelo Escuro	Ausente	Baixa	Ausente	25
DG18 25 °C	Amarelo	Amarelo	Ausente	Média	Ausente	45
ITAL 1337						
MEA 25 °C	Amarelo	Amarelo	Ausente	Alta	Ausente	45
CYA 25 °C	Amarelo	Amarelo	Presente	Alta	Presente	40
YESA 25 °C	Amarelo	Amarelo	Ausente	Alta	Ausente	66,6
CYA 37 °C	Ocre	Ocre	Ausente	Baixa	Ausente	29
DG18 25 °C	Amarelo	Amarelo	Ausente	Média	Ausente	38,3
ITAL 2853						
MEA 25 °C	Amarelo	Amarelo	Ausente	Alta	Ausente	55
CYA 25 °C	Amarelo	Amarelo Escuro	Presente	Média	Presente	35
YESA25 °C	Amarelo	Amarelo Escuro	Ausente	Alta	Presente	60
CYA 37 °C	Ocre	Amarelo Escuro	Ausente	Baixa	Ausente	29
DG18 25 °C	Amarelo	Amarelo Escuro	Presente	Média	Presente	35

Quanto à micromorfologia, os isolados mostraram conidióforos bisseriado com fiáides (5,75 –10,05 µm) e métula (8,67 – 15,97 µm) cobrindo toda a vesícula. A

vesícula (20,09 – 37,31 µm) possui formato globoso, com estipes cilíndricas e lisa, os conídios (1,66 – 3,83 µm) globosos com parede lisa, esclerócitos, quando presentes, possuem cor transparente ao amarelo. Nenhuma variação morfológica encontrada entre os isolados é suficiente para caracterizá-los como espécies distintas.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, há três hipóteses que precisam ser investigadas em trabalhos futuros:

1) Seria um erro de depósito de sequências das cepas *A. pallidofulvus* CCF<CZE 1870 (número de acesso no NCBI, FR732062) ou *A. pallidofulvus*, CBS 640.78, (Número de acesso no NCBI, MN969085), e, portanto, haveria a necessidade de correção para evitar a perpetuação de erro?

2) seriam espécies distintas que não expressam variação fenotípica e divergência para os genes *BenA* e *CaM*;

3) as sequências de *RPB2* seriam provenientes de genes parálogos? Este gene é encontrado em todos os eucariotos e, na maioria dos organismos, é de cópia única. Contudo alguns trabalhos mostram claramente a ocorrência de parálogos em algumas plantas (OXELMAN; BREMER, 2000).

He *et al.* (2017) relataram que o gene *RPB2* em *Pleorotus* também tem alta variação intraespecífica e intra-isolados (quando sequenciaram produtos de PCR clonados) e não recomendam o uso de *RPB2* para *barcoding* de *Pleorotus* spp. Esses autores também ressaltam a necessidade de mais estudos da variação intraespecífica de *RPB2* em outros grupos fúngicos a fim de evitar que essas variações sejam interpretadas como novas *taxa*. Assim, no cenário atual, não recomendamos o uso de *RPB2*, isoladamente ou concatenado com outros genes, para estudos filogenéticos de *A. seção Circumdati*. As sequências de nucleotídeos (*RPB2*) obtidas e analisadas neste trabalho foram depositadas no GenBank/ NCBI (Apêndice B).

6. CONCLUSÕES FINAIS

Considerando que os isolados obtidos a partir dos grãos de café são provenientes de estados que abrigam a maior produção nacional desse grão, os resultados obtidos quanto a incidência, relacionado ao conhecimento da literatura científica do potencial ocratoxigênicos de *A. westerdijkiae*, reforçam a ideia de que este fungo seja um dos principais contribuintes para a incidência de ocratoxina A no café brasileiro. Apesar da baixa incidência, a presença dos fungos com potencial ocratoxigênico (*A. westerdijkiae* e *A. ochraceus*) isolados em amostras comerciais de pimenta-preta (pronta para uso direto do consumidor), associado ao extenso uso desse tempero, indica que esse substrato também pode ser um veículo de contaminação com ocratoxina A. Por fim, nenhum fungo com potencial ocratoxigênico da seção *Circumdati* foi observado na erva-mate, entretanto não se sabe ao certo como a incidência de *A. pallidofulvus* interage com esse substrato.

Embora a identificação usando sequências do gene *RBP2* de *A. pallidofulvus*, via BLASNTn, tenha mostrado alta identidade com as sequências depositadas no GenBank, em concordância com a identificação dos genes *BenA* e *CaM*, uma organização filogenética discrepante foi obtida para as espécies da seção *Circumdati* a partir de *RBP2*. Levando em consideração que a análise morfológica não se demonstrou resolutive à expressão filogenética, e que o loci *RBP2* pouco tem sido utilizado como marcador secundário, em contraste com *BenA* e *CaM*, os resultados culminam, por hora, na não recomendação do uso deste gene para filogenia desta seção, sendo necessário dados mais robustos para verificar seu potencial filogenético.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M.L; BRAGULAT, M.R; SASTELLA, G; CABANES, F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. niger. **Applied and Environmental Microbiology**. v.60, p.2650-2652, 1994.
- ALDHEBIANI, A.Y. Species concept and speciation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 3, p. 437–440, 2018.
- ALSHANNAQ, A; YU, J. Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. **Environmental Research and Public Health**. 2017.
- ALTSCHUL, S.F; GISH, W; MILLER, W; MYERS, E.W; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v.215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- ANAGNOSTOPOULOS, D. A; TSALTAS, D. Fermented Foods and Beverages. In: GALANAKIS, C.M. **Innovations in Traditional Foods**. Elsevier, p. 257 – 291, 2019.
- ANELLI, P; HAIDUKOWSKI, M; EPIFANI, F; CIMMARUSTI, M.T; MORETTI, A; LOGRIECO, A; SUSCA, A. Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan cave cheese. **Food Microbiology**, v. 78, p. 62-72, 2019.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2011). Resolução ao da Diretoria Colegiada nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, DF: Diário Oficial da União, n. 37, seção 1, 22 de fevereiro de 2011. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.df Acesso em 6 de nov. 2021.
- ASHU, E; FORYTHER, A; VOGAN, A.A; XU, J. Filamentous fungi in fermented foods. In: MONTET, D; RAY, R.C. **Fermented Foods. Part 1: Biochemistry and Biotechnology**. CRC Press, p.45- 76, 2016.
- AVISE, J.C; BALL, J. R.M. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. **Oxford Surveys in Evolutionary Biology**, v. 7, p. 45-67, 1990.
- AZEVEDO, A.C.S; FURLANETO, M.C; SOSA-GÓMEZ, D.R; FUNGARO, M.H.P. Molecular Characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Isolates. **Scientia Agricola**. v.57, n.4, p. 729-732, 2000.
- BACHA, N; ATOUI, A; MATHIEU, F; LIBOZ, T; LEBRIHI, A. *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene “aoks1” is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. **Fungal Genetics and Biology**. n. 46, p.77–84, 2009.
- BARCELO, J.M; BARCELO, R.C; ALVAREZ, A.A. Ochratoxin A, Fungal contamination and antioxidante property of defective *Arabica coffee* in Benguet, Philippines. **Emirates Journal of Food and Agriculture**. n.29, p. 10-17, 2017.

- BATISTA, L.R; CHALFOUN, S.M; PRADO, G; SCHWAN, R.F; WHEALS, A.E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*coffea arabica* L.) **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 293-300, 2003.
- BATISTA, L.R; CHALFOUN, S.M; SILVA, C.F; CIRILLO, M; VARGA, E.A; SCHWAN, R.F. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food control**. v.9, p. 784-790, 2009.
- BEHERA, B.C. Citric acid from *Aspergillus niger*: a comprehensive overview. **Critical Review in Microbiology**. v. 46, p. 727-749, 2020.
- BENNET, J.W; KLICH, M. Mycotoxins. **American Society for Microbiology**, 2003.
- BERNARDI, E; CALDEIRA, M.F; NASCIMENTO, J.S. Identificação de fungos filamentosos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil.). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n. 4, p. 489-493, 2005.
- BIANCHINI, A; BULLERMAN, L. B. Classification. *In*: BATT, C. A; TORTORELLO, M. **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2. ed. Londres: Elsevier, 2014. p. 854 – 863.
- BORGES, L.R; PIMENTEL, I.C; BEUX, M.R; TALAMINI, A. Contagem de fungos no controle de qualidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil) e isolamento de gêneros potencialmente micotoxigênicos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**.v. 20, n. 1, p. 103-110, 2002.
- BRASCH, J; VARGA, J; JENSEN, J.M; EGBERTS, F; TINTELNOT, K. Nail infection by *Aspergillus ochraceopetaliformis*. **Medical Mycology**. v. 47, p. 658-662, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 138, de 8 de fevereiro de 2017. Diário Oficial da União. Brasília-DF: Seção 1, 2017.
- CAC. Codex Alimentarius Commission. **Code of practice for the prevention and reduction of ochratoxin A contamination in coffee (CAC/RCP 69-2009)**, 2009.
Disponível em:
www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../CXP_069e.pdf, Acesso em: 08 de dez, 2021.
- CCCF. **Codex Committee On Contaminants In Foods**. Discussion paper on the development of maximum levels for mycotoxins in spices and possible prioritization of work. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Agenda Item 13, p. 21 2016.
- Chemspider**. Disponível em: <http://www.chemspider.com>. Acessado em: 17 julho 2020.
- CHRISTENSEN, M; RAPER, K.B. *Aspergillus robustus*, a new specie in the *Aspergillus ochraceus* group. **Mycologia**. v.70, p. 200-205, 1970.
- CHRISTENSEN, M; RAPER, K.B. The *Aspergillus ochraceus* group: two new species from western soils and a synoptic key. **Mycologia**. v.74, p. 210-215, 1982.
- CIEGLER, A; FENNELL, D.J; MINTZLAFF, H.J; LEISTNER, L. Ochratoxin synthesis by *Penicillium*. **Naturwissenschaften**. v. 59, p. 365-366, 1972.

- DAVOLOS, D; PERSIANI, A.M; PIETRANGELI B; RICELLI, A; MAGGI, O. *Aspergillus affinis* sp. nov., a novel ochratoxin a – producing *Aspergillus* species (section *Circumdati*) isolated from decomposing leaves. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 62, p. 1007-1015, 2012.
- DÍAZ, G.A; TORRES, R; VEGA, M; LATORRE, B.A. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. **International Journal of Food Microbiology**. v.133, p.195-199, 2009.
- DURAND, N; FONTANA, A; MEILE, J; SUÀREZ-QUIROZ, M; SCHORR-GALINDO, S; MONTET, D. Differentiation and quantification of the ochratoxin A producers *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* using PCR-DGE. **Journal of Basic Microbiology**, n. 59, p, 158-165, 2019.
- EZEKIEL, C; OYEDELE, O. A; KRAAK, B; AYENI, K. I; SULYOK, M; HOUBRAKEN, J; KRASKA, R. Fungal Diversity and Mycotoxins in Low Moisture Content Ready-TO-Eat Foods in Nigeria. **Frontiers in Microbiology**. v. 11, n. 615, 2020.
- FAIRTRADE FOUNDATION. About Coffee. Disponível em: <https://www.fairtrade.org.uk/farmers-and-workers/coffee/about-coffee/>, Acessado: 20 de out de 2021.
- FREIRE, F. C. O; KOZAKIEWICZ, Z; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**. n.149, p. 13–19, 2000.
- FRÍAS-DE-LEÓN, M.G; ESPINOSA-HERNÁNDEZ, V.M; BONIFAZ, A; MARTÍNEZ-HERRERA, E. Onychomycosis due to *Aspergillus* spp: A current review. **Current Fungal Infection Reports**. n.12, p.112–119, 2018.
- FRISVAD, J.C; MOLLER, L.L.H; LARSEN, T.O; KUMAR, R; ARNAU, J. Safety the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018.
- FRISVAD, J.C; FRANK J.M; HOUBRAKEN J; et al. New ochratoxin producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**. 50: 23–43. 2004.
- FRISVAD, J.C; SAMSON, R.A. *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of telemorphs of *Aspergillus* subg. *Circumdati*. **Studies in mycology**. v.45, p.201-207, 2000.
- FUNGARO, M.H.P; MAGNANI, M; VILAS-BOAS, L.A; VISSOTTO, P.C; FURLANETO, M.C; VIEIRA, M.L.C; TANIWAKI, M.H. Genetic relationships among Brazilian strains of *Aspergillus ochraceus* based on RAPD and ITS sequences. **Canadian Journal of Microbiology**. n. 50, p.985–988, 2004.
- FUNGARO, M.H.P; SARTORI, D. An overview on Molecular Markers for Detection of ochratoxigenic Fungi in Coffee beans. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.52, p.1-9, 2009.
- GARCIA, M.V; MALLMANN, C.A; COPETTI, M.V. Aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and their mycotoxins in spices marketed in Brazil. **Food Research International**. n.106, p.136–140, 2018.

- GARCIA-MATOS, P; GUARRO, J; GENÉ J; MIRA, J; LINARES, M; ORTONEDA, M. Onychomycosis caused by *Aspergillus sclerotiorum*. **Medical Mycology**. v.11, p. 222-224, 2005.
- GATTI, M. J; FRAGA, M. E; MAGNOLI, C; DALCERO, A. M; ROSA, C. A. R. Mycological survey for potential aflatoxin and ochratoxin producers and their toxicological properties in harvested Brazilian black pepper. **Food Additives & Contaminants**, n. 20(12), p. 1120–1126, 2003.
- GEREMEW, T; ABATE, D; LANDSCHOOT, S; HAESAERT, G; AUDENAERT, K. Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption. **Food control**. v.69, p.65-73, 2016.
- GIL-SERNA, J; VÁZQUEZ, C; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T; PATIÑO, B. Clustered array of ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus steynii* and their expression patterns in permissive conditions. **International Journal of Food Microbiology**. n. 214, p. 201-108, 2015.
- GIL-SERNA, J; VÁZQUEZ, C; SARDINÁS, N; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T. PATIÑO, B. Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. **Food control**. 2011.
- GIL-SERNA, J; GARCÍA-DÍAZ, M; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T; VÁZQUEZ, C. Description of an orthologous cluster of ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus* and *Penicillium* species. A comparative analysis. **International Journal of Food Microbiology**. n. 218, p. 35-43, 2018.
- GIL-SERNA, J; VÁZQUEZ, C; PATIÑO, B. The Genomic regions that contains ochratoxin a biosynthetic genes widely differ in *Aspergillus* section *Circumdati* Species. **Toxins**. n.12, 754, 2020.
- 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, p. 1323–1330, 1995.
- GONÇALVES H.B; RIUL, A.J.; QUIAPIM, A.C; JORGE, A; GUIMARÃES, L.H.S. Characterization of a thermostable extracellular tannase produced under submerged fermentation by *Aspergillus ochraceus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2012.
- GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 224, n. 2, p. 338–344, 1996.
- HAGELBERG, S; HULT, K. Toxicokinetics of Ochratoxin A in Several Species and its Plasma-binding Properties. **Journal of applied toxicology**. n. 9(7), p. 01-96, 1989.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

- HARIMA, N; INOUE, T; KUBOTA, T; OKADA, O; ANSAI, S; MANABE, M; INCHINOE, M; KASAI, T. A case of otomycosis caused by *Aspergillus sclerotiorum*. **The Journal of Dermatology**. v. 31, p. 949-950, 2004.
- HE, X; LI, Q; PENG, W; ZHOU, J; CAO, X; WANG, D; HUANG, Z; TAN, WEI; YU, L; GAN, B. Intra-and onter-isolate variation of ribosomal and protein-coding genes in *Pleurotus*: Implications for molecular identification and phylogeny on fungal groups. **BMC Microbiology**. n. 139, 2017.
- HORIE, Y. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. **Nippon Kingakukai Haiho**. v.36, p. 73-76, 1995.
- HOUBRAKEN, J; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. **Studies in Mycology**, 70, 1–51, 2011.
- HOUBRAKEN, J; SPIERENBURG, H; FRISVAD, J.C. *Rasomsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. **Springer**. n. 101, 2012.
- HOUBRAKEN, J; KOCSUBÉ, S; VISAGIE, C.M; YILMAZ, N; WANG, X. -C; MEIJER, M; KRAAK, B; HUBKA, V; SAMSON, R.A; FRISVAD, J.C. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): an overview of families, genera, subgenera, sections, series and specie. **Studies in Mycology**, 2020.
- HUMNABADKAR, R. P; SARATALE, G. D; & GOVINDWAR, S. P. (Decolorization of purple 2R by *Aspergillus ochraceus* (NCIM-1146). *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 10(3), 693-697, 2008.
- HUSSEIN, S.H; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology, Elsevier**. 2001.
- IAMANAKA, B. T; OLIVEIRA, I. S; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas**. Recife, v.7, p. 138-161, 2010.
- IAMANAKA, B.T; TANIWAKI, M.H; MENEZES, H.C; VICENTE, E; FUNGARO, M.H. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. **Food Addutives & Contaminants**. v. 12, p. 1258-1263, 2005.
- IARC - International Agency for Research on Cancer**. Ochratoxin A. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and micotoxins. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. v. 56, Lyon: IARC, p. 489-452, 1993.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Agrícola – Lavoura Permanente**. Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/15/11863>. Acesso em: 13 jan. 2022.
- JALILI, M. Natural occurrence of ochratoxin A contamination in commercial spices in Tehran. **Nutrition and food Sciences Research**. v. 3, p. 25-30, 2016.

JESWAL, P; KUMAR, D. Mycobiota and Natural Incidence of Aflatoxins, Ochratoxin A, and Citrinin in Indian Spices Confirmed by LC-MS/MS. **International Journal of Microbiology**, 2015.

JOSHI, V.K; PARMAR, M; RANA, N.S. Pectin esterase production from apple pomace in solid-state and submerged fermentation. **Food Technology & Biotechnology**, v. 44, p. 253-256, 2006.

KELLER, N.P; TURNER, G; BENNETT, J.W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Natural Reviews Microbiology**, v. 3, p. 937-947, 2005.

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

KLICH, M.A. Identification of Common *Aspergillus* Species. 1 ed. **American Society for Microbiology**, p. 116, 2002.

KLICH, M.A; CARY, J.W; BENNETT, C.A; Phylogenetic and morphological analysis of *Aspergillus ochraceoroseus*. **Mycologia**. p.1252-1260, 2003.

KRIJGSSHELD, P; BLEICHRODT, R; VAN VELUW, G.J; MULLER, W.H; DIJKSTERHUIS, J; WOSTEN, H.A.B. Development in *Aspergillus*. **Studies in mycology**. n.74 p.1- 29. 2013.

KUMAR, S; STECHER, G; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33, p. 1870-1874, 2016.

LEONG, S.L; HIEN, T.V; AN, T.V; TRANG, A.D; HOCKING, A.D; SCOTT, E.S. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**. n. 45, p- 301-306, 2008.

LEVI, C.P. Mycotoxins in coffee. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. v. 63, p. 1282-1285, 1980.

LEVI, C.P; TRENK, H.L; MOHR, H.K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. v. 57, p. 866-870, 1974.

LUISETTI, M; PICCIONI, P.D; DYNE, K; DONNINI, M; BULGHERONI, A; PASTURENZI, L; DONNETTA, A.M; PEONA, V. Some Properties of the alkaline Proteinase From *Aspergillus mellus*. **International Journal of Tissue Reactions**. 13(4):187-192. 1991.

MA, C; LI, X; ZHENG, C; ZHOU, B; XU, C. Comparison of characteristic components in tea-leaves fermented by *Aspergillus pallidofulvus* PT-3, *Aspergillus sesamicola* PT-4 and *Penicillium manginii* PT-5 using LC-MS metabolomics and HPLC analysis. **Food Chemistry**, n. 350, 2021.

MACDONALD, S; WILSON, P; BARNES, K; DAMANT, A; MASSEY, R; MORTBY, E.; SHEPHERD, M.J. Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. **Food Additives & Contaminants**, v.16:6, p.253-260, 1999.

- MAGNANI, M; FERNANDES, T; PRETE, C.E.C; HOMECHIM, M; ONO, E.Y.S; VILAS-BOAS, L.A; SARTORI, D; FURLANETO, M.C; FUNGARO, M.H.P. Molecular Identification of *Aspergillus spp.* Isolated From Coffee Beans. **Scientia Agricola**. v.62, p. 45-49, 2005.
- MASIH, A; SINGH, P. K; KATHURIA, S; AGARWAL, K; MEIS, J. F; CHOWDHARY, A. Identification by molecular methods and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and antifungal susceptibility profiles of clinically significant rare *Aspergillus species* in a referral chest hospital in Delhi, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v.54, p.2354-2364, 2016.
- MASSI, Fernanda Pelisson. **Marcadores moleculares para detecção de espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxinas, ocratoxinas e fumonisinas**. 2018. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina.
- MATA, M.M; TANIWAKI, M.H; IAMANAKA, B.T; SARTORI, D; OLIVEIRA, A.L.M; FURLANETO, M.C; FUNGARO, M.H.P. Agrobacterium-mediated insertional mutagenesis of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae*. **Canadian Journal of Microbiology**. 2007.
- MATEO, E.M; GIL-SERNA, J; PATINÑO, B; JIMÉNEZ, M. Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR-based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus spp.* **International Journal of Microbiology**, v. 149, p. 118-126, 2011.
- MEISNER, H; MEISNER, P. Ochratoxin A, an inhibitor of renal phosphoenolpyruvate carboxylase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 208, p. 146-151, 1981.
- MIKKOLA, R; ANDERSSON, M.A; HAUTANIEMI, M; SALKINOJA-SALONEN, M.S. Toxic indole alkaloids avrainvillamide and stephacidin B produced by a biocide tolerant indoor mold *Aspergillus westerdijkiae*. **Toxicon**, v.99, p. 58-67, 2015.
- MIYAKI, K.M; YAMAZAKI, Y; HORIE, Y; UDAGAWA, S. Studies on the toxigenic fungi found in rice of Chiba prefecture. II. On the microflora of rice. **Annual Report of the Institute of Food Microbiology**. v. 22, p. 41-45, 1969.
- MORELLO, L. G; SARTORI, D; MARTINEZ, A. L. O; VIEIRA, M. L. C; TANIWAKI, M. H; FUNGARO, M.H. P. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of β -tubulin gene by using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**. v.119,270–276. 2007.
- NOONIM, P; MAHAKARNCHANAKUL, W; NIELSEN, K. F; FRISVAD, J. C; SAMSON, R. A. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxina A producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food Microbiology**. v. 128, p. 197-202, 2008.
- NOVEY, H.S; WELLS, I.D. Allergic bronchopulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus ochraceus*. **American Journal of Clinical Pathology**. v.70, p. 840-843, 1978.
- OXELMAN, B; BREMER, B. Discovery of paralogous nuclear gene sequences coding for the second- largest subunit of rna polymerase ii (rpb2) and their

phylogenetic utility in gentianales of the asterids. **Molecular Biology and Evolution**. v.17, n.8, p. 1131-1145, 2000.

PARUSSOLO, G; BERNARDI, A.O; GARCIA, M. V; STEFANELLO, A; SILVA, T.S.S; COPETTI, M,V. Fungi in air, raw material and surface of dry fermented sausage produced in Brazil. **LWT- Food Science and Technology**, v. 108, p. 190-198, 2019.

PERROIS, C; STRICKLER, S.R; MATHIEU, M.L; BEDON, L; MICHAUX, S; HUSSON, J; MUELLER, L; PRIVAT, I. Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta). **Planta**, n. 241, p.179–191 2015.

PERRONE, G; GALLO, A. *Aspergillus* species and their associated mycotoxins. In: MORETTI, A; SUSCA, A. **Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. vol, 1542, 2017.

PETERSON, S.W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Cremiti* and *Wentii*, based on ribosomal DNA sequences. **Mycological Research**. v. 99, p. 547-554, 1995.

PETERSON, S.W. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In: integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* systematic (Samson R.A, PITT J,I eds). **Harwood Academic Publishers**, Amsterdam, the Netherlands, 2000.

PIMENTEL, I.C; KUCZKOWSKI, F.R; CHIME, M.A; AUER, C.G GRIGOLETTI, J. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.-HIL.). **Floresta**, v. 36, n. 1, p. 123-128, 2006.

PITT, J.I. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press Inc, London, 1979.

PITT, J.I; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3 ed. New York: Springer, 2009.

RAHBAEK, L; BREINHOLT, J. Circumdatins D, E and F: Further fungal benzodiazepine analogues from *Aspergillus ochraceus*. **Journal of Natural Products**, v.62, p. 904-905, 1999.

RAHBAEK, L; FRISVAD, J.C; CHRISTOPHERSEN, C. An amendment of *Aspergillus* section *Candidi* based on chemotaxonomical evidence. **Phytochemistry**. v. 53, p. 581-586, 2000.

RAHIMTULA, A.D; BEREZIAT, J.C; BUSSACCHINI-GRIOT, V; BARTSCH, H. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. **Biochemical Pharmacology**. v.37, p. 4469-4475, 1988.

RAJA, H. A; MILLER, A. N; PEARCE, C. J; OBERLIES, N. H. Fungal Identification Using Molecular Tools: A primer for the Natural, Products Research Community. **Journal of Natural Products**. v. 80, n.3, p. 756-770, 2017.

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

- REFAI, M.K; AZIZ, N.H; EL-FAR, F; HASSAN, A.A. Detection of Ochratoxin Produced by *A. ochraceus* in Feedstuffs and its Control by γ Radiation. **Elsevier**. p. 617-621, 1996.
- REZENDE, E.F; BORGES, J.G; CIRILLO, M.A; PRADO, G; PAIVA, L.C; BATISTA, L.R. Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica L.*) in conventional and organic cultivation in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. n. 44, v.2, p. 377-384, 2013.
- ROBBERS, J.E; HONG, S; TUIITE, J; CARLTON, W.W. Production of Xanthomegnin and Viomellein by Species of *Aspergillus* Correlated with Mycotoxicosis Produced in Mice. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 819-823, 1978.
- ROZAS, J; FERRER-MATA, A; SANCHEZ-DELBARRIO, J.C; GUIRAO-RICO, S; LIBRADO, P; RAMOS-ONSINS, S.E; SHANCEZ-GARCIA, A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution**. n. 34, p. 3299-3302, 2017.
- SALAH, H; LACKNER, M; HOUBRAKEN, J; THEELEN, B; LASS-FLORL, C; BOEKHOUT, T; ALMASLAMANI, M; TAJ-ALDEEN, S.J. The Emergence of Rare Clinical *Aspergillus* Species in Qatar: Molecular Characterization and Antifungal Susceptibility Profiles. **Frontiers in Microbiology**, 2019.
- SALIHU, A; BALA, M; ALAM, M.Z. Lipase production by *Aspergillus niger* using sheanut cake: An optimization study. **Journal of Taibah University for Science**. n. 10, p. 850-859, 2016.
- SAMSON, R.A. A compilation of the *Aspergillus* described since 1965. **Studies in Mycology**. v.18, p.1-38, 1979.
- SAMSON, R.A; et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141–173, 2014.
- SANTOS, L; MARÍN, S; MATEO, E.M; GIL-SERNA, J; VALLE-ALGARRA, F.M; PATIÑO, B; RAMOS, A.J. Mycobiota and Co-occurrence of Mycotoxins in Capsicum Powder. **International Journal of Food Microbiology**, n. 151, p. 270-276, 2011.
- SANTOS-CISCON, B.A; VAN DIEPENINGEN, A; MACHADA, J.C; DIAS, I.E; WAALWIJK, C. *Aspergillus* species from Brazilian dry beans and their toxigenic potential. **Microbiology**, v. 292, p. 91-100, 2019.
- SCHOCH C.L; SEIFERT K.A; HUHDORF, S; et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 109: 6241–6246, 2012.
- SILVA, A.R.P; FUNGARO, M.H.P; SILVA, J.J; MARTINS, L.M; TANIWAKI, M.H; IAMANAKA, B.T. Ochratoxin A and related fungi in Brazilian black pepper (*Piper nigrum L.*). **Food Research International**, n. 142, 2021.
- SILVA, J.J; PUEL, O; LORBER, S; FERRANTI, L.S; ORTIZ, L.F; TANIWAKI, M.H; IAMANAKA, B.T; FUNGARO, M.H.P. Occurrence and diversity of *Aspergillus* in

commercial yerba mate elaborated for the Brazilian beverage 'chimarrão'. **Food Research International**. v.121, p. 940-946, 2019.

SILVA, Josué José. **Biodiversidade e relações filogenéticas de *Aspergillus* section *nigri* isolados de commodities brasileiras**. 2019. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

SOUZA, P. M; WERNECK, G; ALIAKBARIAN, B; SIQUEIRA, F; FILHO, E. X. F; PEREGO, P; CONVERTI, A; MAGALHÃES, P.O; JUNIOR, A. P. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. **Food and Chemical Toxicology**. v. 109, p. 1103-1110, 2017.

SOUZA, T.M.A. **Incidência de *Aspergillus* das seções *Circumdati* e *Nigri* em grãos de café arábica (*Coffea arabica* L.) da zona da mata e cerrado de Minas Gerais**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

STACK, M.E; MISLIVEC, P.B. Production of xanthomegnin and viomellein by isolates of *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium cyclopium*, and *Penicillium viridicatum*. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 552-554. 1978.

TANIWAKI, M.H; PITT, J.I; TEIXERA, A.A; IAMANAKA, B,T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**. v. 82, p. 173-179, 2003.

TANIWAKI, M.H; TEXEIRA, A.A; COPETTI, M.V; IAMANAKA, B.T. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. **Food Research International**. n.61, p. 161-166, 2014.

TELKE, A. A; KADAM, A. A; JAGTAP, S.S; JADHAV, J. P; GOVINDWAR, S. P. Biochemical Characterization and Potential for Textile Dye Degradation of Blue Laccase from *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** 15, 2010.

THOMPSON, J. D; HIGGINS, D. G; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, n.22 (22), p. 4673–4680,1994.

TSUBOUCHI, H; TERADA, H; YAMAMOTO, K; HISADA, K; SAKABE, Y. Caffeine degradation and increased ochratoxin A production by toxigenic strains of *Aspergillus ochraceus* isolated from green coffee beans. **Mycopathologia**. v.90, p. 181-186, 1985.

TUTHILL, D.I; CHRISTENSEN, M. *Aspergillus sepultus*, a new species in the *Aspergillus ochraceus* group. **Mycologia**. v.78, p. 475-477, 1986.

URBANO, G. R; TANIWAKI, M. H; LEITÃO, M. F. de F; VICENTINI, M. C. Occurrence of ochratoxin a – Producing fungi in raw brazilian coffe. **Journal of Food Protection**. v.64, n. 8, p. 1226 – 1230, 2001.

- VAN der MERWE, K.J; STEYN, P.S; FOURIE, L. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxin A, B, C metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Journal of the Chemical Society**. 1965.
- VANZELA, D.O.A. **Isolamento e identificação de *Aspergillus* seção *Nigri*, potencial de produção de micotoxinas e lipases em alhos comercializados no Brasil**. 2018. 98f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.
- VARGA, J; et al. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: An update. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 59, n. 2, p. 151–167, 2015.
- 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.
- VARGA, J; KEVEI, É; TÓTH, B; KOZAKIEWICZ, Z; HOEKSTRA, R.F. Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 46, p.553-599, 2000a.
- VARGA, J; KRISTINA, R; TÉREN, J; MESTERHÁZY, A. Recent advances in ochratoxin research I. Production, detection and occurrence of ochratoxins. **Cereal Research Communication**. v.29, p.85-92, 2001.
- VARGA, J; TÓTH, B; KEVEI, É; PALÁGYI, A; KOZAKIEWICZ, Z. Analysis of genetic variability within the genus *Petromyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 77, p. 83-89, 2000b.
- VETROVSKY, T; KOLARÍK, M; ZIFČÁKOVÁ, L; ZELENKA, T; BALDRIAN, P. The *rpb2* gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. **Molecular Ecology Resources**. v.16, p. 388-401, 2016.
- VIEGAS, C; PACÍFICO, C; FARIA, T; OLIVEIRA, A. C; CAETANO, A; CAROLINO, E; GOMES, A.Q; VIEGAS, S. Fungal contamination in green coffee beans samples: A public health concern. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 2017.
- VIEIRA, N.O.; A. PERES, V.R. AQUINO, A.C. PASQUALOTTO. Drinking yerba mate infusion: A potential risk factor for invasive fungal diseases?. **Transplant Infectious Disease**, v. 12, n. 6, p. 565–569, 2010.
- VILELA, D.M; PEREIRA, G.V. de M; SILVA, C.F; BATISTA, L. R; SCHWAN, R.F. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food microbiology**. n. 27, p. 1128-1135, 2010.
- VISAGIE, C.M; VARGA, J; HOUBRAKEN, J; MEIJER, M; KOCSUBÉ, S; YILMAZ, N; FOTEDAR, R; SEIFERT, K.A; FRISVAD, J.C; SAMSON, R.A. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). **Studies in Mycology**. v. 78, p. 1-61, 2014.
- WIERZBICKA, M; PODSIADLO, B; JANCZARSKI, M. Invasive pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus ochraceus*. **Pneumonologia Alergologia Polska**. v.65, p. 254-260, 1997.

ZANIC-GRUBISIC, T; ZRINSKI, R; CEPELAK, I; PETRIK, J; RADIC, B; PEPELJNJAK, S. Studies of ochratoxin A- induced inhibition of phenylalanine hydroxylase and its reversal by phenylalanine. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 2000.

ZHOU, B; MA, C; REN, X; XIA, T; ZHENG, C; LIU, X. Correlation analysis between filamentous fungi and chemical compositions in a pu-erh type tea after a long-term storage. **Food Science & Nutrition**, v.8, p. 2501-2511, 2020.

ZOTTI, M; MONTEMARTINI, C.A. *Aspergillus persi*: a new species in *Circumdati* section. **Mycotaxon**. v.83, p. 269-278, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Haplótipos formados pelo concatenamento dos genes *BenA* e *CaM*, em relação ao substrato e origem geográfica.

HAPLÓTIPOS	SUBSTRATO	ORIGEM GEOGRÁFICA
<i>A. pallidofulvus</i>		
Haplótipo 40	(1 isolado)	
ITAL 1557	Pimenta	São Paulo
Haplótipo 39	(12 isolados)	
ITAL 32	Erva-mate	Paraná
ITAL 1550	Pimenta	São Paulo
ITAL 37	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 1129	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 173	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 511	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 2907	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 1538	Pimenta -preta	São Paulo
ITAL 2539	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 1321	Café arábica	São Paulo
ITAL 1157	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 531	Café robusta	Espírito Santo
Haplótipo 41	(1 isolado)	
ITAL 2849	Pimenta-preta	São Paulo
Haplótipo 36	(1 isolado)	
ITAL 27	Erva-Mate	Paraná
Haplótipo 42	(1 isolado)	
ITAL 1965	Pimenta-preta	São Paulo
Haplótipo 44	(1 isolado)	
ITAL 1973	Pimenta-preta	São Paulo
Haplótipo 38	(1 isolado)	
ITAL 612	Café robusta	Espírito Santo

APÊNDICE A – Continuação

HAPLÓTIPOS	SUBSTRATO	ORIGEM GEOGRÁFICA
<i>A. pallidofulvus</i>		
Haplótipo 43	(1 isolado)	
ITAL 186	Erva-mate	Paraná
Haplótipo 1	(43 isolados)	
ITAL 1720	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 1561	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 118	Erva-mate	Paraná
ITAL 216	Erva-mate	Paraná
ITAL 122	Erva-mate	Paraná
ITAL 1337	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 1343	Café arábica	São Paulo
ITAL 2215	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 103	Erva-Mate	Rio grande do Sul
ITAL 2327	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 1044	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 2537	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 626	Café robusta	Espírito Santo
ITAL 215	Erva-mate	Paraná
ITAL 218	Erva-mate	Paraná
ITAL 1155	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 1704	Café robusta	São Paulo
ITAL 220	Erva-mate	Paraná
ITAL 2852	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 2853	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 190	Erva-mate	Paraná
ITAL 116	Erva-mate	Paraná
ITAL 1605	Café robusta	São Paulo
ITAL 1227	Pimenta-preta	São Paulo

APÊNDICE A – Continuação

HAPLÓTIPOS	SUBSTRATO	ORIGEM GEOGRÁFICA
<i>A. pallidofulvus</i>		
ITAL 1336	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 219	Erva-mate	Paraná
ITAL 403	Café robusta	Espírito Santo
ITAL 67	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 189	Erva-mate	Paraná
ITAL 873	Pimenta-preta	Rio Grande do Sul
ITAL 159	Erva-mate	Rio Grande do Sul
ITAL 1895	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 2368	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 187	Erva-mate	Paraná
ITAL 697	Café robusta	Espírito Santo
ITAL 1393	Café arábica	São Paulo
ITAL 1476	Café robusta	São Paulo
ITAL 861	Pimenta-preta	Rio Grande do Sul
ITAL 188	Erva-mate	Paraná
ITAL 85	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 2899	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 92	Erva-mate	Paraná
ITAL 1695	Café robusta	São Paulo
Haplótipo 34	(1 isolado)	
ITAL 1705	Café robusta	São Paulo
Haplótipo 35	(1 isolado)	
ITAL 1450	Café arábica	São Paulo
Haplótipo 37	(1 isolado)	
ITAL 1169	Café robusta	Bahia
<i>A. westerdijkiae</i>		
Haplótipo 23	(1 isolado)	
ITAL 1472	Café robusta	São Paulo

APÊNDICE A – Continuação

HAPLÓTIPOS	SUBSTRATO	ORIGEM GEOGRÁFICA
<i>A. westerdijkiae</i>		
Haplótipo 25	(1 isolado)	
ITAL 691	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 21	(1 isolado)	
ITAL 2541	Pimenta-preta	São Paulo
Haplótipo 20	(2 isolados)	
ITAL 266	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 184	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 19	(1 isolado)	
ITAL 963	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 17	(1 isolado)	
ITAL 413	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 14	(4 isolados)	
ITAL 1446	Café arábica	São Paulo
ITAL 1233	Café arábica	São Paulo
ITAL 1272	Café arábica	São Paulo
ITAL 1369	Café arábica	São Paulo
Haplótipo 12	(5 isolados)	
ITAL 161	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 60	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 453	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 160	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 418	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 11	(13 isolados)	
ITAL 1140	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 1143	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 1023	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 1042	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 1278	Café arábica	São Paulo
ITAL 1703	Café robusta	São Paulo

APÊNDICE A – Continuação

HAPLÓTIPOS	SUBSTRATO	ORIGEM GEOGRÁFICA
<i>A. westerdijkiae</i>		
ITAL 69	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 2239	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 1558	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 1691	Café robusta	São Paulo
ITAL 89	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 469	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 1932	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 9	(5 isolados)	
ITAL 271	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 1706	Café robusta	São Paulo
ITAL 188	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 1701	Café robusta	São Paulo
ITAL 2204	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 8	(1 isolado)	
ITAL 1022	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 7	(1 isolado)	
ITAL 327	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 6	(1 isolado)	
ITAL 594	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 4	(1 isolado)	
ITAL 2278	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 3	(1 isolado)	
ITAL 1347	Café arábica	São Paulo
Haplótipo 2	(1 isolado)	
ITAL 1556	Pimenta-preta	São Paulo
Haplótipo 13	(1 isolado)	
ITAL 1068	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 18	(1 isolado)	
ITAL 1509	Café robusta	São Paulo

APÊNDICE A – Continuação

HAPLÓTIPOS	SUBSTRATO	ORIGEM GEOGRÁFICA
<i>A. westerdijkiae</i>		
Haplótipo 22	(1 isolado)	
ITAL 1481	Café robusta	São Paulo
Haplótipo 5	(2 isolados)	
ITAL 1709	Café robusta	São Paulo
ITAL 1391	Café arábica	São Paulo
Haplótipo 10	(8 isolados)	
ITAL 1154	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 2152	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 1708	Café robusta	São Paulo
ITAL 989	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 627	Café robusta	Espírito Santo
ITAL 324	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 77	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 2204	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 24	(1 isolado)	
ITAL 1754	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 15	(1 isolado)	
ITAL 1155	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 32	(1 isolado)	
ITAL 654	Café robusta	Espírito Santo
Haplótipo 16	(1 isolado)	
ITAL 1701	Café robusta	São Paulo
Haplótipo 26	(1 isolado)	
ITAL 1078	Café arábica	Minas Gerais
Haplótipo 27	(3 isolados)	
ITAL 1702	Café robusta	São Paulo
ITAL 1885	Café arábica	Minas Gerais
ITAL 1146	Café arábica	Minas Gerais

APÊNDICE A – Continuação

HAPLÓTIPOS	SUBSTRATO	ORIGEM GEOGRÁFICA
<i>A. ochraceus</i>		
Haplótipo 29	(2 isolados)	
ITAL 2854	Pimenta-preta	São Paulo
ITAL 2774	Pimenta-preta	Maranhão
Haplótipo 28	(1 isolado)	
ITAL 1618	Pimenta-preta	São Paulo
Haplótipo 30	(1 isolado)	
ITAL 1974	Pimenta-preta	São Paulo
Haplótipo 31	(1 isolado)	
ITAL 1960	Pimenta-preta	São Paulo
<i>A. steynii</i>		
Haplótipo 33	(2 isolados)	
ITAL 1428	Café arábica	São Paulo
ITAL 1214	Café robusta	Bahia

APÊNDICE B – *Aspergillus* seção *Circumdati* isolados de café, pimenta-preta e erva-mate no Brasil e número de acesso das sequencias *RPB2* no GenBank.

ISOLADO	SUBSTRATO	ORIGEM GEOGRÁFICA	ESPÉCIE FÚNGICA	NÚMERO DE ACESSO
				GENBANK <i>RPB2</i>
ITAL 1618	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. ochraceus</i>	ON631025
ITAL 1960	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. ochraceus</i>	ON631027
ITAL 1974	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. ochraceus</i>	ON631023
ITAL 2774	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. ochraceus</i>	ON631024
ITAL 2854	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. ochraceus</i>	ON631026
ITAL 37	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572133
ITAL 67	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572134
ITAL 85	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572132
ITAL 173	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572135
ITAL 1343	Café arábica	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572136
ITAL 1393	Café arábica	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572137
ITAL 1450	Café arábica	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572138
ITAL 511	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572127
ITAL 1129	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572126
ITAL 1321	Café arábica	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572186
ITAL 697	Café robusta	Espírito Santo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572144
ITAL 1476	Café robusta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572139
ITAL1605	Café robusta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572140
ITAL 1695	Café robusta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572141
ITAL 1704	Café robusta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572142
ITAL 1705	Café robusta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572143
ITAL 531	Café robusta	Espírito Santo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572188
ITAL 403	Café robusta	Espírito Santo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572130
ITAL 612	Café robusta	Espírito Santo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572128
ITAL 626	Café robusta	Espírito Santo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572129
ITAL 1169	Café robusta	Bahia	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572131
ITAL 861	Pimenta-preta	Rio Grande do Sul	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572153
ITAL 873	Pimenta-preta	Rio Grande do Sul	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572154
ITAL 1044	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572163
ITAL 1155	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572164
ITAL 1157	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572165
ITAL 1227	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572166

APÊNDICE B – Continuação

ISOLADO	SUBSTRATO	ORIGEM GEOGRÁFICA	ESPÉCIE FÚNGICA	NÚMERO DE ACESSO
				GENBANK <i>RPB2</i>
ITAL 1336	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572167
ITAL 1337	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572189
ITAL 1538	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572156
ITAL 1550	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572157
ITAL 1557	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572158
ITAL 1561	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572155
ITAL 1720	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572159
ITAL 1895	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572145
ITAL 1965	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572146
ITAL 1973	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572152
ITAL 2215	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572147
ITAL 2327	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572148
ITAL 2368	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572149
ITAL 2537	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572150
ITAL 2539	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572151
ITAL 2849	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572190
ITAL 2852	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572160
ITAL 2853	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572187
ITAL 2899	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572161
ITAL 2907	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572162
ITAL 27	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572174
ITAL 32	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572175
ITAL 92	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572173
ITAL 103	Erva-mate	Rio Grande do Sul	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572176
ITAL 116	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572183
ITAL 118	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572184
ITAL 122	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572185
ITAL 159	Erva-mate	Rio Grande do Sul	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572182
ITAL 186	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572177
ITAL 187	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572178
ITAL 188	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572179
ITAL 189	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572180
ITAL 190	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572181
ITAL 215	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572172

APÊNDICE B – Continuação

ISOLADO	SUBSTRATO	ORIGEM GEOGRÁFICA	ESPÉCIE FÚNGICA	NÚMERO DE ACESSO
				GENBANK <i>RPB2</i>
ITAL 216	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572168
ITAL 218	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572169
ITAL 219	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572170
ITAL 220	Erva-mate	Paraná	<i>A. pallidofulvus</i>	ON572171
ITAL 1428	Café arábica	São Paulo	<i>A. steynii</i>	ON631021
ITAL 1214	Café robusta	Bahia	<i>A. steynii</i>	ON631022
ITAL 60	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630976
ITAL 69	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630971
ITAL 77	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630972
ITAL 89	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630973
ITAL 160	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630977
ITAL 161	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630978
ITAL 184	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630979
ITAL 188	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630980
ITAL 266	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630967
ITAL 271	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630968
ITAL 324	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630969
ITAL 327	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630970
ITAL 413	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630962
ITAL 418	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630963
ITAL 453	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630964
ITAL 469	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630965
ITAL 470	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630966
ITAL 594	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630981
ITAL 963	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630974
ITAL 1754	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630961
ITAL 1885	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630960
ITAL 1932	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630975
ITAL 2152	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630982
ITAL 2204	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630983
ITAL 2239	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630984
ITAL 2278	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630985
ITAL 1078	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630998
ITAL 989	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630999

APÊNDICE B – Continuação

ISOLADO	SUBSTRATO	ORIGEM GEOGRÁFICA	ESPÉCIE FÚNGICA	NÚMERO DE ACESSO GENBANK
				<i>RPB2</i>
ITAL 1154	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631006
ITAL 1155	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631007
ITAL 691	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631015
ITAL 1233	Café arábica	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631012
ITAL 1272	Café arábica	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631013
ITAL 1278	Café arábica	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631014
ITAL 1347	Café arábica	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631008
ITAL 1369	Café arábica	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631009
ITAL 1391	Café arábica	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631010
ITAL 1446	Café arábica	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631011
ITAL 1472	Café Robusta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630986
ITAL 1481	Café Robusta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630987
ITAL 1509	Café Robusta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630988
ITAL 1691	Café Robusta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630989
ITAL 1701	Café Robusta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630990
ITAL 1702	Café Robusta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630991
ITAL 1706	Café Robusta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630992
ITAL1709	Café Robusta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630993
ITAL 627	Café Robusta	Espírito Santos	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631019
ITAL 654	Café Robusta	Espírito Santos	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631020
ITAL 1703	Café Robusta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631016
ITAL 1708	Café Robusta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631017
ITAL 1710	Café Robusta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631018
ITAL 1143	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630997
ITAL 1556	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630995
ITAL 1558	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630996
ITAL 2541	Pimenta-preta	São Paulo	<i>A. westerdijkiae</i>	ON630994
ITAL 1022	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631000
ITAL 1023	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631001
ITAL 1042	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631002
ITAL 1068	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631003
ITAL 1140	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631004
ITAL 1146	Café arábica	Minas Gerais	<i>A. westerdijkiae</i>	ON631005

