



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAURO CÉSAR PIOTTO DE LIMA

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE
MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO DESTINADOS À
PRODUÇÃO DE RAÇÃO ANIMAL**

Londrina

2023

MAURO CÉSAR PIOTTO DE LIMA

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE
MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO DESTINADOS À
PRODUÇÃO DE RAÇÃO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Sartori

Londrina

2023

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

Lima, Mauro César Piotto.

Identificação de fungos produtores de micotoxinas em grãos de milho destinados à produção de ração animal / Mauro César Piotto Lima. - Londrina, 2023.
50 f. : il.

Orientador: Daniele Sartori.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2023.

Inclui bibliografia.

1. *Aspergillus chevalieri* - Tese. 2. *Aspergillus montevidensis* - Tese. 3. Incidência - Tese. 4. Grãos de milho - Tese. I. Sartori, Daniele. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

MAURO CÉSAR PIOTTO DE LIMA

IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO DESTINADOS À PRODUÇÃO DE RAÇÃO ANIMAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Daniele Sartori

Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Elisete Pains Rodrigues

Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo

Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 10 de março de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e saúde e por me guiar o tempo todo.

A Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela estrutura e condições de ensino.

A Capes pelo financiamento recebido.

A minha orientadora, Prof.^a Dra. Daniele Sartori, pelos ensinamentos, apoio, confiança e paciência.

A todos os docentes por terem dividido seus conhecimentos e pela dedicação ao dom de ensinar.

Aos membros da banca de defesa da dissertação, pela disponibilidade e atenção.

À Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas e Dra. Sara Mataroli de Godoy pelo suporte técnico compartilhado.

Aos meus pais pela criação, apoio e exemplo de vida.

Agradeço à minha esposa e meus filhos pelo apoio e compreensão durante essa jornada.

Aos colegas de laboratório e aos funcionários da UEL que se tornaram amigos e propiciaram um ambiente de trabalho colaborativo e produtivo.

A todos que de alguma forma contribuíram com a realização e concretização desse trabalho.

Sou grato do fundo do meu coração!

LIMA, Mauro César Piotto de. **Identificação de fungos produtores de micotoxinas em grãos de milho destinados à produção de ração animal**. 2023. 50 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos mais importantes produtos do agronegócio brasileiro e majoritariamente utilizado para a produção de ração animal. A qualidade do milho depende de características intrínsecas e de práticas adequadas de produção, colheita e armazenamento. A infecção por fungos em grãos de milho é um fator preocupante devido ao potencial de produção de micotoxinas por algumas espécies, levando a perdas econômicas e danos à saúde animal e humana. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a incidência de fungos em amostras de grãos de milho (n = 10) destinadas à produção de ração animal e identificar as principais espécies de fungos que infectam os grãos de milho. Todas as amostras avaliadas estavam infectadas com fungos, sendo a maior incidência de *Aspergillus* sp. (92,8%), seguido de *Fusarium* sp. (2,9%). Inicialmente as Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) foram identificadas morfológicamente, com predomínio de *Aspergillus* section *Aspergillus* (80,6 %), seguido por *A.* section *Flavi* (16,0 %) e *A.* section *Cremeri* (3,4 %). Um total de 53 isolados representativos de cada seção e origem foi selecionado para análise do perfil genético resultando em cinco grupos. No grupo I foram alocados os isolados identificados morfológicamente como *A.* section *Flavi*, nos grupos II e III, os isolados identificados como *A.* section *Aspergillus*, no grupo IV, os isolados identificados como *A.* section *Cremeri* e no grupo V, os isolados identificados como *Fusarium* sp. Membros representantes de cada grupo foram identificados pela análise das sequências das regiões parciais dos genes *BenA* e *CaM*. Os membros do grupo I (28 isolados) foram identificados como grupo *A. flavus* / *A. oryzae*. Os membros dos grupos II e III foram identificados como *A. chevalieri* (17 isolados) e *A. montevidensis* (04 isolados), respectivamente. Os isolados alocados no grupo IV, foram identificados como *A. dimorphicus* (1 isolado) e *A. wentii* (1 isolado), enquanto os isolados do grupo V, foram identificados como *F. verticillioides* (2 isolados). Este foi o primeiro relato de maior incidência de *Aspergillus* seção *Aspergillus* em grãos de milho, com predominância de *A. chevalieri* e *A. montevidensis*. Esses dados concordam com relatos de maior disponibilidade de água metabólica, favorecendo a infecção e o crescimento de espécies menos xerofílicas e potencialmente produtoras de micotoxinas, como as do grupo *A. flavus*, segundo incidente mais comum em grãos de milho neste estudo, e *F. verticillioides*.

Palavras-chave: *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus montevidensis*, incidência, grãos de milho.

LIMA, Mauro César Piottto de. **Identification of mycotoxin-producing fungi in corn used to animal feed production.** 50 p.p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, 2023.

ABSTRACT

Corn (*Zea mays* L.) is one of the most important agribusiness products in Brazil and is mainly used for animal feed production. The quality of corn depends on its intrinsic characteristics and on appropriate production, harvesting and storage practices. One of the worrying factors in relation to the infection of corn grains by fungi is the potential for mycotoxin production by some species that, under certain environmental conditions, can produce mycotoxins, leading to economic losses and damage to animal and human health. Thus, it is important to understand the incidence of fungi in corn and consequently the risks of mycotoxin contamination. Corn grain samples (n = 10) used for animal feed production were collected from two regions of Brazil and all samples were infected with a higher incidence of *Aspergillus* sp. (92.8 %) and *Fusarium* sp. (2.9 %). *Aspergillus* section *Aspergillus* was predominant (80,6 %), followed *A.* section *Flavi* (16,0 %) and *A.* section *Cremeri* (3,4 %). A total of 53 representative isolates were selected for analysis of genetic profile resulting in five clusters, of which members of each cluster were identified by partial regions of the *BenA* and *CaM* genes. The cluster I allocated isolates of section *Flavi*, identified (28 isolates) as *A. flavus* / *A. oryzae* group. The clusters II and III allocated isolates of section *Aspergillus*, which were identified as *A. chevalieri* (17 isolates) and *A. montevidensis* (04 isolates), respectively. Cluster IV allocated isolates of section *Cremeri*, were identified as *A. dimorphicus* (1 isolate) and *A. wentii* (1 isolate) while cluster V, with isolates of the *Fusarium* sp. were identified as *F. verticillioides* (2 isolates). This was the first report of a higher incidence of section *Aspergillus* in corn grains, with *A. chevalieri* and *A. montevidensis* predominance. These data are to agree with reports of greater availability of metabolic water, favoring the infection and growth of less xerophilic species and potentially producing mycotoxin, such as those from the *A. flavus* group, the second most common incident in corn grains in this study, and *F. verticillioides*.

Key words: *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus montevidensis*, corn grains, identified, incidence

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Anatomia do grão de milho.....	15
Figura 2	Conidióforo do <i>Aspergillus</i> sp. (a) <i>Aspergillus montevicensis</i> ; (b) <i>Aspergillus chevalieri</i>	20
Artigo:		
Figure 1	Incidence of CFUs in corn grains related to the origin of the sample.....	35
Figure 2	Neighbor-net constructed with 53 isolates from post-harvest corn collect from 2 Brazilian states.	36
Figure 3	Principal Coordinate Analysis data - PCoA whit isolates from clusters I, II, I II, IV and V.....	37
Figure 4	Phylogenetic trees constructed based on data for partial sequences for (A) β -tubulin (<i>BenA</i>) and (B) calmodulin (<i>CaM</i>) genes for <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	39
Figure 5	Phylogenetic trees constructed based on data for partial sequences for (a) β -tubulin (<i>BenA</i>) and (B) calmodulin (<i>CaM</i>) genes for <i>Aspergillus</i> section <i>Aspergillus</i>	40
Figure 6	Phylogenetic tree constructed based on data for partial sequences for β -tubulin gene (<i>BenA</i>) for <i>Aspergillus</i> section <i>Cremeri</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais macronutrientes utilizados para produção de ração animal ... 14

Artigo:

Table 1. Fungal incidence (No. UFCs) and water activity index of corn grains34

Table 2 Identification of species of isolates by partial sequencing of β -tubulin (*BenA*) and calmodulin (*CaM*) genes38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	GERAL	12
2.2	ESPECÍFICOS	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1	ASPECTOS ECONÔMICOS DA PRODUÇÃO DE MILHO (<i>ZEA MAYS L.</i>)	13
3.2	CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DOS GRÃOS DE MILHO DIRECIONADOS À PRODUÇÃO DE RAÇÕES.....	14
3.3	INCIDÊNCIA DE FUNGOS EM GRÃOS DE MILHO	17
3.4	PRINCIPAIS ESPÉCIES DE <i>ASPERGILLUS</i> EM GRÃOS DE MILHO	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO	22
4.2	ANÁLISE DE ATIVIDADE DE ÁGUA (A_w) DAS AMOSTRAS	22
4.3	INCIDÊNCIA DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS EM GRÃOS DE MILHO	22
4.4	ISOLAMENTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS EM GRÃOS DE MILHO.....	23
4.5	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	23
4.6	QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO	24
4.7	ANÁLISE DE FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS AMPLIFICADOS.....	24
4.8	AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES PARCIAIS DOS GENES <i>B-TUBULINA (BENA)</i> E <i>CALMODULINA (CAM)</i> DE ISOLADOS SELECIONADOS	26
4.9	SEQUENCIAMENTO DE REGIÕES PARCIAIS DOS GENES DA <i>B-TUBULINA (BENA)</i> E <i>CALMODULINA (CAM)</i>	27
4.10	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DOS ISOLADOS SELECIONADOS	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28

5.1	ARTIGO CIENTÍFICO	29
5.1.1	INTRODUCTION	30
5.1.2	MATERIAL AND METHODS	31
5.1.3	RESULTS	34
5.1.4	DISCUSSION	42
6	REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS:	45

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais produtos agrícolas do mundo e o Brasil é o 3º maior produtor e o 2º maior exportador desta commodity. O principal uso do milho é a produção de rações para alimentação animal, onde o milho representa 57,5% do volume total das matérias-primas utilizadas. O uso na alimentação animal consome anualmente em torno de 60,3% da produção mundial de milho. Outros mercados importantes em termos de consumo são a alimentação humana e produção de etanol.

Para assegurar a qualidade do milho, é necessário observar as características intrínsecas dos grãos e as práticas adequadas de produção, colheita e armazenamento dos grãos. No entanto, mesmo com controle de qualidade adequado nas diversas etapas de produção, o milho está suscetível à infecção por fungos.

Um dos fatores preocupantes quanto à infecção dos grãos de milho por fungos é o potencial de produção de micotoxinas por algumas linhagens. As principais micotoxinas encontradas em grãos de milho são as aflatoxinas, fumonisinas, deoxinivalenol, zearalenona, tricoteceno e ocratoxina produzidas principalmente por *A. flavus* e *Fusarium* sp. Estas toxinas podem causar hepatotoxicidade, carcinogênese e neurotoxicidade, acarretando danos à saúde animal e humana, assim como levar a importantes perdas econômicas.

Apesar do processo de produção de ração, especialmente durante a *pelletização*, que utiliza alta temperatura e pressão ter a capacidade de reduzir a quantidade de fungos presentes, a maioria das micotoxinas são termoestáveis e permanecem no produto final.

Atualmente há diversas técnicas de detecção de micotoxinas em grãos de milho, no entanto, uma vez que as micotoxinas já foram produzidas, é difícil evitar sua permanência na cadeia produtiva e alimentar.

Assim, é crucial verificar a incidência das principais espécies de fungos em grãos de milho destinados à produção de ração para definir estratégias que minimizem os riscos de produção de micotoxinas e evitem perdas econômicas pela redução da qualidade do milho, contribuindo para melhor da qualidade das rações e conseqüentemente para a saúde e bem-estar dos animais.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Verificar a incidência, isolar e identificar as principais espécies de fungos em grãos de milho destinados à produção de ração animal.

2.2 ESPECÍFICOS

Verificar a incidência dos principais gêneros de fungos presentes em grãos de milho;

Isolar Unidades Formadoras de Colônias representantes dos gêneros presentes em amostras de grãos de milho, de acordo com suas características morfológicas e origem geográfica;

Obter o perfil genético de isolados selecionados conforme suas características morfológicas e origem geográfica;

Identificar as espécies mais incidentes em grãos de milho.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS ECONÔMICOS DA PRODUÇÃO DE MILHO (*Zea mays* L.)

A produção mundial de milho em 2021 atingiu a máxima histórica de 1,207 bilhões de toneladas, sendo que os quatro principais produtores de milho em todo o mundo foram os EUA (384 milhões de toneladas), China (273 milhões de toneladas), Brasil (87 milhões de toneladas) e a União Europeia (73 milhões de toneladas). Para safra brasileira de 2021/2022 espera-se produção nacional de 114 milhões de toneladas, um aumento de 20,8 % sobre a média histórica de 2018 a 2020, que foi 94,4 milhões de toneladas e 30,1 % sobre a produção de 2021, que foi de 87,1 milhões de toneladas (FAO, 2022).

A previsão da produção total de milho para a safra 2022/2023 deve ficar próximo de 127 milhões de toneladas, sendo que o consumo interno deve ficar próximo de 82 milhões de toneladas e a exportação em 45 milhões de toneladas (CONAB, 2022).

Para a safra 2021/22, da produção total do milho, 32,6 % ou seja, 37 milhões de toneladas, são destinados à exportação, o que faz do Brasil o segundo maior exportador de milho, com um crescimento de 22 % em relação à média das 5 safras anteriores, que foi de 30,3 milhões de toneladas, o maior entre os principais exportadores mundiais (FAO, 2022).

Dos 76,5 milhões de toneladas do milho que permanecem no mercado interno, 60,3 % (46,2 milhões de toneladas) tem como principal utilização a produção de ração animal. O restante é utilizado na indústria de alimentos, produção de etanol e sementes (CNA, 2021).

O milho é o principal macronutriente na composição das rações (Tabela 1) e corresponde a 57,5 % do volume total de matéria prima utilizada para a produção de rações.

Tabela 1 - Principais macronutrientes utilizados para produção de ração animal

Macronutriente	2021 estimativa (Ton)	2022 previsão (Ton)
Milho	49.660.268	51.401.641
Farelo de soja	17.732.817	18.345.030
Trigo e co-produtos	656.784	681.959
Farinhas/gorduras de origem animal	4.320.740	4.504.775
Sorgo	1.963.662	2.009.490
Farelo/caroço de algodão	1.134.900	1.159.17
Farelo de glúten de milho	739.597	767.079

Fonte: Sindirações – boletim informativo maio/2022.

No Brasil, para 2022 é esperada a produção de 83,6 milhões de toneladas de ração animal das quais 52,9 % são destinados para a avicultura, seguido pela suinocultura e bovinocultura com 24,4% e 14,8%, respectivamente (SINDIRAÇÕES, 2022).

3.2 CLASSIFICAÇÃO DOS GRÃOS DE MILHO DIRECIONADOS À PRODUÇÃO DE RAÇÕES

O milho é uma planta da classe Liliopsida, ordem Poales, família Poaceae, gênero *Zea*, espécie *Zea mays*. É uma monocotiledônea de caule delgado, que pode chegar a dois metros de altura. Seu fruto é cilíndrico, com grãos de tamanho médio inseridos em fileiras no sabugo, formando espigas e revestido por um pericarpo. Os grãos do milho são geralmente, amarelos ou brancos, podendo apresentar colorações variando do preto até o vermelho. A média de peso individual do grão é de 250 a 300 mg e sua composição média consiste em 72 % de amido, 9,5 % proteínas, 9 % fibra e 4 % de lipídeos. Estruturalmente o grão de milho é formado por endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta (Figura 1) (PAES, 2006).

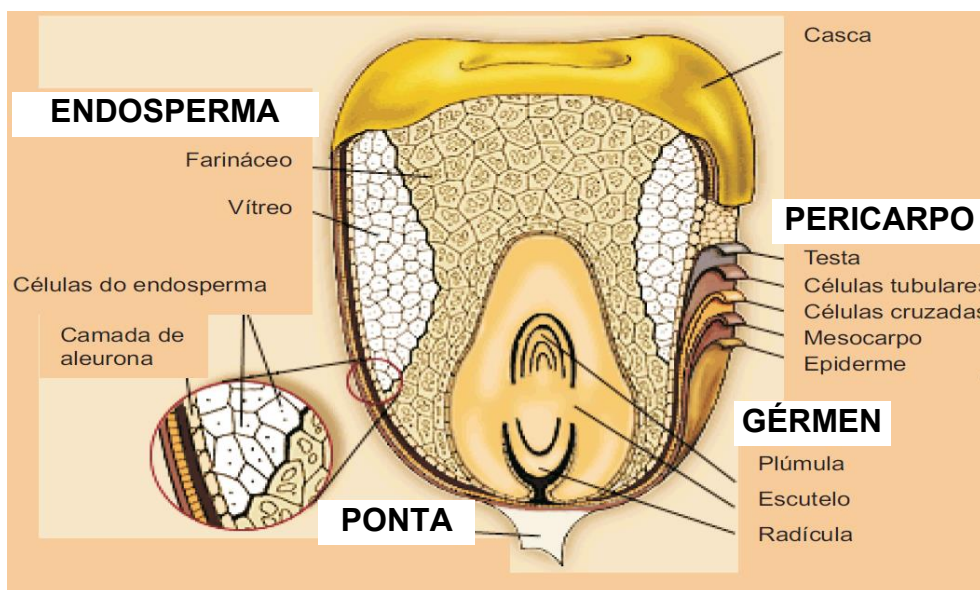


Figura 1: Anatomia do grão de milho

Fonte: Paes (2006).

As condições de cultivo do milho são variáveis no Brasil devido às distintas condições climáticas. Existem duas safras de milho no Brasil: a primeira safra (verão) de setembro a dezembro e a segunda (inverno) de janeiro a abril (EMBRAPA, 2015).

A presença de fungos nos grãos de milho, pode afetar direta e indiretamente a qualidade do grão (BHATTACHARYA; RAHA, 2002). Alguns desses fungos pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* dos quais algumas espécies, sob condições ambientais favoráveis, podem produzir micotoxinas, como aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, entre outras (BRITO et al., 2022, EL-AZIZ et al., 2021; GASPERINI et al., 2021; LEITE et al., 2021; PITT, 2000).

Fatores abióticos, como estresse hídrico e térmico, concentrações de O₂ e CO₂, práticas inadequadas de cultivo e armazenamento, tem correlação com suscetibilidade à infecção fúngica (LEITE et al., 2021; NEME; MOHAMMED, 2017; CASTELARI et al., 2015) e consequente qualidade dos grãos, ou seja, quanto mais danos o grão apresenta, mais suscetível está à infecção por fungos (NEME; MOHAMMED, 2017).

A atividade de água (a_w) dos grãos de milho é um dos fatores de grande importância quanto a suscetibilidade à infecção por fungos. Foi relatado crescimento de populações fúngicas como *A. flavus*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. em grãos de milho cuja a_w era de 0,95. Por outro lado, espécies de *Eurotium* foram encontradas

em maior quantidade em grãos com a_w entre 0,85 e 0,90 (MARÍN et al., 2000).

No procedimento de armazenamento a granel, o milho passa por uma pré-amostragem na chegada, Em seguida o milho passa pelo processo de secagem e, ao final, é feita a classificação, quando a umidade dos grãos deve ser inferior a 14 % para posterior armazenamento (BRASIL, 2011).

Os grãos de milho destinados à produção de ração animal são inicialmente pré-selecionados conforme as legislações vigentes, de acordo com a Instrução Normativa nº60/2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece critérios de qualidade dos grãos e avaliação quanto à presença de micotoxinas.

Quanto aos critérios de qualidade, os grãos de milho podem ser classificados conforme o grupo, a classe e o tipo. O critério utilizado para a distinção do grupo é a consistência e formato do grão (duro, dentado, semiduro e misturado), sendo o grupo “duro” aquele que possui as melhores características de qualidade na produção. Já para a distinção da classe é observada a coloração dos grãos (amarela, branca, cores e misturada), sendo esse critério utilizado para distinguir as variedades genéticas da plantação. Para a distinção do tipo, que utiliza como critério a quantidade de grãos com defeitos, podendo ser classificados como tipos I, II e III que são comercializáveis ou o “Fora de Tipo” que possui comercialização vedada. Esse critério de classificação está altamente relacionado a maior suscetibilidade à infecção por microrganismos, como os fungos.

Outro critério avaliado na pré-seleção dos grãos de milho, é o Limite Máximo Tolerável (LTM) de micotoxinas. As principais micotoxinas encontradas em grãos de milho são as aflatoxinas, fumonisinas, tricoteceno, ocratoxina, zearalenona e deoxynivalenol (BRITO et al., 2022; LEITE et al, 2021; MISIHAIRABGWI et al., 2019, OLIVEIRA et al., 2017).

Estas micotoxinas estão relacionadas com o desenvolvimento de diversas patologias no organismo, como por exemplo, as causadas pela exposição as aflatoxinas, a qual os principais efeitos são hepatotoxicidade e carcinogenia, enquanto para fumonisinas são a neurotoxicidade e carcinogenia (AWUCHI et al. 2022; FERNANDES et al., 2022; LEE et al., 2012). As aflatoxinas são classificadas como carcinógenos do grupo 1 (IARC, 2012) e as fumonisinas como carcinógenos do grupo 2B (IARC, 1993; 2002).

Conforme a legislação estabelecida pelo Ministério da Saúde, através da Instrução Normativa – IN Nº88 de 26/03/2021, os Limites Máximos de Tolerância para as micotoxinas nos grãos de milho são: 20 µg/Kg para Aflatoxinas (B1 + B2 + G1 + G2), 20 µg/Kg para Ocratoxina A, 2.000 µg/Kg para Deoxynivalenol, 5.000 µg/Kg para Fumonisinias (B1 + B2) e 400 µg/Kg para Zearalenona.

A contaminação do milho com as micotoxinas citadas acima ocorre pela presença de fungos potencialmente toxigênicos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* (BRITO et al., 2022; LEITE et al., 2021; MUNKVOLD, et al., 2019). Tais fungos podem infectar os grãos de milho já na etapa de pré-colheita e a contaminação por micotoxinas pode aumentar, caso haja condições de armazenamento inapropriadas (CHULZE, 2010).

A produção de micotoxinas é espécie e linhagem específica, ou seja, nem todas as espécies produzem micotoxinas, assim como nem todas as linhagens de uma espécie produzem micotoxinas (LEITE et al., 2021). A capacidade de produção de micotoxinas por espécies e ou linhagens está associada à presença de genes essenciais da via metabólica e a condições ambientais favoráveis (CARVAJAL-MORENO, 2021).

3.3 INCIDÊNCIA DE FUNGOS EM GRÃOS DE MILHO

O milho, principal componente na formulação das rações, está sujeito à infecção por uma biota fúngica diversa (CARVAJAL-MORENO, 2021; GASPERINI et al., 2021; VEGI; WOLF-HALL, 2013). Dentre os gêneros mais comumente encontrados em grãos de milho tem-se *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* (GASPERINI et al., 2021; XING et al., 2018; VEGI; WOLF-HALL, 2013; SUANTHIE; COUSIN; WOLOSHUK, 2009).

Kaaya et al. (2006) analisaram amostras de milho recém-colhidas e armazenadas de três regiões de Uganda. Nos grãos de milho armazenados de 2 a 6 meses as espécies mais incidentes foram *A. niger* (14,8 %), *A. flavus* (11,4 %), *F. verticillioides* (5,3 %) e de *P. digitatum* (1,8 %). Já em grãos de milho armazenados por mais de 6 meses a incidência de *A. niger* foi de 35,3 %, *A. flavus* de 22,5 %, *F. verticillioides* de 10,1 % e *P. digitatum* 2,7 %.

Em outro relato, grãos de milho armazenados em 5 regiões da Nigéria,

Aspergillus foi o gênero mais frequente com 61,8 %, seguido por *Penicillium* sp. com 26,7 % e *Fusarium* com 2,9 %. A espécie mais abundante foi *A. flavus* (35 - 75,5 %) seguido por *Fusarium verticillioides* (25 - 100 %) (ADETUNJI et al., 2014)

Ao analisar grãos de milho produzidos na França em 2015, um ano atípico com clima quente, verificou-se a frequência de 69 % de *Aspergillus* section *Flavi*, sendo a maior parte representado pelas espécies *A. flavus* (68 %) e *A. parasiticus* (28 %). Estes dados corroboraram com o fato de que 15 % dessas amostras de grãos de milho armazenadas em silos estarem contaminadas com aflatoxinas, principalmente aquelas amostras que foram armazenadas por período maior que 7 dias (BAILLY et al., 2018).

Em grãos de milho recém-colhidos e armazenados na Tunísia, o gênero *Aspergillus* foi o mais frequente, com 76,2 % dos grãos de milho infectados, seguido pelos gêneros, *Eurotium*, *Penicillium* e *Fusarium* com 42,9 %, 38,1 % e 19 %, respectivamente. Do gênero *Aspergillus* a seção *Flavi* foi a mais frequente com 66,7 %, indicando alto risco para produção de aflatoxinas. *Fusarium verticillioides* foi a única espécie deste gênero detectada em grãos de milho (JEDIDI et al, 2018).

Na China foram analisados grãos de milho armazenados por longo período, de 6 meses a 12 anos. A incidência total de fungos foi de 19 % no primeiro ano de armazenamento, e após 12 anos ainda pode ser observado uma incidência de 3 %. O gênero *Aspergillus* foi o que apresentou maior abundância relativa média, variando entre 35 % e 100 %, seguido por *Fusarium* sp. que variou entre 9 % e 40 % e *Penicillium* sp. entre 9% e 20% (XING et al., 2018).

Na Arábia Saudita, em amostras de grãos de milho coletadas em mercados de três regiões, os autores encontraram 11,4 % de *Aspergillus* sp., 9,5 % de *Fusarium* sp. e 5,1 % de *Penicillium* sp. como os principais gêneros infectando grãos de milho. Foram analisadas 15 amostras de *Aspergillus flavus* para verificar o potencial de produção de micotoxinas, das quais 53,3 % foram identificadas como toxigênicas e 46,7 % como não toxigênicas (MAHMOUD et al., 2014). Em outro estudo com grãos de milho armazenados, também foi observado maior frequência do gênero *Aspergillus* (34 %), seguido por *Fusarium* sp. (22,5%) e *Penicillium* sp. (2,5 %). Do total de isolados, 17,5 % correspondiam a *Aspergillus* section *Flavi*, sendo todos identificados como *A. flavus*. Foram analisados 29 isolados de *A. flavus* sendo 38 % identificados como toxigênicos (EL-AZIZ et al., 2021).

Em amostras de grãos de milho pós-colheita, provenientes dos estados do Paraná e Mato Grosso entre os anos de 2015 e 2016, foram encontrados 8,8 Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)/grama de grãos de milho. Houve predomínio dos gêneros *Fusarium* e *Penicillium*, detectados em todas as amostras (100 %), enquanto *Aspergillus* sp. foram encontradas em 66,6 % das amostras. (GASPERINI et al., 2021).

Em grãos de milho provenientes de 25 regiões no Egito, foram identificadas 42 espécies de fungos, pertencentes a 26 gêneros. A maior incidência média foi de *Penicillium* spp. (64 %), *A. niger* (40 %), *F. verticillioides* (33 %) e *A. flavus* (35 %). Neste estudo, também foi identificado a presença de *Ustilago maydis*, encontrado em 99 % das regiões (SHABANA et al, 2022).

Em grãos de milho armazenados em silo-bolsas os gêneros fúngicos mais frequentemente encontrados foram *Penicillium* (37,5 %), *Aspergillus* (22,2 %) e *Fusarium* (16,6 %). Das espécies de *Aspergillus* relatadas no milho armazenado em silo-bolsas 61,7% eram *A. flavus* (BRITO et al. 2022).

Em amostras de grão de milho da Indonésia, foi observado a presença de *A. chevalieri* em 13 % dos grãos (PITT et al., 1998). Também observado a incidência de *A. chevalieri* em 20 % em grãos de milho armazenados refrigerados por 751 dias (WICKLOW; WEAVER; THRONE, 1998).

3.4 PRINCIPAIS ESPÉCIES DE *Aspergillus* EM GRÃOS DE MILHO

O gênero *Aspergillus* contém as principais espécies de fungos encontrados em grãos de milho pós-colheita, muitas delas destacando-se por possuírem diversas características tanto com impactos positivos como fermentações de alimentos, processo biotecnológicos para produção de enzimas, ácidos orgânicos e medicamentos, assim como impactos negativos como deterioração de alimentos, produção de micotoxinas e causando patologias e contaminações (HOUBRAKEN et al., 2020).

Atualmente, esse gênero que passa por constantes revisões taxonômicas, conta com 6 subgêneros, 27 seções e aproximadamente 446 espécies (HOUBRAKEN et al., 2020).

Aspergillus sp. são fungos filamentosos caracterizados pela formação

de conidióforo com estipe grande, asseptada, em sua extremidade há formação de uma vesícula, local onde há o crescimento de fiálides aglomeradas, responsáveis pela origem dos conídios (PITT; HOCKING, 2009)

A. flavus, *A. parasiticus*, *A. nomius*, são os mais importantes fungos produtores de aflatoxinas (MUNKVOLD, 2019), já *A. oryzae* and *A. soyae* parecem ser as formas domesticadas das espécies aflatoxigênicas *A. flavus* e *A. parasiticus*, respectivamente, e são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos e biotecnologia (Fig. 2) (HOUBRAKEN et al., 2014).

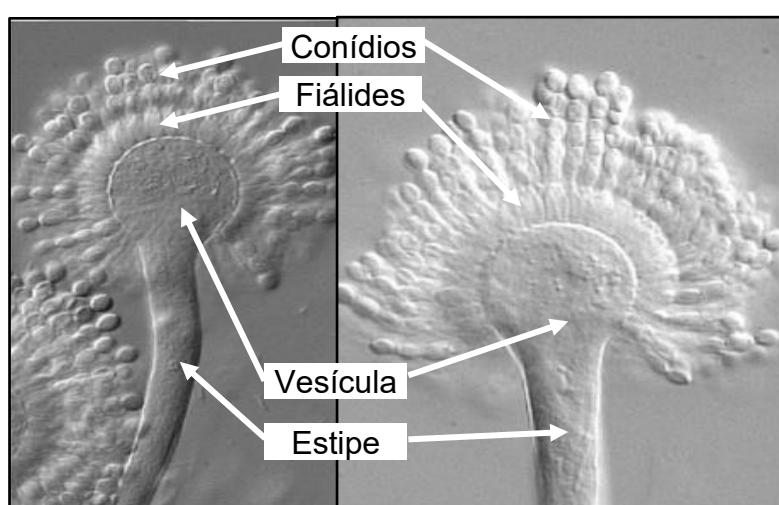


Figura 2 Conidióforo do *Aspergillus* sp. (a) *Aspergillus montevicensis*; (b) *Aspergillus chevalieri*.

Fonte: O próprio autor (Adaptado de Pitt e Hocking, 2009).

A. section Flavi contém várias espécies que produzem algumas das mais importantes micotoxinas conhecidas, especialmente aflatoxinas, ocratoxinas e ácido ciclopiazônico. Das 33 espécies (incluindo as duas espécies domesticadas) pertencentes a *A. section Flavi*, 18 espécies podem produzir aflatoxinas (FRISVAD et al., 2019)

A maioria das espécies do gênero *Aspergillus* se desenvolve em regiões de clima tropical e especialmente subtropical (PITT; HOCKING, 2009). Visto que a temperatura ótima para o crescimento de *A. flavus* é próximo de 33 °C (PITT; HOCKING, 2009). Isso coincide com as condições dos estados do Centro-Oeste e Sul do Brasil, onde está concentrado mais de 75% da produção de milho (CONAB, 2022)

tornando a presença desses fungos um dos principais desafios da nossa agricultura.

Dessa forma, como os fungos do gênero *Aspergillus* prosperam, ou ao menos toleram temperaturas elevadas e reduzida atividade de água (a_w), apresentam grande capacidade de se desenvolver em grãos armazenados. (CASTELLARI et al., 2015, PITT; HOCKING, 2009). No campo, onde a a_w nos grãos é maior, os fungos que se desenvolvem com a_w maior que 0,95, como é o *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp. tendem a ser mais presentes no período pré-colheita (MANNAA; KIM, 2017). Na etapa de armazenamento, com menor a_w , os fungos derivados do campo tendem a ser substituídos por fungos de armazenamento, *Aspergillus* sp. e *Penicilium* sp., que são xerofílicos e podem causar deterioração dos grãos, alterações nutricionais e químicas, aumento da temperatura e umidade no armazenamento (SULEIMAN; ROSENTRATER, 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram coletadas 10 amostras de grãos de milho contendo 300 g de grãos por amostra, destinados à produção de ração animal. Do total de amostras, 5 foram coletadas em agroindústria no Paraná e 5 amostras em agroindústria em São Paulo.

As amostras são provenientes de fornecedores de grãos de milho destinados às indústrias de rações e coletadas na etapa de recepção das matérias primas. Cada amostra foi transportada até o laboratório a 25 °C e mantidas a -20 °C até o momento do uso.

4.2 ANÁLISE DE ATIVIDADE DE ÁGUA (A_w) DAS AMOSTRAS

Para verificar a atividade de água (a_w) das amostras, 5 g de grãos de milho foram triturados em moinho analítico A-11 (IKA-Werke, Germany) e analisados com o equipamento Aqualab 4TE (Meter Group, USA).

4.3 INCIDÊNCIA DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS EM GRÃOS DE MILHO

Para verificar a incidência de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) que infectam os grãos de milho, 100 g de grãos de milho de cada amostra foi submetido a desinfecção superficial com 300 mL de hipoclorito de sódio 0,4 % por 1 minuto, seguido de lavagem por 1 minuto com 300 mL de água estéril.

Um total de 105 grãos de milho descontaminados de cada amostra foram distribuídos em placas de Petri contendo meio de cultura Dichloran 18 % - (DG-18) [220 g/L Glicerol, 10 g/L Glicose, 5,0 g/L Peptona, 1,0 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 mL/L Dichloran (0,2 %, p/v etanol), 0,1 g/L Cloranfenicol, 15 g/L Ágar, pH 5,6]. Em seguida as placas foram incubadas por até 7 dias a 28 °C, seguido de contagem das UFCs e identificação morfológica do gênero (PITT; HOCKING,

2009).

4.4 ISOLAMENTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS EM GRÃOS DE MILHO

Após identificação morfológica do gênero, foram isoladas UFCs representantes de gêneros, amostras e origens, em meio de cultura Czapek Yeast Extract Agar - CYA (30,0 g/L Sacarose, 5,0 g/L Extrato de levedura, 1,0 g/L K₂PO₄, 0,3 g/L NaNO₃, 0,05 g/L KCl, 0,05 g/L MgSO₄.7H₂O, 0,001 g/L FeSO₄.7H₂O, 0,001 g/L ZnSO₄.7H₂O, 0,001 g/L CuSO₄.5H₂O, 15,0 g/L Ágar), conforme Pitt e Hocking (2009). As placas foram incubadas a 28 °C por 7 a 14 dias.

4.5 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Inicialmente os isolados selecionados foram cultivados em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (Kasvi, Espanha) e incubados por 7 a 10 dias a 28 °C.

Em seguida foi preparada uma suspensão de aproximadamente 10⁷ conídios em 2 mL de Tween 80 a 0,5%, que foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio Extrato de Malte – MEA (20 g/L Extrato de malte, 20 g/L Glicose, 1 g/L Peptona) e incubado a 28 °C a 180 rpm por 24 a 48 horas.

A extração de DNA genômico foi realizada como descrito por Azevedo et al. (2000). O micélio foi coletado por filtração à vácuo e em seguida macerado com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Então, aproximadamente 100 mg do macerado foi transferido para microtubos (2 mL) e imediatamente adicionado 800 µL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8,0; EDTA 25 mM pH 8,0; NaCl 250 mM; SDS 1 % e q.s.p. de água ultrapura).

Os componentes foram homogeneizados e incubados em banho-Maria a 65 °C durante 20 minutos com homogeneização a cada 5 minutos. Após este período, foi adicionado 800 µL de fenol saturado, seguido de homogeneização e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos (NanoSpin Plus - Locus, Brasil).

A fase aquosa foi transferida para outro microtubo de 2 mL e em seguida adicionado 800 µL da mistura fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 25:24:1, com posterior homogeneização e centrifugação a 12.000 rpm por

15 minutos.

Novamente a fase aquosa foi recuperada e adicionado 800 μL de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos.

Os ácidos nucleicos foram precipitados por adição à fase aquosa de 1/10 do volume de NaCl 3 M e 2 volumes de etanol absoluto e incubado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. O material foi lavado com 300 μL de etanol 70 %.

Após a secagem dos ácidos nucleicos, o precipitado foi ressuspenso em 50 μL de tampão TE (Tris-HCl 1 M pH 8,0; EDTA 0,5 M pH 8,0 e q.s.p. de água ultrapura) e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A quantificação do DNA genômico foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,0 % (p/v), com tampão *Super Buffer* 50x (20 g/L NaOH; 112,5 g/L H_3BO_3 ; pH 8,0), diluído para 1x. Como DNA padrão utilizou-se o DNA do fago lambda com as concentrações de 50 a 200 ng/ μL . Os ácidos nucleicos foram diluídos a 50 ng/ μL e 5 ng/ μL para uso nas demais etapas.

4.7 ANÁLISE DE FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS AMPLIFICADOS

Os isolados selecionados foram submetidos a técnica de AFLP conforme descrito por Vos *et al.* (1995) – com modificações. A restrição do DNA genômico foi realizado simultaneamente à ligação aos adaptadores. Foi utilizado 10 μL de DNA genômico 50 ng/ μL de cada UFC selecionada, 1 U de *MseI* (*New England Biolab Inc*), 5 U de *EcoRI* (*Thermo Scientific*), 2 U de T4 DNA ligase, 1,0 μL de tampão ECO (1X), 1,0 μL de tampão T4 DNA ligase (5X), 1,0 μL de NaCl, 0,5 μL de BSA 1mg/mL e 0,5 μL de DTT 5 μM , 1 μL do Adaptador *EcoRI* 5 μM , 1 μL do Adaptador *MseI* 50 μM , água q.s.p. 30 μL . As reações foram submetidas a um termociclador com ciclo inicial a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 horas, seguido por $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora e 15 minutos, e uma última etapa a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. O padrão de restrição-ligação foi verificado utilizando 5 μL do

fragmento em gel de agarose 1 %.

Os fragmentos foram submetidos à reação de amplificação pré-seletiva utilizando 3,5 µL de *GoTaq® Green Master Mix (Promega)*; 0,58 µL dos *primers* pré-seletivos *EcoRI* e *MseI*, contendo as sequências de bases dos respectivos adaptadores acrescentados a base pré-seletiva A (adenina) para *EcoRI* e C (citosina) para *MseI*, juntamente com 3,0 µL do produto da restrição-ligação diluído 5X e água ultrapura q.s.p. 10 µL. A reação pré-seletiva foi submetida a um termociclador com ciclo inicial de 72 °C por 2 minutos, 20 ciclos de 94 °C por 1 segundo, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos e um ciclo final de 60 °C por 30 minutos. O resultado foi visualizado com 3 µL do produto pré-seletivo amplificado em eletroforese em agarose 1 %.

O produto pré-seletivo amplificado foi utilizado para a amplificação seletiva, permitindo melhor seleção dos fragmentos amplificados. As reações foram realizadas em um volume final de 10 µL contendo 3,5 µL de *GoTaq® Green Master Mix (Promega)*; 0,54 µM de primer *MseI*; 0,54 µM de primer *EcoRI* marcado com fluoróforo (FAM “CAGC”; NED “CACC”; VIC “CATC”; PET “CAGC”); 2,5 µL do produto pré-seletivo amplificado (5 ng/µL). A amplificação foi realizada em termociclador com ciclos iniciais a 94 °C por 2 minutos, 65 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos; seguido de oito ciclos a 94 °C por 1 segundo, 64 °C (decaindo 1 °C por ciclo) por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos; seguido de vinte e três ciclos a 94 °C por 1 segundo, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos, sendo finalizado com 60 °C por 30 minutos. Os produtos amplificados foram misturados com 0,2 µL de Marcador *size standard 600-LIZ (GeneScan v 2.0)* e 8,8 µL de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, USA). Em seguida as amostras foram submetidas à análise dos fragmentos com o sequenciador ABI 3500 xL *Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)*.

A detecção dos eletroferogramas e a determinação do número de fragmentos foi processado no software *GeneMaPPer® v.4.1 (Applied Biosystems, USA)*, definido como unidade de fluorescência relativa mínima de 200 RFU, light smooth e detecção automática de bins. Fragmentos com tamanho variando de 75 a 450 pares de bases, provenientes dos quatro pares de *primers*, foram combinados em uma única matriz binária de presença (1) e ausência (0). A partir dos dados de Principal Coordinate Analysis – PCoA, foi construído a Neighbor-Net com o software

SplitsTree4 (v. 4.14.8), realizada Análise de Variância Molecular (AMOVA) por meio software RStudio v. 4.0.1 (R Core Team, 2020).

4.8 AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES PARCIAIS DOS GENES β -TUBULINA (*BenA*) E CALMODULINA (*CaM*) DE ISOLADOS SELECIONADOS

Foram selecionados isolados representativos dos grupos formados conforme similaridade genética obtida no item 4.7, e submetidas à amplificação de regiões parciais do gene β -tubulina (*BenA*) e calmodulina (*CaM*), a fim de identificar a qual espécie o isolado pertence. Dessa forma, foram utilizados os *primers* Bt2a (5' GGTAACCAAATCGGTGCTTTC 3') e Bt2b (5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3') para amplificação de *BenA* (GLASS; DONALDSON, 1995), e os *primers* Cmd5 (5' CCGAGTACAAGGAGGCCTTC 3') e Cmd6 (5' CCGATAGAGGTCATAACGTGG 3') para amplificação de *CaM* (HONG et al., 2006).

A reação foi preparada em um volume final de 25 μ L composto por: 2,5 μ L de tampão (Tris-HCl pH 8,4 200 mM; KCl 500 mM) 10x concentrado (Invitrogen Life Technologies, USA), 2,5 μ L dNTP 2,5 mM (Invitrogen Life Technologies, USA), 1 μ L de cada um dos respectivos *primers* 10 pmol/ μ L (Invitrogen, Life Technologies, USA), 1 μ L MgCl₂ 50 mM (Invitrogen Life Technologies, USA), 0,1 μ L Taq DNA polimerase 5 U/ μ L (Invitrogen, Life Technologies, USA), 2 μ L da amostra de DNA 5 ng/ μ L e 14,9 μ L de água ultrapura. A reação foi submetida a um termociclador Mastercycler Gradiente (Eppendorf AG, Alemanha), programado para um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 57 °C por 40 segundos e 72 °C por 1 minuto, e um ciclo final de extensão a 72 °C por 10 minutos. Após o término da reação, os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % (p/v).

O produto amplificado foi purificado com EXOSAP-IT® (Invitrogen Life Technologies, USA), o qual foi incubado a 37 °C por 15 minutos e em seguida a 80 °C por 15 minutos.

4.9 SEQUENCIAMENTO DE REGIÕES PARCIAIS DOS GENES DA β -TUBULINA (*BenA*) E CALMODULINA (*CaM*)

Os produtos amplificados foram sequenciados pelo método de Sanger et al. (1977), utilizando-se os mesmos pares de *primers* descritos no item 4.8. As reações de sequenciamento foram preparadas em um volume final de 10 μ L sendo composta por: 1 μ L de DNA 20 ng/ μ L, 0,5 μ L de *primer forward* ou *reverse* 10 pmol/ μ L, 2 μ L de tampão, 1 μ L do Kit BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA) e 4 μ L de água ultrapura. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradiente (Eppendorf AG, Alemanha), programado para um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, seguido de 32 ciclos a 95 °C por 45 segundos, 50 °C por 30 segundos e 60 °C por 2 minutos.

A reação de sequenciamento foi purificada com adição de 2,5 μ L de EDTA 0,125 mM e 30 μ L de etanol absoluto, o qual mantido a 25 °C por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi submetida a 4.000 rpm, 4 °C por 40 minutos. Ao *pellet* foi adicionado 30 μ L de etanol 70 % seguido de centrifugação a 4.000 rpm, 4 °C por 15 minutos.

Após a secagem do *pellet* o material foi ressuspensão em 10 μ L de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, USA), e submetida ao sequenciador ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

4.10 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DOS ISOLADOS SELECIONADOS

A qualidade das sequências de nucleotídeos foram avaliadas na plataforma Electropherogram Quality Analysis (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). As sequências foram alinhadas utilizando o software Bioedit v.7.2.5, juntamente com as sequências tipo de espécies disponíveis no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” – NCBI.

As árvores filogenéticas foram construídas com o software MEGA X v.10.2.4 (KUMAR et al., 2018), com construção de árvore filogenética modelo Kimura de 2 parâmetros (K2+G), utilizando dados de distância do método Neighbor-Joining (NJ) e análise de bootstrap de 1.000 repetições.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigo científico: "HIGH INCIDENCE OF *Aspergillus* section *Aspergillus* IN CORN GRAINS."

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

HIGH INCIDENCE OF *Aspergillus* section *Aspergillus* IN CORN GRAINS

ABSTRACT

Corn (*Zea mays* L.) is one of the most important agribusiness products in Brazil and is used for most of the production of animal feed. The quality of corn depends on its intrinsic characteristics and on adequate production, harvesting and storage practices. One of the worrying factors regarding the infection of corn grains by fungi is the potential for mycotoxin production by some strains that under environmental conditions can produce mycotoxins, leading to economic losses and damage to animal and human health. Thus, it is important to ~~understand~~ know the incidence of fungi in corn grains and consequently the risks of mycotoxin contamination. Corn grains samples (n = 10) used for animal feed production were collected from two regions of Brazil and all samples were infected with a higher incidence of *Aspergillus* sp. (92.8 %) following *Fusarium* sp. (2.9 %). *Aspergillus* section *Aspergillus* was predominant (80.6 %), followed *A.* section *Flavi* (16.0 %) and *A.* section *Cremeri* (3.4 %). A total of 53 representative isolates were selected for analysis of genetic profile resulting in five clusters, of which members of each cluster were identified by regions of the *BenA* and *CaM* genes. The cluster I allocated isolates of *A.* section *Flavi*, identified as *A. flavus* / *A. oryzae* group (28 isolates). The clusters II and III allocated isolates of *A.* section *Aspergillus*, which were identified as *A. chevalieri* (17 isolates) and *A. montevidensis* (04 isolates), respectively. Cluster IV allocated isolates of *A.* section *Cremeri*, were identified as *A. dimorphicus* (1 isolate) and *A. wentii* (1 isolate) while V cluster isolates of the *Fusarium* sp. were identified as *F. verticillioides* (2 isolates). This was the first report of a higher incidence of *A.* section *Aspergillus* in corn grains, with *A. chevalieri* and *A. montevidensis* predominance. These data are to agree with reports of greater availability of metabolic water, favoring the infection and growth of less xerophilic species and potentially producing mycotoxin, such as those from the *A. flavus* group, the second most common incident in corn grains in this study, and *F. verticillioides*.

Key words: *A. chevalieri*, *A. montevidensis*, corn grains, identified, incidence

5.1.1 INTRODUCTION

Corn (*Zea mays* L.) is one of the most important agribusiness products in the world and especially in Brazil with an annual production of 114 million tons, being the 3rd biggest producer in the world (FAO, 2022). The main destination of corn is the production of animal feed with 60.3 % of the total and in a smaller proportion for human consumption, in addition to ethanol production (CNA, 2021).

Corn is the main macronutrient in the composition of feeds, corresponding to 57.5 % of the total volume of raw material used in the formulation (SINDIRAÇÕES, 2022).

One of the worrying factors regarding the infection of corn grains by fungi is the potential for mycotoxin production by some strains. The presence of mycotoxins in corn grains leads to economic losses and can cause damage to animal and human health (AWUCHI et al. 2022; FERNANDES et al., 2022; LEE et al., 2012).

Corn is subject to infection by a diverse fungal biota (CARVAJAL-MORENO, 2021; GASPERINI et al., 2021; VEGI; WOLF-HALL, 2013). The presence of fungi in corn grains can directly and indirectly affect grain quality (BHATTACHARYA; RAHA, 2002). Among the genera of fungi most commonly found in corn grains are *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* (GASPERINI et al., 2021; XING et al., 2018; VEGI; WOLF-HALL, 2013; SUANTHIE; COUSIN; WOLOSHUK, 2009;). Such genera have species that, under favorable environmental conditions, can produce mycotoxins, such as aflatoxins, fumonisins, trichothecene, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol (LEITE et al., 2021). In addition, most mycotoxins are thermostable and can be accumulated in the production chain (BRITO et al., 2022, EL-AZIZ et al, 2021; GASPERINI et al., 2021; LEITE et al., 2021; PITT, 2000).

Corn grains used to produce animal feed initially undergoes pre-selection regarding the quality of the grains, in accordance with current legislations. These criteria are highly related to the amount of grain defects, which factor leads the grain to greater susceptibility to infection by microorganisms, such as fungi.

Thus, the present study verified the incidence of fungi in post-harvest corn grains and identified the main genera in corn grains.

5.1.2 MATERIAL AND METHODS

Sample processing, morphological identification of Colony Forming Units and incidence of infection in corn grains

A total of $n=10$ corn grain samples (300 g/sample) were randomly collected from trucks to poultry feed production industries, of which $n=5$ samples were from Paraná and $n=5$ samples were from São Paulo states, Brazil. The samples were deposited in clean polyethylene bags, placed in a cool box for transportation, and then stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the time for use.

Initially, 5 g of each corn grain sample was ground in an analytical mill IKA A-11 (IKA-Werke, Germany) and subjected to water activity (a_w) analysis with Aqualab 4TE (Meter Group, USA).

Corn grains (100 g/sample) were superficially disinfected by immersion in 0.4 % sodium hypochloride (NaClO) for 1 min, washed by ultrapure water. A total of 105 corn grains from each sample were plated in Dichloran 18 % (DG18) according to Pitt and Hocking (2009) and incubated until 7 days at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. The incidence of fungi in the corn grains was reported as Colony Forming Units (CFU).

Distinct and representative CFUs from each corn grain sample were isolated in Czapek Yeast Extract agar (CYA) and incubated for 7 days at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. The CFUs were identified based on morphological characters. Morphological identification was made according to macro and microscopic characters as described by Pitt and Hocking (2009).

DNA Extraction

A suspension of 10^7 conidia of each isolate in 2 mL in 0.5% Tween 80 ($n=53$) were introduced in Malt Extract (50 mL) (20 g/L of malt extract; 1 g/L of peptone; 20 g/L of glucose) at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 180 rpm for 24 - 48 hours. The resulting mycelium were collected for filtration and approximately 0.1 g of mycelium was ground with liquid nitrogen for DNA extraction as described by Azevedo et al. (2000).

Genetic profile analysis and sequencing of the partial region of the β -tubulin and calmodulin gene

The genetic profile of 53 isolates including *Aspergillus* sp. and *Fusarium*

sp. was obtained for AFLP as described by Vos et al. (1995), with modifications. A total of 500 ng of genomic DNA from each isolate was subjected to restriction/ligation in a single reaction. With 30 μ L of final volume, each reaction included 1 U of *Mse*I and 5U *Eco*RI, 10X *Mse*I buffer, 2U T4 DNA ligase, 5X T4 DNA ligase buffer, *Eco*RI (5 μ M) and *Mse*I (50 μ M) adapters, NaCl (0.5 M); BSA (1 mg/mL) and DTT (5 mM). The reaction was submitted for 4 h at 37 °C, 1 h and 15 min at 22 °C and 10 min at 70 °C.

The restriction/ligation products diluted 4x (3 μ L) was used on the pre-selective amplification reaction. With 10 μ L of final volume, 3.5 μ L of GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA); 0.58 μ L of the *Eco*RI (pre-selective base A) and *Mse*I (pre-selective base C) pre-selective primers was amplified at 72 °C for 2 min, 20 cycles of 94 °C for 1 sec, 56 °C for 30 sec, 72 °C for 2 min, and 60 °C for 30 min.

The pattern of pre-selective amplification was verified on 1% agarose gel and the amplified product diluted eight times in ultrapure water. For the selective amplification, an initial screening was carried out with eight combinations of *Eco*RI/*Mse*I selective primers. The four most polymorphic and reproducible combinations were selected and applied to all samples (6-FAM-*Eco*RI+AGC / *Mse*I+CTAG; NED-*Eco*RI+ACC / *Mse*I+CTC; VIC-*Eco*RI+ATC / *Mse*I+CTTC; PET-*Eco*RI+ACG / *Mse*I+CTA). The amplification was submitted to an initial cycle at 94 °C for 2 min, 65 °C for 30 s and 72 °C for 2 min; followed by eight cycles at 94 °C for 1 s, 64 °C (decreasing 1 °C per cycle) for 30 s and 72 °C for 2 min; followed by twenty-three cycles at 94 °C for 1 s, 56 °C for 30 s and 72 °C for 2 min, and one cycle at 60 °C for 30 min. The amplified products were mixed with 0.2 μ L of standard size 600-LIZ Marker (GeneScan v 2.0) and 8.8 μ L of Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems, USA). Then the samples were subjected to fragment analysis with the ABI 3500 XL Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, USA).

The detection of electropherogram peaks and the determination of the number of fragments was processed using the GeneMaPPer® v.4.1 software (Applied Biosystems, USA), defined as a minimum relative fluorescence unit of 200 RFU, light smooth and automatic bin detection. Fragments ranging in size from 75 to 450 base pairs, from the four pairs of primers, were combined into a single binary array of presence (1) and absence (0). From the Principal Coordinate Analysis – PCoA data, the Neighbor-Net was built with the SplitsTree4 software (v. 4.14.8), and Molecular Variance Analysis (AMOVA) was performed using the RStudio v. software. 4.0.1 (R

Core Team, 2020).

The dendrogram analysis allowed the selection of representative isolates from the partial region amplification and sequencing of the β -tubulin gene (*BenA*) and calmodulin (*CaM*).

The PCR was prepared with final volume of 25 μ L, each reaction included 2.5 μ L of buffer (Invitrogen Life Technologies, USA – 200 mM; Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl 10x); 2.5 μ L of dNTP's (Invitrogen Life Technologies, USA – 2.5 mM); 1 μ L of primers Bt2a and Bt2b (10 pmol/ μ L) (GLASS; DONALDSON, 1995) or primers Cmd5 and Cmd6 (10 pmol/ μ L) (HONG et al., 2006); 1 μ L of MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, USA – 50 mM); 0.1 μ L of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies, USA – 5 U/ μ L); 2 μ L of DNA sample (5 ng/ μ L). The reaction was submitted at 94 °C for 5 min, 35 cycles of 94 °C for 1 min, 57 °C for 40 sec and 72 °C for 2 min, and final extension at 72 °C for 10 min.

After, PCR products were sequenced based on the method of Sanger et al. (1977), using the same pairs of primers described. Sequencing reactions were prepared in a final volume of 10 μ L, each reaction included 2 μ L buffer, 0.5 μ L forward or reverse primer (10 μ mol / μ L), 1 μ L DNA (20 ng / μ L), 1 μ L BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) and 5.5 μ L of ultrapure water. The reaction was submitted to 95 °C for 4 min, 32 cycles of 95 °C for 45 s, 50 °C for 30 s and 60 °C for 2 min. After, the reaction product was purified by adding 2.5 μ L of 0.125 mM EDTA and 30 μ L of ethanol, and was kept at 25 °C for 15 min, after was centrifugated at 4,000 rpm, 4 °C for 40 min. To the pellet was added 30 μ L of 70 % ethanol followed by centrifugation at 4,000 rpm, 4 °C for 15 min. Hi-Di formamide (10 μ L) was added to the final reaction and the products were submitted to ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The sequences were aligned with sequences of type species deposited in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the software MEGA X v.10.2.4 (KUMAR et al., 2018), using parameter of Kimura model (K2 + G), using distance data from the Neighbor-Joining (NJ) method and bootstrap analysis with 1,000 replicates.

5.1.3 RESULTS

Incidence, isolation and selection of Colony Forming Unit in corn grains

Corn grain samples had water activity (a_w) between 0,65 and 0,72 and 99,4% of the corn grains were infected with a total of 1,264 CFUs. The *Aspergillus* genus was most incident with 92.8 % (1,173 CFUs), followed *Fusarium* genus with 2.9 % (37 CFUs). A total of 4.3 % of CFUs (54 CFUs) belonging to other genera were reported (Table 1).

Table 1. Fungal incidence (No. UFCs) and water activity index of corn grains

Geographic origin	Sample	a_w	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	Others genus	Total
Paraná	1	0,71	117	9	6	132
	2	0,65	104	1		105
	4	0,71	117	1	4	122
	6	0,72	131	1	4	136
	7	0,71	124		11	135
São Paulo	8	0,72	92	15	7	114
	9	0,70	136	1	4	141
	10	0,67	108	5	9	122
	11	0,69	125	1	1	127
	12	0,68	119	3	8	130
Total			1173	37	54	1264

According to the geographic origin of the corn grains sample, the amount of CFUs was homogeneous, count 593 and 580 CFUs of *Aspergillus* sp. from Paraná and São Paulo states, respectively. On the other hand, the amount of *Fusarium* sp. was 12 and 25 CFUs from Paraná and São Paulo states. Of the total CFUs belonging *Aspergillus* genus (1,173), 945 (80.6 %) CFUs were identified as *Aspergillus* section *Aspergillus*, 188 (16 %) CFUs as *Aspergillus* section *Flavi*, and 40 (3.4 %) CFUs as *Aspergillus* section *Cremeri*. The highest incidence of *Aspergillus* section *Aspergillus* was observed in samples of corn grains from São Paulo (519 CFUs), while the highest incidence of *Aspergillus* section *Flavi* was observed in samples from Paraná (145 CFUs) (Fig. 1).

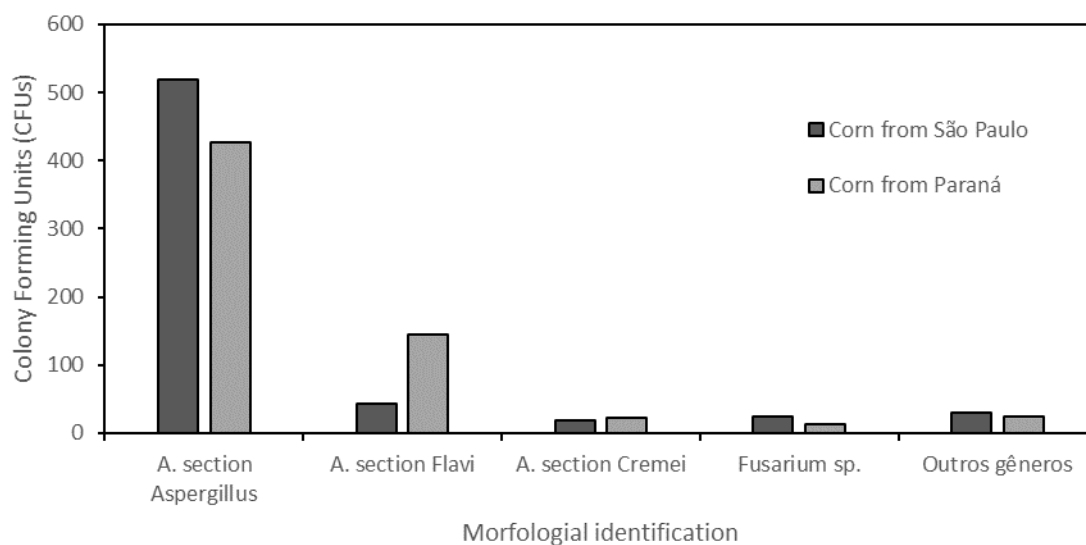


Figure 1 – Incidence of CFUs in corn grains related to the origin of the sample.

So, according to geographic origin and morphological identification of sample we selected and isolated 53 CFUs including *Aspergillus* and *Fusarium* genus, for the analysis of similarity genetic profiles and species identification.

Similarity genetic profile analysis and identification of species from corn grains

The similar genetic profile was obtained with four selective primer pairs combinations generated 757 fragments, all being polymorphic (100%). The region considered for similarity calculation was 75 to 450 bp.

The Neighbor-Net clustering with 53 isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* genera showed the formation of five clusters (I, II, III, IV and V) (Fig. 2). The cluster I was obtained with 189 polymorphic fragments and most isolates were allocated in this cluster (28 isolates). The cluster II was constituted by 132 polymorphic fragments and allocated 17 isolates. Cluster III was composed of 186 polymorphic fragments, allocating 04 isolates, while cluster IV cluster was formed with 180 fragments, allocating 02 isolates and cluster V, also allocating 02 isolates, was composed of 86 polymorphic fragments.

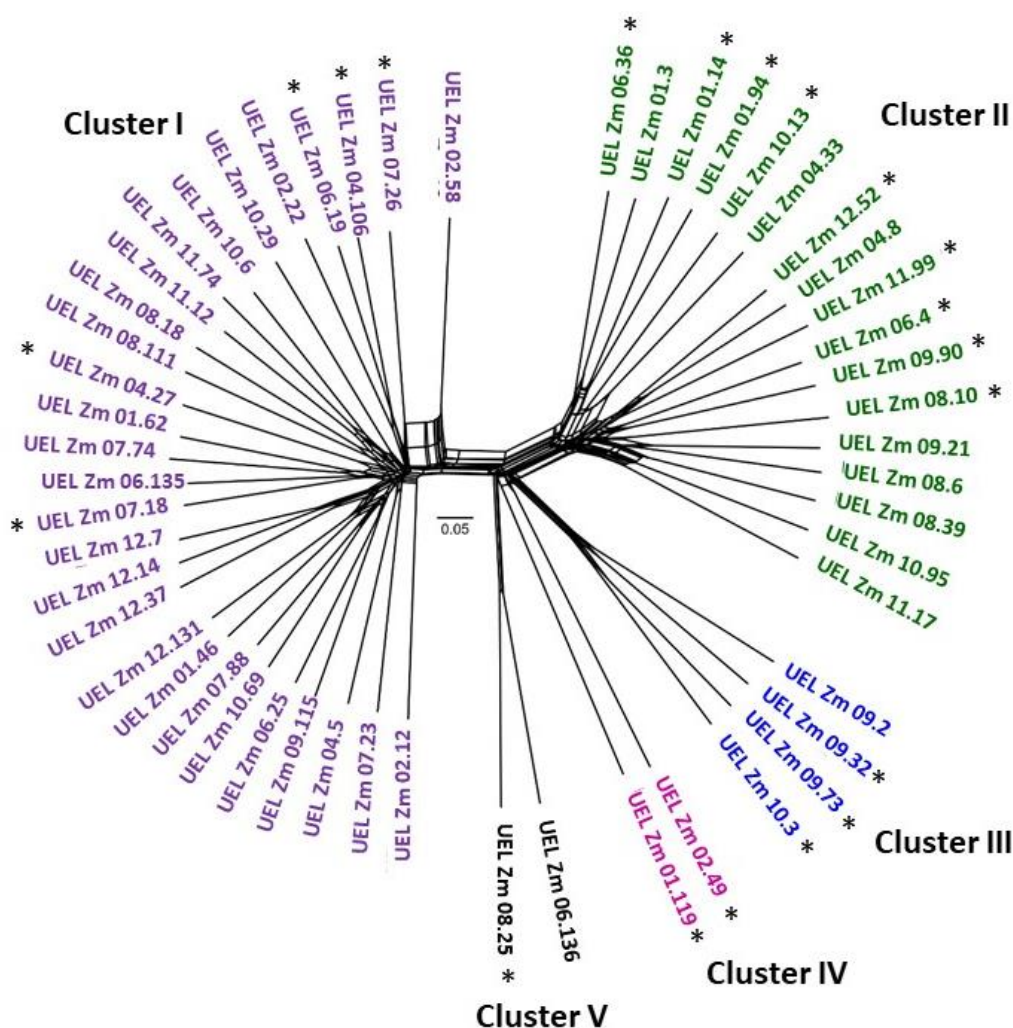


Figure 2 - Neighbor-net constructed with 53 isolates from post-harvest corn collect from 2 Brazilian states. It was used Principal Coordinate Analysis (PCoA) method to create a matrix distance and Molecular Variância Analysis (AMOVA). The isolates were into 5 clusters (Cluster I, II, III, IV and V).

* Selected isolates representing samples and clusters for molecular identification.

All isolates identified morphologically as *Aspergillus* section *Flavi* were allocated in cluster I, while isolates identified as *A.* section *Aspergillus* were allocated in clusters II and III. The isolates identified as *A.* section *Cremeri* were placed in cluster IV, while the isolates identified as *Fusarium* sp. were in cluster V. The Neighbor-Net constructed with 53 isolated of corn grains showed the formation of five distinct clusters according to Principal Coordinate Analysis data (PCoA) (Fig. 3).

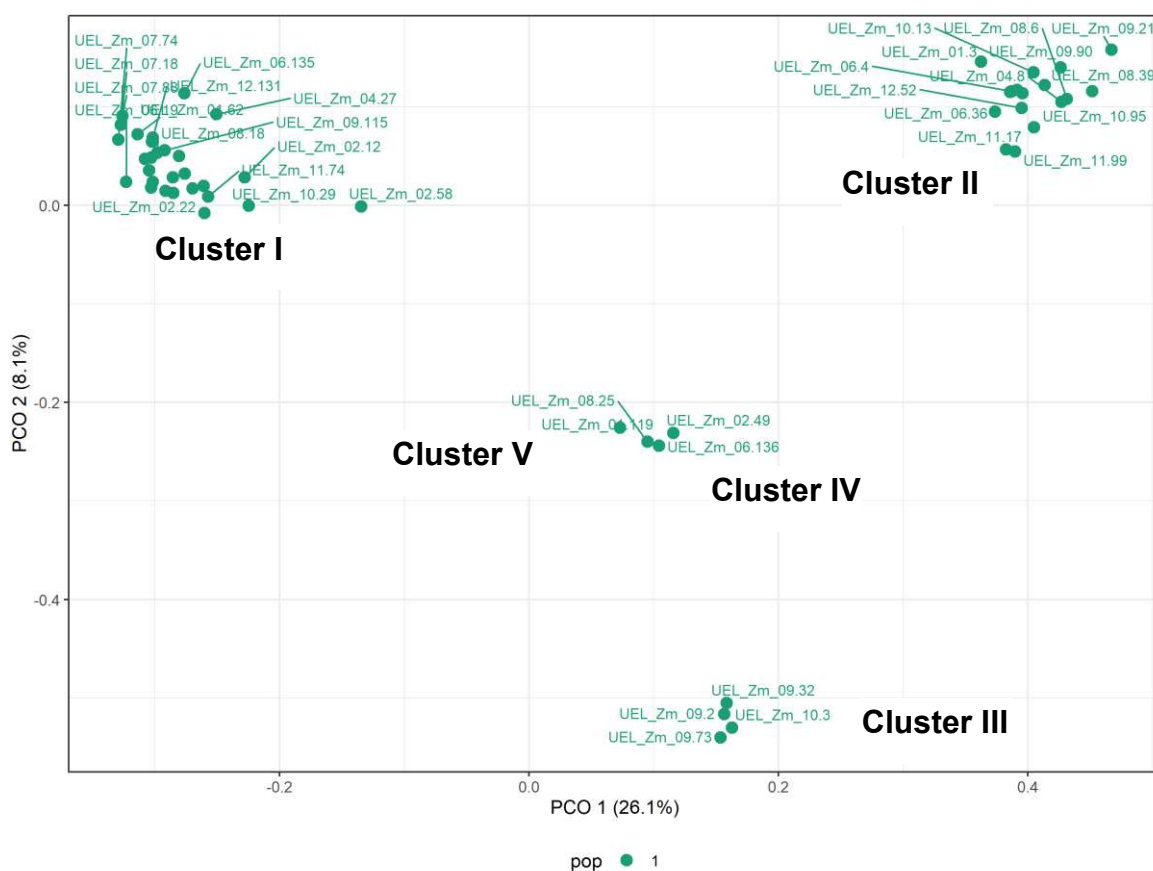


Figure 3 - Principal Coordinate Analysis data - PCoA whit isolates of *Aspergillus* from clusters I, II, III, IV and V.

The Variance Molecular Analysis (AMOVA) carried out among the five clusters showed a percentual variation of 48.03, with F_{ST} for the five clusters is the 0.48, consisting with distinct species or genera.

The genetic diversity index (H_j) was calculated only for the clusters with the highest number of isolates, I cluster $H_j = 0.07$, II cluster $H_j = 0.05$ and III cluster $H_j = 0.11$.

The similar genetic profile of the isolates allowed to select isolates of each cluster for the sequencing of partial regions of the *BenA* and *CaM* gene. The criteria for selection of isolates were the origin of the sample and the representation of the group. The 20 representatives isolated from genetic profile cluster selected were: cluster I – UEL Zm 4.27, UEL Zm 4.106, UEL Zm 6.19, UEL Zm 7.18 and UEL Zm 7.26; cluster II – UEL Zm 1.14, UEL Zm 1.94, UEL Zm 6.4, UEL Zm 6.36, UEL Zm 8.10, UEL Zm 9.90, UEL Zm 10.13, UEL Zm 11.99 and UEL Zm 12.52; cluster III – UEL Zm 9.32, UEL Zm 9.73 and UEL Zm 10.3; cluster IV – UEL Zm 2.49 and UEL Zm 1.119 and cluster V – UEL Zm 8.25 (Table 2).

Table 2. Identification of species of isolates by partial sequencing of β -tubulin (*BenA*) and calmodulin (*CaM*) genes.

Isolated	Geographic Origin	Genus	Section	Cluster*	Species
UEL Zm 04.27	Paraná	<i>Aspergillus</i>	<i>Flavi</i>	I	<i>A. flavus/oryzae</i>
UEL Zm 04.106	Paraná	<i>Aspergillus</i>	<i>Flavi</i>	I	<i>A. flavus/oryzae</i>
UEL Zm 06.19	Paraná	<i>Aspergillus</i>	<i>Flavi</i>	I	<i>A. flavus/oryzae</i>
UEL Zm 07.18	Paraná	<i>Aspergillus</i>	<i>Flavi</i>	I	<i>A. flavus/oryzae</i>
UEL Zm 07.26	Paraná	<i>Aspergillus</i>	<i>Flavi</i>	I	<i>A. flavus/oryzae</i>
UEL Zm 01.14	Paraná	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	II	<i>A. chevalieri</i>
UEL Zm 01.94	Paraná	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	II	<i>A. chevalieri</i>
UEL Zm 06.4	Paraná	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	II	<i>A. chevalieri</i>
UEL Zm 06.36	Paraná	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	II	<i>A. chevalieri</i>
UEL Zm 08.10	São Paulo	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	II	<i>A. chevalieri</i>
UEL Zm 09.90	São Paulo	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	II	<i>A. chevalieri</i>
UEL Zm 10.13	São Paulo	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	II	<i>A. chevalieri</i>
UEL Zm 11.99	São Paulo	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	II	<i>A. chevalieri</i>
UEL Zm 12.52	São Paulo	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	II	<i>A. chevalieri</i>
UEL Zm 09.32	São Paulo	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	III	<i>A. montevidensis</i>
UEL Zm 09.73	São Paulo	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	III	<i>A. montevidensis</i>
UEL Zm 10.3	São Paulo	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	III	<i>A. montevidensis</i>
UEL Zm 01.119	Paraná	<i>Aspergillus</i>	<i>Cremeri</i>	IV	<i>A. dimorphicus</i>
UEL Zm 02.49	Paraná	<i>Aspergillus</i>	<i>Cremeri</i>	IV	<i>A. wentii</i>
UEL Zm 08.25	São Paulo	<i>Fusarium</i>		V	<i>Fusarium verticillioides</i>

* Grouped according to genetic profile (AFLP analysis).

Sequences obtained from the *Aspergillus* genus were compared to those sequences available in the NCBI database (www.ncbi.nlm.nih.gov/). All isolates allocated in cluster I were identified as *Aspergillus flavus/oryzae* group (Fig.04 A, B). The isolates allocated in cluster II were identified as *Aspergillus chevalieri*, while the isolates allocated in the cluster III were identified as *Aspergillus montevidensis* (Fig.05 A, B). The isolates allocated in cluster IV were identified as *A. dimorphicus* and *A. wentii* (Fig. 06) and those allocated in cluster V were identified as *Fusarium verticillioides*.

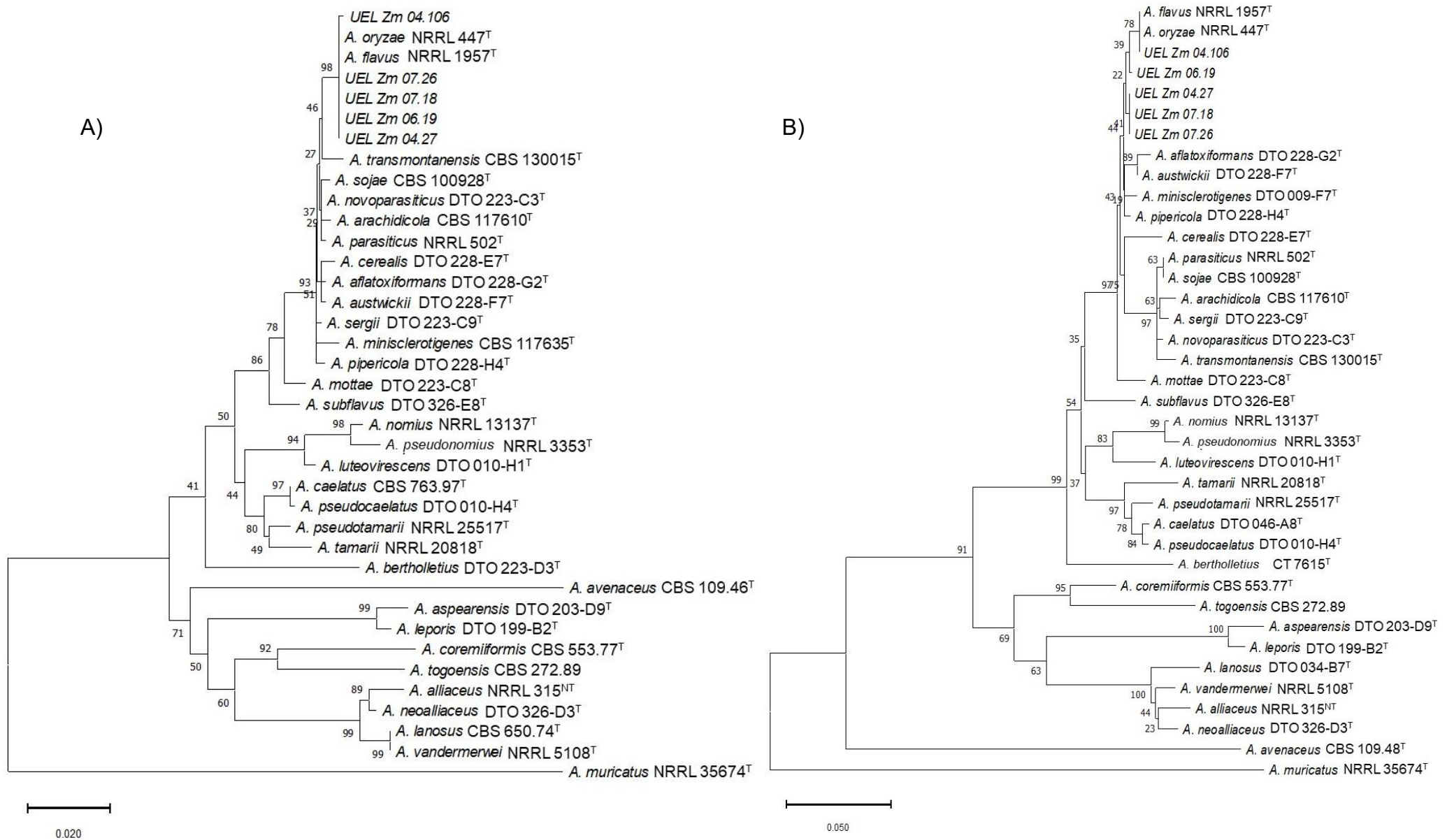


Figure 4. Phylogenetic trees constructed based on data for partial sequences for **(A)** β -tubulin (*BenA*) and **(B)** calmodulin (*CaM*) genes for *Aspergillus* section *Flavi*. Parameter or Kimura model (K2+G), using distance data from Neighbor-Joining (NJ) method and bootstrap analysis with 1,000 replicates, having *Aspergillus muricatus* as outgroup.

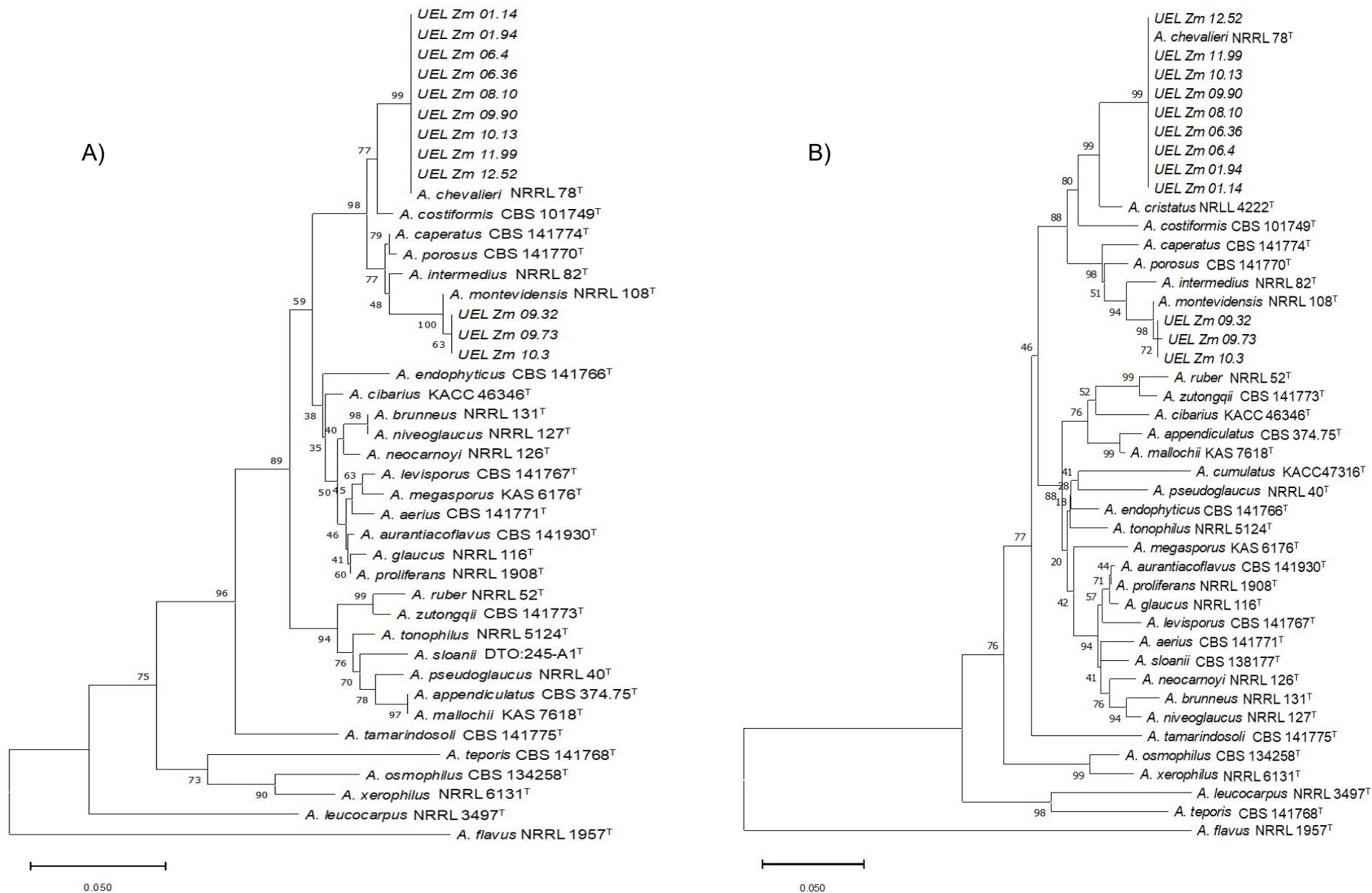


Figura 5. Phylogenetic trees constructed based on data for partial sequences for **(A)** β -tubulin (*BenA*) and **(B)** calmodulin (*CaM*) genes for *Aspergillus* section *Aspergillus*. Parameter or Kimura model (K2+G), using distance data from Neighbor-Joining (NJ) method and bootstrap analysis with 1,000 replicates, having *Aspergillus flavus* as outgroup.

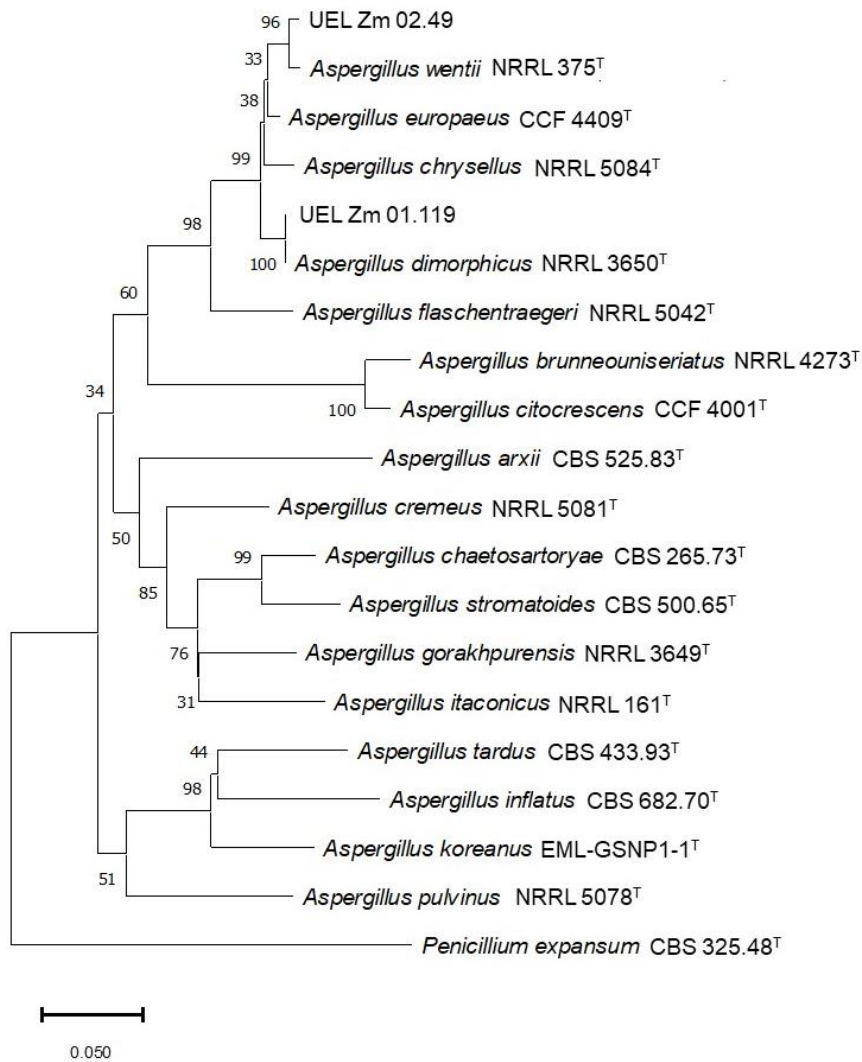


Figure 6. Phylogenetic tree constructed based on data for partial sequences for β -tubulin gene (*BenA*) for *Aspergillus* section *Cremei*. Parameter or Kimura model (K2+G), using distance data from Neighbor-Joining (NJ) method and bootstrap analysis with 1,000 replicates, having *Penicillium expansum* as outgroup.

5.1.4 DISCUSSION

The infection of food by fungi impairs the quality of the product, reducing the nutritional properties and resulting in economic losses (MUNKVOLD et al, 2019). It is also known that some species of fungi are potentially mycotoxins producers, a serious health threat for animals and humans (AWUCHI et al. 2022; FERNANDES et al., 2022; BENNET; KLICH, 2003). The genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* are among the mainly mycotoxin producers that infect cereals, including corn grains (GASPERINI et al., 2021; XING et al., 2018; VEGI; WOLF-HALL, 2013). And according to this study in which *Aspergillus* species was predominant (92.8 %), other reports showed high incidence of *Aspergillus* sp. in the range 72.2 % and 80.9 % in post-harvest corn grains (EKPAKPALE et al. 2021; JEDIDI et al. 2018; AZEVEDO et al. 1994).

The high incidence of *Aspergillus* sp. in stored corn grains has been associated with the abiotic conditions of the grains, mainly the water availability and temperature. Species of *Aspergillus* sp. and *Fusarium* sp. growth under reduced water activity, on the other hand, *Fusarium* sp. has better grow at reduced temperatures, around to 25 °C, while *A. flavus* has optimal growing at 30 to 37 °C (MARÍN et al., 1998; 2000), environmental conditions like main corn producing areas in Brazil. The low incidence of *Fusarium* sp. in this study is probably related to both abiotic factors.

Studies have shown that the high incidence of *Aspergillus* sp. in stored corn grains is caused by some groups of species such as those of *A.* section *Flavi*, especially *A. flavus*, which have a high potential for mycotoxins producing such as aflatoxins (SHABANNA et al., 2022; BAILLY et al., 2018; JEDIDI et al., 2018; ADETUNJI et al., 2014; FARIAS et al., 2000).

However, *A.* section *Flavi* was found as the second most incident group of *Aspergillus* species (16 %). In contrast, the highest incidence of *Aspergillus* in corn grains was given for *Aspergillus* section *Aspergillus* (80.6 %). This section has been reorganized (HUBKA et al 2013; CHEN et al. 2017) and the teleomorphic form of the *Eurotium* genus have been inserted into the *Aspergillus* section *Aspergillus*. This section too allocate xerophilic species that actively contribute to the deterioration of stored grain and other substrates (BRITO et al., 2022).

The occurrence of *A.* section *Aspergillus* species with toxigenic species like section *Flavi*, infecting stored grains has been attributed mainly to release of metabolic water. Marín et al. (2000), verified that species from section *Aspergillus*, showed better growth in lower

water activities (a_w 0.85 – 0.90), generally found in stored grains. In consequence, the increase the water activity (a_w 0.90 – 0.95) by those species of *A.* section *Aspergillus* change the physical-chemical properties of the substrates favoring the growth of others less xerophilics species, including those species of *A.* section *Flavi*, as *A. flavus* and *Fusarium* sp., leading to the mycotoxins producing.

In order to identify which *Aspergillus* and *Fusarium* species infect corn grains, the genetic profile of the representative isolates showed a high genetic differentiation between isolates with the formation of five distinct clusters (F_{ST} 0.48) reflecting the existing genetic diversity between cluster. According to the genetic profile, all isolates identified morphologically as *A.* section *Flavi* were allocated in the same group (cluster I), with high similarity (H_j 0.07) between isolates, indicative of belonging to the same species. Interestingly, the isolates found with the highest incidence in this study (*A.* section *Aspergillus*), were distributed into two distinct groups (clusters II and III), with H_j (H_{jII} 0.05 and H_{jIII} 0.11, respectively), consistent with the presence of two distinct species within *A.* section *Aspergillus* in corn grains.

Furthermore, cluster III was the second group with the highest genetic diversity (H_j 0.11), in contrast to cluster II (H_j 0.05), whose genetic diversity index was lower among all the isolates evaluated. And to agree with morphological data, the isolates less incident in corn grains and identified as *A.* section *Cremeri* and *Fusarium* sp. were allocated in IV and V clusters, respectively, in which *A.* section *Cremeri* although represented by only two isolates, was the cluster with the highest genetic diversity index, possibly harboring different species.

The identification of species that infect corn grains is of importance to understand the ecological dynamics and develop strategies that contribute to the minimization or growth of potentially mycotoxin-producing species. In this sense, the identification of the species composition of the profile genetic clusters is relevant.

Representatives of cluster I were identified as *A. flavus* or *A. oryzae* group. Among the *Aspergillus* species isolated, *A. flavus* was the only aflatoxin-producing species and was the most abundant species in all (ADETUNJI et al. 2014, CHANG, et al. 2010), while *A. oryzae* is an important specie used in food industry and conventional oriental foods (PITT; HOCKING, 2009; CHANG et al., 2010). On the other hand, both species share numerous genetic markers such as those of partial regions of *BenA* e *CaM* genes among others and it is difficult to distinguish between them (CHANG et al, 2010). As in this study, in general,

these markers are able to distinguish the *A.flavus/A.oryzae* group from the others members of section *Flavi* but not distinguish *A. flavus* from *A. oryzae*. Recently, Nargesi et al. (2021), distinguished *A. flavus* from *A. oryzae* based on four polymorphic markers in the *cyp51A* gene.

Representatives of II and III clusters were identified as *A. chevalieri* and *A. montevidensis* (= *Eurotium amesterlodami*), respectively. These species included in the *A. chevalieri* clade, have been reported to infect food products with reduced water activity, such as stored grains and cereals, including corn, rice, barley (ITO et al., 1973, FARIAS et al., 2000), feedstuffs (GRECO et al., 2015; HONG, et al., 2011), alfalfa stalks (LIU, et al., 2022), fermented products with soy and fish (HONG et al., 2011, KIM; JI., 2014) among others substrates. *Aspergillus chevalieri* has been reported in corn grains (WICKLOW; WEAVER; THRONE, 1998; PITT, 1998), however, information of infection corn grains by *Aspergillus montevidensis* has been little reported (FARIAS et al., 2000). And in fact, in this study *A. chevalieri* was found in greater quantity than *A. montevidensis* in corn grains. *A. montevidensis* was isolated and cultured under hypersaline water conditions (DING et al., 2019; LIU et al., 2017), suggest this specie has potential biotechnological.

A. chevalieri and *A. montevidensis* have been reported as producers of secondary metabolites that have antioxidant activity and may be beneficial to health (MIYAKE et al., 2009; GRECO et al., 2015). In contrast, none of those compounds are classified as mycotoxins (BENNETT; KLICH, 2003).

In conclusion, *A. section Aspergillus* represented by *A. chevalieri* and *A. montevidensis* was predominant in corn grains intended for animal feed production. Although both species are reported as not production mycotoxins, section *Flavi* species such as those in the *A. flavus / A. oryzae* group have been reported as the second most incident section in corn grains, along with *F. verticillioides* potentially producing mycotoxins, causing risk. These data impact the maintenance of adequate agricultural practices to prevent economic losses and ensure food safety. Additionally, the data from this study are essential for the subsequent development of formulations that can prevent the development of these fungi in corn kernels.

6 REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS:

ADETUNJI, C.; ATANDA, O.; EZEKIEL, C.N.; OGARA, I.M. The distribution and mycotoxigenicity of fungal isolates of stored maize grains from five agro-ecological zones of Nigeria. **Mycotoxicology**, v.1, p.19–28, 2014.

AWUCHI, C.G.; ONDARI, E.N.; NWOZO, S.; ODONGO, G.A.; ESEOGHENE, I.J.; TWINOMUHWESI, H.; OGBONNA, C.U.; UPADHYAY, A.K; ADELEYE, A.O.; OKPALA, C.O.R. Mycotoxins' toxicological mechanisms involving humans, livestock and their associated health concerns: A Review. **Toxins**, v.14, p.167, 2022.

AZEVEDO, I.G.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B.; PAULA, C.R.; ALMEIDA, R.M.A.; SOUZA, V.M. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp. isolated from stored maize. **Revista de Microbiologia**, v.25, n.1, p.46-50, 1994.

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

BAILLY, S.; EL MAHGUBI, A.; CARVAJAL-CAMPOS, A. LORBER, S.; PUEL, O.; OSWALD, I.P.; BAILLY, J.-D.; ORLANDO, B. Occurrence and identification of *Aspergillus* section *Flavi* in the context of the emergence of aflatoxins in French maize. **Toxins**, v.10, p. 525, 2018.

BENNETT, J.; KLICH, M.A. Mycotoxins. **Clinical Microbiological Reviews**, v.16, n.3, p.497–516, 2003.

BHATTACHARYA, K.; RAHA, S. Deteriorative changes of maize, groundnut, and soybean seeds by fungi in storage. **Mycopathologia**, v.155, p.135-141, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa N° 60, de 23 de dezembro de 2011. Estabelece o Regulamento Técnico do Milho. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 246, 23 dez. 2011. Seção 1, p. 3-5.

BRASIL, Ministério da Saúde, Instrução Normativa N° 88, de 26 de março de 2021. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 31 mar. 2021, 61ed., Seção 1, p.226.

BRITO, V.D.; ACHIMON, F.; ZUNINO, M.; ZYGADLO, J.; PIZZOLITTO, R.P. Fungal diversity and mycotoxins detected in maize stored in silo-bags: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.102, n.7, p.2640-2650, 2022.

CARVAJAL-MORENO, M. Mycotoxin challenges in maize production and possible Control methods in the 21st century. **Journal of Cereal Science**, jul. 2021.

CASTELLARI, C.C.; CENDOYAA, M.G.; VALLE, F.J.M.; BARRERA, V.; PACIN, A.M. Factores extrínsecos e intrínsecos asociados a poblaciones fúngicas micotoxigénicas de granos de maíz (*Zea mays* L.) almacenados en silos bolsa en Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v.47, p.350-359, 2015.

CHANG, P.K; EHERLICH, K.C. What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*? **International Journal of Food Microbiology**, v.138, n.3, p.189-199, 2010.

CHEN, A.J.; HUBKA, V.; FRISVAD, J.C.; VISAGE, C.M.; HOUBAKENS, J.; MEIJER, J.; VARGA, J.; DEMERIEL, R.; JURJÉVIC, Z.; KUBÁTOVÁ, A.; SKLENÁR, F.; ZHOU, Y.G.; SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*), and its occurrence in indoor environments and food. **Studies in Mycology**, v.88, p.37-135, 2017.

CNA. Disponibilidade de milho do mercado brasileiro e perspectivas para 2022. **Mercado em Foco**, ed.3, ago. 2021. Disponível em: <<https://cnabrasil.org.br/assets/arquivos/dtec.Mercado-em-foco3-disponibilidade-milho.12ago2021.vf.pdf>>, Acesso em: 02 dez. 2021.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Grãos Safra 2022/23 1º Levantamento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. disponível em <<http://www.conab.gov.br>>, Acesso em 28 nov. 2022.

CHULZE, S.N. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. **Food Additives and Contaminants**, v.27, p.651-657, 2010.

DING X.; LIU, K.; LU, Y.; GONG, G. Morphological, transcriptional, and metabolic analyses of osmotic-adapted mechanisms of the halophilic *Aspergillus montevicensis* ZYD4 under hypersaline conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, n.9, p.3829-3846, 2019.

EMBRAPA MILHO E SORGO. Cultivo do milho. **Sistemas de Produção Embrapa**, 9. ed., Sete Lagoas, MG, 2015. Disponível em:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/486917/1/Sistema-de-Producao-Cultivo-do-Milho.pdf>> Acesso em: 12 jan. 2023.

EKPAKPALE, D.O.; KRAAK, B.; MEIJER, M.; AYENI, K.I.; HOUBRAKEN, J.; EZEKIEL, C.N. Fungal Diversity and Aflatoxins in Maize and Rice Grains and Cassava-Based Flour (Pupuru) from Ondo State, Nigeria. **Journal of Fungi**, v.7, n.8, p.635, 2021.

EL-AZIZ A.R.M.A.; SHEHATA, S.M.; HISHAM, S.M.; ALOBATHANI, A.A. Molecular profile of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* isolated from stored maize. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.28, p.1383-1391, 2021.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Biannual Report on Global Food Markets. **Food Outlook**, jun. 2022.

FARIAS, A.X.D.; ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.; ANDERSEN, P.; CORRÊA, T.B.S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.617-621, 2000.

FERNANDES, J.I.M.; BALDO, A.S.; FERREIRA, A.C.P.; SCHUROFF, J.S.; REUTER, A.H.; SALINAS, B.C.D. Effect of adsorbents on diets with corn contaminated by mycotoxins on the productive performance and health of broilers. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.44, e53575, 2022.

FRISVAD, J.C.; HUBKA, V.; EZEKIEL, C.N.; HONG, S.B.; NOVÁKOVÁ, A.; CHEN, A.J.; ARZANLOU, M.; LARSEN, T.O.; SKLENÁR, F.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R.A. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. **Studies in mycology**, v. 93, p. 1-63, 2019.

GASPERINI, A.M.; GARCIA-CELA, E.; SULYOK, M.; MEDINA, A.; MAGAN, N. Fungal diversity and metabolomic profiles in GM and isogenic non-GM maize cultivars from Brazil. **Mycotoxin Research** v.37, p.39–48, 2021.

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.

GRECO, M.; KEMPPAINEN, M.; POSE, G.; PARDO, A. Taxonomic characterization and secondary metabolite profiling of *Aspergillus* section *Aspergillus* contaminating feeds and feedstuffs. **Toxins**, v. 7-9, p. 3512-3537, 2015.

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

HOUBRAKEN, J.; KOCSUBÉ, S. VISAGIE, C.M.; YILMAZ, N.; WANG, X.-C.; MEIJER, M.; KRAAK, B.; HUBKA, V.; BENSCH, K.; SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, v. 95, p. 5-169, 2020.

HOUBRAKEN, J.; DE VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in Applied Microbiology**, v. 86, p. 199-249, 2014.

HUBKA, V.; KOLARIK, M.; KUBÁTOVÁ, A.; PETERSON, S.W. Taxonomic revision of

Eurotium and transfer of species to *Aspergillus*. **Mycologia**, v.105, n.4, p.912-937, 2013.

IARC. Toxins derived from *Fusarium moniliforme*: fumonisins B1 and B2 and fusarin C. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v.56, p.455-466, 1993. Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc>, acesso em: 12 jan. 2023

IARC. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v.82, p.301–366, 2002. Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc>, acesso em: 12 jan. 2023.

IARC. Chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v.100F, p.224–248, 2012. Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc>, acesso em: 12 jan. 2023.

ITO, H.; IIZUKA, H.; SATO, T. Identification of osmophilic *Aspergillus* isolated from rice and their radio-sensitivity. **Agricultural and biological chemistry**, v.37, n.4, p.789-798, 1973.

JEDIDI, I.; SOLDEVILLA, C.; LAHOUAR, A.; MARÍN, P.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T.; SAID, S. Mycoflora isolation and molecular characterization of *Aspergillus* and *Fusarium* species in Tunisian cereals. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.25, p.868-874, 2018.

KAAYA, A.N.; KYAMUHANGIRE, W. the effect of storage time and agroecological zone on mould incidence and aflatoxin contamination of maize from traders in Uganda. **International Journal of Food Microbiology**, v.110, n.3, p.217-223, 2006.

KIM, N.Y.; JI, G.E. Characterization of soybean fermented by aflatoxin non-producing *Aspergillus oryzae* and γ -aminobutyric acid producing *Lactobacillus brevis*. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v.57, n.6, p.703-708, 2014.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v.35, p. 1547-1549, 2018.

LEE, J.T.; JESSEN, K.A.; BELTRAN, R.; STARKL, V.; SCHATZMAYR, G.; BORUTOVA, R. CALDWELL, D.J. Effects of mycotoxin-contaminated diets and deactivating compound in laying hens: 2. Effects on white shell egg quality and characteristics. **Poultry Science** v.91, p.2096–2104, 2012.

LEITE, M.; FREITAS, A.; SILVA, A.S.; BARBOSA, J.; RAMOS, F. Maize food chain and mycotoxins: A review on occurrence studies, **Trends in Food Science & Technology**, v.115, p.307-331, 2021.

LIU K.H.; DING, X.W.; NARSING RAO, M.P.; ZHANG, B.; ZHANG, Y.G.; LIU, F.H.; LIU, B.B.; XIAO, M.; LI, W.J. Morphological and transcriptomic analysis reveals the osmoadaptive response of endophytic fungus *Aspergillus montevidensis* ZYD4 to high salt stress. **Frontiers in Microbiology**, v.21, n.8, p.1789, 2017.

LIU, K.; DING, X.; WANG, G; LIU, W. Complete Genome Sequencing of Halophilic Endophytic *Aspergillus montevidensis*, Strain ZYD4, Isolated from Alfalfa Stems Grown in Saline-Alkaline Soils. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.35, n.9, p.867-869, 2022.

MAHMOUD, M. A.; ALI, H.M.; EL-AZIZ, A.R.M.; AL-OTHMAN, M.R.; AL-WADAI, A.S. Molecular characterization of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates collected from corn grains. **Genetics and Molecular Research**, v.13, n.4, p.9352-9370, 2014.

MANNA, M.; KIM, K.D. Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage. **Mycobiology**, v.45, n.4, p.240-254, 2017.

MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RULL, F.; RAMOS, A. J.; MAGAN, N. Colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. **Journal of Food Protection**, v.61, p. 1489-1496, 1998.

MARÍN, S.; MAGAN, N.; ABELLANA, M.; CANELA, R.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Selective effect of propionates and water activity on maize mycoflora and impact on fumonisin B1 accumulation. **Journal of Stored Products Research**, v.36, p.203-214, 2000.

MISHAIRABGWI, J.M.; EZEKIEL, C.N.; SULYOK, M.; SHEPHARD, G.S.; KRASKA, R. Mycotoxin contamination of foods in Southern Africa: A 10-year review (2007–2016), **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.59, p. 43-58, 2019.

MIYAKE, Y.; ITO, C.; IOTIGAWA, M; OSAWA, T. Antioxidants produced by *Eurotium herbariorum* of filamentous fungi used for the manufacture of karebushi, dried bonito (Katsuobushi). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.73, n.6, p.1323-1327, 2009.

MUNKVOLD, G.P.; ARIAS, S.; TASCHL, I.; GRUBER-DORNINGER, C. Mycotoxins in corn: Occurrence, impacts, and management. In Corn. **AACC International Press**. p.235-287, 2019.

NARGESI, S.; ABASTABAR, M.; VALADAN, R.; MAYAHI, S.; YOUN, J-H.; HEDAYATI, M. T.; SEYEDMOUSAVI, S. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus oryzae* targeting the *cyp51A* gene. **Pathogens**, v.10, p.1279, 2021.

NEME, K.; MOHAMMED, A. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest

management as a mitigation strategies. A review. **Food Control**, v.78, p.412–425, 2017.

OLIVEIRA, M.S.; ROCHA, A.; SULYOK, M.; KRŠKA, R.; MALLMANN, C.A.M. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. **Food Control**, v.73, p.127-132, 2017.

PAES, M.C.D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Circular Técnica. Embrapa**, v.75, 2006.

PITT, J.I.; HOCKING, A. D.; MISCAMBLE, B. F.; DHARMAPUTRA, O. S.; KUSWANTO K. R.; RAHAYU, E. S.; SARDJONO. The mycoflora of food commodities from Indonesia. **Journal of Food Mycology**, v.1, n.1, p.41-60, 1998.

PITT, J.I. Toxigenic Fungi and Mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v.56, p.184–192, 2000.

PITT, J.I.; HOCKING, A. D. *Aspergillus* and Related Teleomorphs. In: _____. **Fungi and Food Spoilage**. 3.ed. New York: Springer, 2009. p. 275-295.

R CORE TEAM R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org/> . Acesso em: 07 jan. 2023.

SHABANA, Y.M.; GHONEEM, K.M.; RASHAD, Y.M.; ARAFAT, N.S.; FITT, B.D.L.; RICHARD, B.; QI, A. Distribution and biodiversity of seed-borne pathogenic and toxigenic fungi of maize in Egypt and their correlations with Weather variables. **Plants**, v.11, n.18 p.2347, 2022.

SINDIRAÇÕES - **Boletim Informativo do Setor** – Maio /2022. Disponível em: <https://sindiracoes.org.br/produtos-e-servicos/boletim-informativo-do-setor>>. Acesso em: 30 nov. 2022.

SUANTHIE, Y.; COUSIN, M.A.; WOLOSHUK, C.P. Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.2, p.139-145, 2009.

SULEIMAN, R.A.; KURT, R.A. Current maize production, postharvest losses and the risk of mycotoxins contamination in Tanzania. In 2015 ASABE Annual International Meeting (p. 1). **American Society of Agricultural and Biological Engineers**. 2015

VEGI, A.; WOLF-HALL, C.E. Multiplex real-time PCR method for detection and quantification of mycotoxigenic fungi belonging to three different genera. **Journal of Food Science**, v.78, n1, p.M70-M76, 2013.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERA, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEA, U. M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WICKLOW, D.T.; WEAVER, D.K.; THORNE, J.E. Fungal colonists of maize grain conditioned at constant temperatures and humidities. **Journal of Stored Products Research**, v.34, n.4, p.355-361, 1998.

XING, H. Q.; MA, J.-C.; XU, B.-L.; ZHANG, S.-W.; WANG, J.; YANG, X.-M. Mycobiota of maize seeds revealed by rDNA-ITS sequence analysis of samples with varying storage times. **Microbiology Open**, v.7, e609, 2018.