

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

AVALIAÇÃO DO USO DO SISTEMA DE CÓDIGO DE BARRAS DE DNA PARA
IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS POTENCIALMENTE MICOTOXIGÊNICOS
ISOLADOS DE MILHO E DERIVADOS

por

Daniela Peralva Lima

Belo Horizonte

Agosto/2015

DISSERTAÇÃO MBCM-CPqRR

D. P. LIMA

2015

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

AVALIAÇÃO DO USO DO SISTEMA DE CÓDIGO DE BARRAS DE DNA PARA
IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS POTENCIALMENTE MICOTOXIGÊNICOS
ISOLADOS DE MILHO E DERIVADOS

por

Daniela Peralva Lima

Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em Ciências
na área de concentração Biologia Celular e
Molecular

Orientação: Guilherme Corrêa de Oliveira

Co-orientação: Aristóteles Góes Neto

Belo Horizonte

Agosto/2015

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

L732a
2015

Lima, Daniela Peralva.

Avaliação do uso do sistema de código de barras de DNA para identificação de fungos potencialmente micotoxigênicos isolados de milho e derivados / Daniela Peralva Lima. – Belo Horizonte, 2015.

XX, 108 f: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 115 – 128

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. DNA/isolamento & purificação 2. Fungos/classificação 3. Microbiologia de Alimentos. Título. II. Oliveira, Guilherme Corrêa (Orientação). III. Góes Neto, Aristóteles (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 611.018 166

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

AVALIAÇÃO DO USO DO SISTEMA DE CÓDIGO DE BARRAS DE DNA PARA
IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS POTENCIALMENTE MICOTOXIGÊNICOS
ISOLADOS DE MILHO E DERIVADOS

por

Daniela Peralva Lima

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Aristóteles Góes Neto (Presidente)

Dra. Roberta Lima Caldeira

Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro

Dissertação defendida e aprovada em 28/08/2015

Ao meu amado filho Vitor, que chegou no decorrer deste trabalho com toda a sua alegria, esperteza e amor, colorindo ainda mais a nossa vida.

Agradecimentos

À querida Jovita Gazzinelli, pelo incentivo e persistência. Graças a você pude ver a beleza dos “funguinhos”.

À Fundação Ezequiel Dias por ter possibilitado e apoiado a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação do CPqRR por possibilitar o meu retorno a uma instituição na qual fui muito feliz no passado e fiz amigos maravilhosos para toda a vida.

Ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde – PDTIS/FIOCRUZ pela disponibilização da plataforma de Sequenciamento de DNA e Genotipagem (RPT01E).

Ao Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira por ter aceitado a proposta deste trabalho e disponibilizado os serviços da Plataforma de Sequenciamento.

Ao Dr. Aristóteles Góes Neto, pela orientação, e por todo o seu positivismo e entusiasmo nos momentos de desespero.

Às técnicas da Plataforma de Sequenciamento, Elis (Elisângela Monteiro) e Renata Oliveira, pelas reações e toda a atenção despendida.

Aos colegas da pós-graduação, em especial aos amigos Isabela (sempre Isabelinha) e Felipe, pelas experiências compartilhadas e pela ajuda em diversos momentos.

Ao Professor Dr. Ludwig Pfenning por abrir as portas do seu laboratório, e Maru e Edinho pela grande ajuda na identificação de *Fusarium*.

Ao Laboratório de Microscopia de Produtos da FUNED por possibilitar o registro fotográfico microscópico dos fungos.

A todos do Serviço de Ciências Bioquímicas, principalmente do Laboratório de Micologia pelas identificações morfológicas.

Especialmente à Mabel por toda a paciência e ajuda na identificação dos fungos e pelos bons momentos na viagem à Lavras.

Às amigas do Laboratório de Biologia Molecular: “Chefa”, Glaucinha, Vivi, Helena, Thaianne, Elizeth e Mada, por tornarem o ambiente de trabalho agradável e prazeroso neste período.

Aos que, científica, técnica e/ou emocionalmente, contribuíram na conclusão dessa dissertação: Alysson Silvano, Aristóteles Góes-Neto, Mabel Caldeira, Guilherme Prado, Jovita Gazzinelli, Marize Oliveira, Fabiano Paschoal.

Aos meus amigos fiéis (alguns perto, outros longe fisicamente), sei que torcem por mim independente da distância.

À amiga-irmã-comadre Daniela Nabak pela disponibilidade incondicional para TODOS os assuntos acadêmicos, profissionais e pessoais.

Aos meus pais, Alcione e Francisco, por tudo o que fizeram por mim para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao Alysson, grande incentivador e apoiador das minhas decisões; melhor amigo, companheiro e pai que eu poderia encontrar.

À Deus, sempre presente em minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro aos projetos:

“Biodiversidade de fungos micotoxigênicos em grão de milho de cultivo convencional, orgânico e transgênico por taxonomia clássica e molecular”

Edital MCT-SECIS/CNPq N° 019/2010

Coordenadora: Jovita E. Gazzinelli Cruz Madeira

“Identificação molecular de fungos do Brasil” – Identificação Molecular da Biodiversidade, visando a formação de uma Rede de Pesquisa Nacional de Identificação Molecular da Biodiversidade Brasileira - Rede brasileira de identificação molecular da biodiversidade/ BR-BoL

Edital MCT/CNPq/FNDCT N° 50/2010

Coordenador: Aristóteles Góes Neto

À Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) pelo financiamento do convênio:

“Implantação e validação de metodologias e análises de alimentos que visam verificar a conformidade com a Resolução – RDC nº 7, de 18 fevereiro de 2011”

MS-ANVISA 04/2011

Coordenadora: Marize Silva de Oliveira

Ao Programa de Capacitação de Recursos Humanos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (PCRH-FAPEMIG) pela bolsa parcial de mestrado concedida – Processo 90603/13.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XV
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XX
1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1 O Milho	25
3.2 Os Fungos	29
3.2.1 O gênero <i>Fusarium</i>	31
3.2.2 O gênero <i>Aspergillus</i>	34
3.2.3 O gênero <i>Penicillium</i>	36
3.3 As Micotoxinas.....	38
3.3.1 Histórico	40
3.3.2 Micotoxicoses	41
3.3.3 Formas de Contaminação	43
3.3.4 Micotoxinas em Milho e Derivados.....	43
3.4 Identificação de Fungos	45
3.5 <i>DNA Barcode</i>	47
4 METODOLOGIA	50
4.1 Amostras.....	50
4.2 Identificação morfológica e depósito em coleção de cultura credenciada pelo Ministério do Meio Ambiente	51
4.3 Extração de DNA genômico.....	51
4.4 Amplificação dos segmentos de DNA por PCR	52
4.5 Purificação dos produtos de PCR.....	55
4.6 Sequenciamento de DNA.....	55
4.7 Análise das sequências obtidas pelo sequenciamento	56
4.8 Análise tradicional de código de barras de DNA	57
4.9 Análise de <i>barcode Gap</i> (ABGD)	57

5 RESULTADOS	59
5.1 Amostras: Identificação morfológica, seleção, depósito em Coleção de Culturas e extração de DNA genômico	59
5.2 Experimentos e Análises da Região ITS	64
5.3 Experimentos e Análises da região RPB2	73
5.4 Experimentos e Análises da região bTUB	83
5.5 Novas análises baseadas na interpretação dos resultados obtidos	86
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÕES	102
7.1 Perspectivas	102
8 APÊNDICES	104
APÊNDICE A - FOTOGRAFIAS REPRESENTATIVAS DAS ESPÉCIES PERTENCENTES AO GRUPO DE ESTUDO.	104
APÊNDICE B - MATRIZES DE DISTÂNCIA GERADAS A PARTIR DA COMPARAÇÃO PAR-A-PAR ENTRE AS AMOSTRAS DO ESTUDO	109
9 ANEXOS	114
ANEXO I – ÁRVORE FILOGENÉTICA DA RELAÇÃO DE ESPÉCIES DE TRICHOCOMACEAE, SEGUNDO PETERSON (2008, p. 209), CONSIDERANDO AS REGIÕES 5.8S rDNA, 28S rDNA E RPB2	114
10 REFERÊNCIAS	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de milho por país estimada em 2014.	25
Figura 2. Desenho esquemático dos conídios de <i>Fusarium</i> spp.	32
Figura 3. Desenho esquemático do conidióforo de <i>Aspergillus</i> spp.	36
Figura 4. Desenho esquemático do conidióforo de <i>Penicillium</i> spp.	37
Figura 5. Desenho esquemático dos padrões de ramificação dos conidióforos de <i>Penicillium</i> spp.	38
Figura 6. Gráfico representativo dos gêneros fúngicos isolados no projeto “Biodiversidade de fungos micotoxigênicos em grão de milho de cultivo convencional, orgânico e transgênico por taxonomia clássica e molecular”.	59
Figura 7. Eletroforese da Região ITS utilizando Taq DNA polimerase (Uniscience) e 5 ng de DNA.	64
Figura 8. Eletroforese da Região ITS utilizando Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 1 ng de DNA.	65
Figura 9. Eletroforese da Região ITS utilizando HIFI HotStart PCR Kit (Kapa) e 1 ng de DNA.	65
Figura 10. Eletroforese da Região ITS utilizando HIFI HotStart PCR Kit (Kapa) com os aditivos BSA, DMSO e Betaína, e 1 ng de DNA.	66
Figura 11. Eletroferograma da amostra PBC-082 utilizando iniciador direto ITS5, representativo dos resultados do sequenciamento capilar da região ITS, original sem edições.	66
Figura 12. Matriz de distâncias das comparações par-a-par da região ITS de <i>Fusarium</i> sp.	70
Figura 13. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região ITS de <i>Fusarium</i> sp.	71
Figura 14. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região ITS de <i>Aspergillus</i> sp.	71
Figura 15. Grupos de hipóteses de espécies gerados pelo programa ABGD para a região ITS do gênero <i>Aspergillus</i>	72
Figura 16. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região ITS de <i>Penicillium</i> sp.	72
Figura 17. Grupos de hipóteses de espécies gerados pelo programa ABGD para a região ITS do gênero <i>Penicillium</i>	73
Figura 18. Eletroforese da Região RPB2 utilizando as enzimas Taq DNA polimerase Uniscience (canaletas 2 a 7) e Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen (canaletas 9 a 14) e 5 ng de DNA.	74
Figura 19. Eletroforese da Região RPB2 HiFi HotStart PCR Kit (Kapa) e 1 ng de DNA.	75
Figura 20. Eletroforese da Região RPB2 utilizando Taq DNA polimerase (Uniscience) e 1 ng de DNA.	75

Figura 21. Eletroforese da Região RPB2 utilizando 1 ng de DNA e HiFi HotStart PCR Kit (Kapa) com os aditivos BSA, DMSO e Betaína.....	76
Figura 22. Eletroforese da Região RPB2 utilizando 1 ng de DNA e Taq DNA polimerase (Uniscience) com os aditivos BSA, DMSO e Betaína.	76
Figura 23. Eletroforese da Região RPB2 utilizando 0,1 e 0,01 ng de DNA e Taq DNA polimerase (Uniscience) com os aditivos BSA, DMSO e Betaína.	76
Figura 24. Eletroforese da Região RPB2 utilizando 5 e 1 ng de DNA e GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega).....	77
Figura 25. Eletroferograma da amostra PBC-094 utilizando iniciador reverso 7cR, representativo dos resultados do sequenciamento capilar da região RPB2, original sem edições.	77
Figura 26. Matriz de distâncias das comparações par-a-par da região RPB2 de <i>Fusarium</i> sp.....	80
Figura 27. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região RPB2 de <i>Fusarium</i> sp.	80
Figura 28. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região RPB2 de <i>Aspergillus</i> sp.....	81
Figura 29. Grupos de hipóteses de espécies gerados pelo programa ABGD para a região RPB2 do gênero <i>Aspergillus</i>	81
Figura 30. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região RPB2 de <i>Penicillium</i> sp.	82
Figura 31. Grupos de hipóteses de espécies gerados pelo programa ABGD para a região RPB2 do gênero <i>Penicillium</i>	82
Figura 32. Eletroforese da Região bTUB utilizando 5 ng de DNA e Taq DNA polimerase (Uniscience).	83
Figura 33. Eletroforese da Região bTUB utilizando 1 ng de DNA e Taq DNA polimerase (Uniscience).	84
Figura 34. Eletroferograma da amostra PBC-002 utilizando iniciador reverso T2, representativo dos resultados do sequenciamento capilar do gene bTUB, original sem edições.....	84
Figura 35. Matriz de distâncias das comparações par-a-par da região bTUB de <i>Fusarium</i> sp.....	86
Figura 36. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências do gene bTUB de <i>Fusarium</i> sp.	86
Figura 37. Fotografias das amostras PBC-064 (<i>A. niveus</i>) e PBC-054 (<i>A. candidus</i>).	87
Figura 38. Fotografias das amostras PBC-099 (<i>P. citrinum</i>).	87
Figura 39. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região ITS de <i>Penicillium</i> sp. após nova identificação da amostra PBC-099.	88
Figura 40. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região RPB2 de <i>Penicillium</i> sp. após nova identificação da amostra PBC-099.....	89

Figura 41. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região ITS de <i>Fusarium</i> sp. considerando a amostra PBC-045 como <i>F. verticillioides</i>	89
Figura 42. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região RPB2 de <i>Fusarium</i> sp. considerando a amostra PBC-045 como <i>F. verticillioides</i>	90
Figura 43. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região bTUB de <i>Fusarium</i> sp. considerando a amostra PBC-045 como <i>F. verticillioides</i>	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Múltiplas aplicações do milho (planta, espiga e grão) no Brasil	27
Tabela 2. Relação entre as espécies de Snyder e Hansen, as seções de Wollenweber e Reinking, e as espécies descritas por Leslie e Summerell.....	34
Tabela 3. Principais micotoxinas e seus respectivos fungos produtores, substratos e efeitos em humanos e animais.....	40
Tabela 4. Categorização de substâncias pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) segundo seu potencial carcinogênico	45
Tabela 5. Identificação dos iniciadores específicos para amplificação das regiões ITS, RPB2 e bTUB.....	54
Tabela 6. Identificação das amostras, número do <i>voucher</i> associado, espécie identificada por morfologia, substrato e procedência	60
Tabela 7. Identificação das sequências selecionadas em bancos de dados	62
Tabela 8. Comparação das sequências obtidas da região ITS com o banco de dados do NCBI diretamente no <i>website</i> e através da ferramenta <i>Linnaeus Search</i> do <i>Geneious</i>	67
Tabela 9. Comparação das sequências obtidas da região RPB2 com o banco de dados do NCBI através da ferramenta <i>Linnaeus Search</i> do <i>Geneious</i>	78
Tabela 10. Comparação das sequências obtidas do gene bTUB com o banco de dados do NCBI através da ferramenta <i>Linnaeus Search</i> do <i>Geneious</i>	85
Tabela 11. Resultados obtidos e identificação final das amostras PBC-064 e PBC-099	88
Tabela 12. Síntese dos resultados das análises ABGD correlacionados à identificação morfológica das espécies, considerando as regiões ITS, RPB2 e bTUB	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Percentual
~	Aproximadamente
<	Menor
>	Maior
°C	Graus Celsius
5F2	Iniciador direto para amplificação da região RPB2
7cR	Iniciador reverso para amplificação da região RPB2
A	Base nitrogenada Adenina
ABGD	<i>Automatic Barcode Gap Discovery</i>
B1	Aflatoxina B1
BenA	Beta-tubulina
BLAST	<i>Basic Alignment Search Tool</i>
BR-BoL	Brazilian Barcode of Life
BSA	Albumina soro bovina
bTUB	Beta-tubulina
C	Base nitrogenada Citosina
CBoL	<i>Consortium for the Barcode of Life</i>
CCMB	Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia
CiMilho	Centro de Inteligência do Milho
cm	Centímetro
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COI	Subunidade 1 do citocromo c oxidase
cox1	Subunidade 1 do citocromo c oxidase
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
CYA	Ágar CZAPEK contendo 0,5% de extrato de levedura
DIOM	Diretoria do Instituto Oswaldo Magalhães
DIVISA	Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP's	Mistura equimolar de desoxirribonucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EF-1- α	Fator de alongação 1- α
EUA	Estados Unidos da América
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FASTA	Formato de arquivo baseado em texto
FFSC	<i>Fusarium fujikuroi species complex</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOSC	<i>Fusarium oxysporum species complex</i>
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
G	Base nitrogenada Guanina
g	Força centrífuga relativa
gDNA	DNA genômico
GenBank	Banco de dados de sequências genéticas do <i>National Institute of Health</i>
HCl	Ácido Clorídrico
HQ%	<i>High Quality Percentage</i> (percentual de bases com alta qualidade)
H ₀	Hipótese nula
IAC	Instituto Agrônomo de Campinas
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (espaçador interno transcrito)
ITS1	Região 1 do espaçador interno transcrito
ITS2	Região 2 do espaçador interno transcrito
ITS4	Iniciador reverso para amplificação da região ITS
ITS5	Iniciador direto para amplificação da região ITS
LBM	Laboratório de Biologia Molecular
LQ%	<i>Low Quality Percentage</i> (percentual de bases com baixa qualidade)
LSU	Subunidade nuclear ribossômica maior

M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
matK	<i>Megakaryocyte-associated tyrosine kinase</i>
MG	Minas Gerais
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MOTU	Unidade Taxonômica Operacional Molecular
MT	Milhões de toneladas
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
PA	Para análise
pb	Pares de bases
PBC	Codificação das amostras do estudo (Projeto Barcode)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação da Polimerase em Cadeia)
PCRH	Programa de Capacitação de Recursos Humanos
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
POP	Procedimento Operacional Padrão
PVP	Polivinilpirrolidona
rbcL	<i>Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rDNA	DNA ribossômico
RNA	Ácido desoxirribonucleico
RPB2	Subunidade maior da RNA polimerase II

RPT	Rede de Plataformas Tecnológicas
RPT01E	Subunidade Belo Horizonte de Sequenciamento de DNA e Genotipagem
SCB	Serviço de Ciências Bioquímicas
SDS	Dodecil Sulfato de sódio
sp.	Espécie
spp.	Espécies
SSU	Subunidade nuclear ribossômica menor
T	Base nitrogenada Timina
T1	Iniciador direto para amplificação da região bTUB
T2	Tricoteceno T2
T2	Iniciador reverso para amplificação da região bTUB
Taq	Enzima DNA polimerase termoestável
TE	Tris-EDTA
THG	Transferência horizontal de genes
U	Unidade
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UNITE	<i>User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza Database</i> - banco de dados de sequências da região ITS
UV	Ultra-violeta
VISA	Vigilância Sanitária de Minas Gerais
X	vezes
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
pmoles	Picomoles

RESUMO

A contaminação do milho, um dos mais importantes grãos cultivados no mundo e cereal mais produzido no Brasil, e seus derivados por micotoxinas causa prejuízos na cadeia produtiva e danos à saúde do consumidor. Devido ao potencial tóxico e carcinogênico das micotoxinas, é de grande importância detectar e identificar a presença dos fungos filamentosos produtores destes metabólitos nos alimentos. O código de barras de DNA é um método de identificação rápida, precisa e automatizada de espécies utilizando dados de sequências curtas e padronizadas do genoma. O objetivo deste trabalho foi determinar uma única região que identifique com eficiência os principais fungos filamentosos potencialmente micotoxigênicos isolados de milho e derivados. Foram avaliadas, então, a utilização das regiões do DNA nuclear ITS, RPB2 e bTUB como possíveis códigos de barras de DNA para fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. A extração do gDNA foi realizada com sucesso para todas as amostras do estudo, assim como a amplificação das regiões ITS e RPB2. Para a região bTUB houve amplificação apenas para as espécies de *Fusarium*, para *Aspergillus* e *Penicillium* não foram obtidos os amplicons esperados. Os resultados das análises das sequências geradas demonstram que a região ITS, preconizada como código de barras de DNA para fungos, não foi eficaz na discriminação das espécies analisadas. Por outro lado, a região RPB2 mostrou-se eficiente como código de barras de DNA secundário para a amostragem avaliada, apresentando os maiores *barcode gaps* nos três gêneros. Desta forma, a identificação molecular através do código de barras de DNA desta região, uma vez implementada na rotina dos laboratórios da FUNED, e aliada à identificação morfológica dos fungos filamentosos, agregará maior confiabilidade aos laudos emitidos, dando suporte às ações de Vigilância Sanitária em Minas Gerais.

Palavras-chave: Código de barras de DNA, ITS, RPB2, bTUB, fungos micotoxigênicos, milho.

ABSTRACT

Corn is one of the most important grain grown worldwide, and is the most produced cereal in Brazil. The contamination of corn and its derivatives by mycotoxins, secondary metabolites produced by filamentous fungi, can cause losses in the production chain and, above all, consumer health hazards. Due to the toxic and carcinogenic effects of mycotoxins it is very important to detect and identify the presence of filamentous fungi producing these metabolites in foods. The DNA barcode is a quick, accurate and automated identification method, using short and standardized region of the genome. The aim of this study was to determine a single region to identify efficiently the main micotoxigenic fungi isolated from corn and its derivatives. The regions of nuclear DNA, ITS, RPB2 and bTUB were then evaluated as possible DNA barcode for *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*. Genomic DNA was successfully extracted from all samples of the study. The ITS and RPB2 regions were amplified in all samples while the bTUB region was amplified only in *Fusarium* species. The results of the generated sequences demonstrated that ITS region, recommended as a primary DNA barcode for fungi, was not effective in discriminating the analyzed species. On the other hand, RPB2 region has proven to be effective as secondary DNA barcode for sample evaluated, with the largest barcode gaps in the three genera. Thus, molecular identification through DNA barcode of this region combined with morphological identification of filamentous fungi, will provide more reliability to the FUNED's reports issued supporting the Health Surveillance actions in Minas Gerais.

Keywords: DNA barcode, ITS, RPB2, bTUB, micotoxigenic fungi, maize.

1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a saúde humana e animal tem despertado interesse das autoridades competentes, e, iniciativas que promovam a segurança alimentar têm sido incentivadas tanto em nível nacional quanto mundial. Dentre os diversos fatores relacionados ao tema da segurança alimentar, a contaminação de alimentos por micotoxinas, metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, merece destaque por causar prejuízos em toda a cadeia produtiva de alimentos e, principalmente, por causar danos à saúde do consumidor (Medina et al., 2014).

Há especial interesse na cultura do milho, pois é amplamente utilizado como fonte de alimento em vários países, constitui um dos mais importantes grãos cultivados no mundo e é o cereal mais produzido no Brasil. O milho é um cereal relevante tanto para alimentação humana quanto animal, e sua cultura é muito vulnerável à ocorrência de pragas e doenças. Existe uma grande preocupação devido à sua elevada suscetibilidade à ocorrência de fungos toxigênicos, tanto no campo quanto após a colheita (Scudamore & Patel, 2000). Estudos realizados no Brasil e no exterior constataram um número significativo de amostras com elevada incidência de grãos ardidos (reflexo da podridão de espigas) e micotoxinas em milho e derivados (Ali et al., 1998; Machinski et al., 2001; Van der Westhuizen et al., 2003; EMBRAPA, 2006). Geralmente, o processo de infecção pelos fungos nos grãos começa ainda no campo, durante a fase de maturação fisiológica, e prossegue nas etapas seguintes de colheita, secagem, armazenamento, transporte e processamento (Lázzari, 1997; EMBRAPA, 2006), havendo necessidade de monitoramento constante. Torna-se, portanto, de extrema importância pelo que essas culturas representam nos aspectos econômico e de saúde humana e animal, a avaliação desses grãos do ponto de vista de segurança alimentar.

Os fungos constituem um dos grupos de organismos mais diversos da Terra, compreendendo um total estimado de 1,5 milhões de espécies (Hawksworth, 2004), dos quais aproximadamente 130 mil espécies estão descritas (CoL, 2015). Apresentam grande importância econômica na sociedade, que compreende aspectos negativos e positivos (Moraes et al., 2010). São utilizados na produção de

medicamentos, alimentos fermentados, biocombustíveis, e por outro lado, podem causar doenças em plantas e animais, contaminar alimentos e produzir micotoxinas (Lorini & Bacaltchuk, 2009; Kendrick, 2011; Lange et al., 2012). O potencial micotoxigênico de um fungo depende de uma série de fatores, como umidade, temperatura, presença de oxigênio, velocidade de crescimento, constituição do substrato, características genéticas, lesões à integridade dos grãos causados por insetos ou dano mecânico/térmico, inóculo fúngico, sistemas de secagem e armazenamento (Hussein & Brasel, 2001; Prado, 2014).

As principais micotoxinas encontradas nas forragens e grãos estão geralmente associadas com as espécies de fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, apesar de serem conhecidas mais de quatrocentas micotoxinas, produzidas por cerca de uma centena de fungos (Jobim et al., 2001; Covarelli et al., 2011). Devido ao seu potencial tóxico e carcinogênico, representam risco à saúde humana e animal quando ingeridas (Berthiller et al., 2007), o que torna de grande importância a detecção e identificação dos fungos filamentosos produtores destes metabólitos nos alimentos (Lewis et al., 2005; Zain, 2011).

O método tradicional de identificação de fungos baseia-se na observação e descrição de características morfológicas, principalmente reprodutivas, sendo assim uma técnica laboriosa que depende de mão de obra especializada e, ainda, pode não ser conclusiva (Arx, 1974; Azevedo et al., 2005; Sangeetha & Thangadurai, 2013).

As técnicas moleculares foram introduzidas como ferramentas potentes para auxiliar na detecção e identificação destes fungos. O código de barras de DNA é uma ferramenta molecular de comunicação universal utilizada para identificação de espécies que se baseia na utilização de sequências curtas e padronizadas do genoma para a identificação rápida e precisa das espécies através da comparação com as sequências de espécies já conhecidas depositadas em um banco de dados mundial (Hebert et al., 2003a). Inicialmente utilizado com sucesso nos mais diversos grupos de animais (Hebert et al., 2004b; Hajibabaei et al., 2005), vem sendo também aplicado a plantas (Kress & Erickson, 2007) e, mais recentemente, a fungos (Seifert et al., 2007; Groenewald, 2009).

Este método de identificação molecular de espécies biológicas baseia-se na premissa de que a variação genética entre as espécies analisadas excede a variação

existente dentro destas mesmas espécies para o segmento de DNA selecionado (Hebert et al., 2003a). O gene *COI* é utilizado na identificação da maioria das espécies de animais, porém não apresenta eficiência para o estudo de plantas e fungos. Para os fungos, a região ITS (*Internal Transcribed Spacer* – espaçador interno transcrito) tem sido amplamente utilizada e foi estabelecida como o código de barras de DNA de fungos (Begerow et al., 2010; Schoch, C L; Seifert, K A; Huhndorf, S; Robert, V; Spouge, J L; Levesque, C A; Chen, W and Fungal Barcoding Consortium, 2012). Alguns grupos de fungos não são discriminados com eficiência através da região ITS, e outros marcadores nucleares têm sido utilizados com eficiência (Schoch et al., 2011).

Tendo em vista a importância da identificação precisa de fungos micotoxigênicos em alimentos, torna-se necessário avaliar a utilização da técnica de código de barras de DNA na identificação destes fungos, dando suporte às ações de vigilância sanitária.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o uso das regiões ITS (primariamente), RPB2 e bTUB (secundariamente) como código de barras de DNA para a identificação de fungos filamentosos potencialmente micotoxigênicos, pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, isolados de milho em grão e derivados.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter o DNA genômico dos isolados selecionados dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*;
- Amplificar e sequenciar a região ITS, preconizada como código de barra de DNA para fungos, e as regiões RPB2 e bTUB, como possíveis códigos de barra de DNA secundários para o grupo de estudo;
- Comparar das sequências obtidas com sequências depositadas em bancos de dados;
- Determinar as divergências intra e interespecíficas através de comparações par-a-par das sequências do grupo de estudo;
- Determinar hipóteses de espécies entre as sequências do estudo através da detecção de *barcode gap* pelo método tradicional e ABGD, e compará-las entre si e com as hipóteses de espécies identificadas por morfologia.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O Milho

O milho é a cultura de maior destaque da agricultura mundial. A safra mundial 2014/2015 está estimada em 996,1 milhões de toneladas, com uma área plantada de 177,7 milhões de hectares. O Brasil é o terceiro maior produtor no mundo (Figura 1), produzindo aproximadamente 75 milhões de toneladas em uma área de 15,4 milhões de hectares, ficando atrás apenas de Estados Unidos e China, responsáveis pela produção de 360 e 215 milhões de toneladas do produto, em áreas de 33,6 e 37 milhões de hectares, respectivamente (CONAB, 2014; Index Mundi, 2014; MAPA, 2015; USDA, 2015).

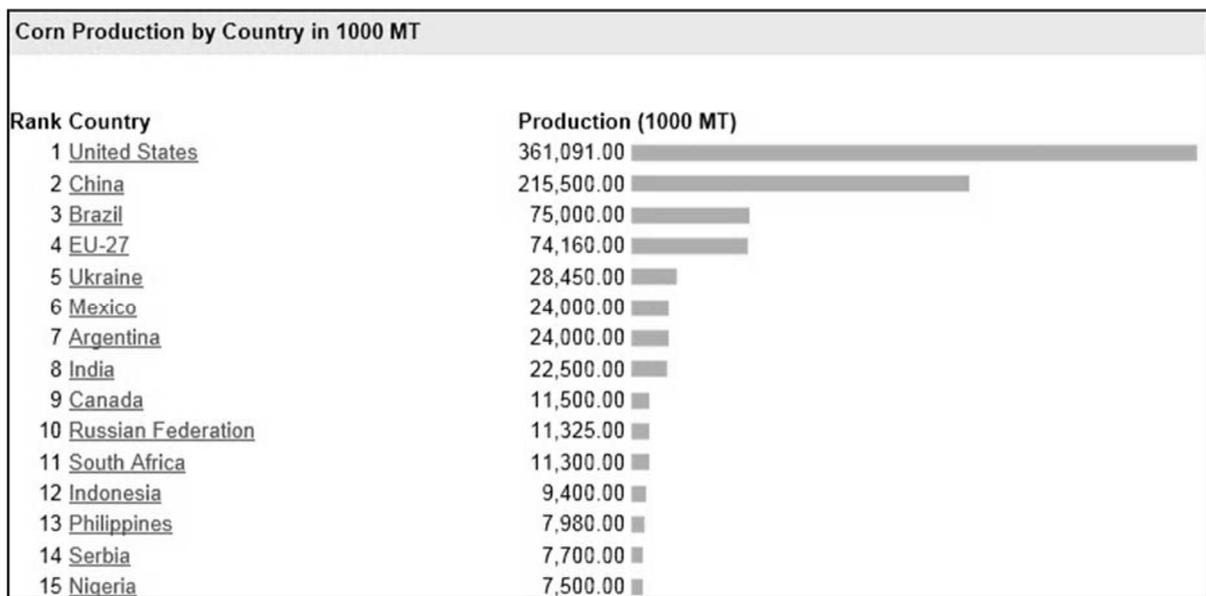


Figura 1. Produção de milho por país estimada em 2014.

MT- Milhões de toneladas. Fonte: Index Mundi, 2014.

Segundo a Assessoria de Gestão Estratégica do MAPA o estudo das projeções de produção do cereal no Brasil indica aumento de 19,11 milhões de toneladas entre a safra de 2008/2009 e 2019/2020. Cerca de 70% da produção mundial de milho é destinada à alimentação animal, podendo chegar a 85% em países desenvolvidos. O consumo humano direto ou indireto representa apenas cerca de 15% de toda a produção mundial (EMBRAPA, 2012a). Da mesma maneira, o principal destino da safra brasileira são as indústrias de rações para animais, seguido do reprocessamento

industrial e, por último, o consumo na mesa da população, que representa a menor parte da produção (EMBRAPA, 2012a; MAPA, 2015).

Apesar do grande consumo de produtos oriundos do processo de moagem a seco no Brasil, nos últimos anos o milho tem se destacado na integração lavoura-pecuária devido às inúmeras aplicações que este cereal tem dentro da propriedade agrícola, quer seja na alimentação animal, na alimentação humana ou na geração de receita mediante a comercialização da produção excedente (EMBRAPA, 2012b).

No Brasil, a produção é voltada, majoritariamente, para o mercado interno, no qual o milho tem dois destinos: i) o próprio estabelecimento rural onde é produzido; destinado em sua maior parte à nutrição animal, mas também para consumo humano; e ii) o mercado consumidor, sendo direcionado para fábricas de rações, indústrias químicas, indústrias de alimentos e para o mercado de consumo *in natura* (EMBRAPA, 2012a). Aproximadamente 75% do milho produzido no Brasil destina-se à ração animal, em grão ou silagem, sendo mais de um milhão de hectares cultivados nas bacias leiteiras do país (Peske, 2014). Cerca de 20% do total de milho produzido no Brasil destina-se à exportação, cujos principais mercados são países como Japão, Irã, Coreia do Sul, Marrocos, Arábia e Estados Unidos. Eventualmente o Brasil importa milho em pequenas quantidades, totalizando 800 mil toneladas em 2014 (CONAB, 2013; Index Mundi, 2014).

Ultimamente as lideranças do agronegócio questionam a produção de álcool de milho, à semelhança do que ocorre nos EUA, o que aumentaria a complexidade de produção de sementes devido à necessidade de desenvolvimento de milho com maior eficiência para produção de álcool (Peske, 2014).

No Brasil, o milho é produzido em duas safras no mesmo ano agrícola: primeira safra (safra de verão) e segunda safra (safra de inverno ou safrinha). A maior parte da área da safrinha é cultivada em sequeiro e em sucessão a uma cultura de verão, quase sempre a soja (EMBRAPA, 2012b). Cultivado em diferentes sistemas produtivos, o milho é plantado principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país, com destaque para os estados do Mato Grosso, Paraná, Minas Gerais e Goiás. O grão tem múltiplas aplicações nas indústrias alimentícia, química, farmacêutica, de papéis, têxtil e outras (Tabela 1), de forma que tem sido discutido o tratamento do milho como uma *commodity* (Paes, 2006; MAPA, 2015; CIMilho, 2015.).

Tabela 1. Múltiplas aplicações do milho (planta, espiga e grão) no Brasil

Destinação	Forma / Produto Final
Uso Animal Direto	Silagem, rolão, grãos (inteiro/desintegrado) para aves, suínos e bovinos.
Uso Humano Direto de Preparo Caseiro	Espiga assada ou cozida, pamonha, curau, pipoca, pães, bolos, broas, cuscuz, polenta, angus, sopas, farofa.
Indústria de Rações	Rações para aves (corte e postura), outras aves, suínos, bovinos (corte e leite), outros mamíferos.
Indústria de Alimentos - Produtos Finais	Amidos, fubás, farinhas comuns, farinhas pré-cozidas, flocadas, canjicas, óleo, creme, pipocas, glicose, dextrose.
Intermediários	Canjicas, sêmola, semolina, moído, granulado, farelo de germe.
Xarope de Glucose	Balas duras, balas mastigáveis, goma de mascar, doces em pasta, salsichas, salames, mortadelas, hambúrgueres, outras carnes processadas, frutas cristalizadas, compotas, biscoitos, xaropes, sorvetes, para polimento de arroz.
Xarope de Glucose com alto teor de maltose	Cervejas.
Corantes Caramelo	Refrigerantes, cervejas, bebidas alcoólicas, molhos.
Maltodextrinas	Aromas e essências, sopas desidratadas, pós para sorvetes, complexos vitamínicos, produtos achocolatados.
Amidos Alimentícios	Biscoitos, melhoradores de farinhas, pães, pós para pudins, fermento em pó, macarrão, produtos farmacêuticos, balas de goma.

Tabela 1. Cont.

Destinação	Forma / Produto Final
Amidos Industriais	Para papel, papelão ondulado, adesivos fitas gomadas, briquetes de carvão, engomagens de tecidos, beneficiamento de minérios.
Dextrinas	Adesivos, tubos e tubetes, barricas de fibra, lixas, abrasivos, sacos de papel, multifolhados, estampagem de tecidos, cartonagem, beneficiamento de minérios.
Pré-Gelatinizados	Fundição de peças de metal.
Adesivos	Rotulagem de garrafas e de latas, sacos, tubos e tubetes, fechamento de caixas de papelão, colagem de papel, madeira e tecidos.
Ingredientes Proteicos	Rações para bovinos, suínos, aves e cães.

Fonte: Jornal Agroceres apud CiMilho (2015).

A indústria moageira de milho se divide em dois grandes grupos. O grupo de moagem a úmido, que produz subprodutos com alto valor agregado, geralmente destinados a reprocessamentos por parte de outra indústria, e o grupo de moagem a seco, que gera produtos de menor valor, geralmente destinados ao consumo humano (EMBRAPA, 2012b). Para o consumo humano destacam-se produtos derivados do processo de moagem a seco, que envolve menores escalas de produção e investimentos industriais, resultando em produtos como canjica, farinhas, fubás, *grits*, flocos e farelo. Há também produtos derivados da moagem úmida destinados ao consumo humano, como o amido de milho e o óleo de milho, oriundos de empresas de grande porte devido à complexidade do processamento e alto custo (EMBRAPA, 2012a; EMBRAPA, 2012; AGEITEC, 2013).

Os grãos de milho podem ser colonizados por fungos em dois momentos: pré-colheita (podridão de espigas no campo) e pós-colheita (durante o beneficiamento, armazenamento e transporte) (EMBRAPA, 2006). Segundo Lorini e Bacaltchuk (2009), perdas quantitativas e qualitativas na fase pós-colheita de grãos devido a

contaminantes são uma realidade nacional que comprometem sua qualidade e a segurança alimentar, comprometendo até 10% da produção de grãos. Os principais contaminantes são os inseto-pragas, fungos, bactérias, micotoxinas e sujidades, que ocorrem durante o processo de armazenagem e seguem por toda a cadeia de grãos, chegando à mesa do consumidor (Lorini & Bacaltchuk, 2009).

3.2 Os Fungos

Os fungos são um dos grupos de organismos mais diversos da Terra. Atualmente são conhecidas aproximadamente 130 mil espécies de fungos (CoL, 2015), correspondendo a apenas cerca de 8% do total estimado em 1,5 milhões de espécies (Hawksworth & Rossman, 1997; Hawksworth, 2004). Isto faz dos fungos, assim como de bactérias e arqueas, um dos grupos de seres vivos com diversidade específica menos conhecida. Constituem um grupo monofilético (Reino *Fungi*), e tem os nuclearídeos (um grupo de protozoários) como provável grupo-irmão. O Reino *Fungi* compreende os filos Basidiomycota, Ascomycota, Glomeromycota e várias linhagens basais, que antigamente correspondiam aos filos não-monofiléticos Zygomycota e Chytridiomycota, além dos Microsporia de posicionamento filogenético duvidoso (McLaughlin et al., 2009; Stajich et al., 2009).

Os fungos são organismos eucarióticos, quimioheterotróficos, de nutrição absorptiva com digestão extracorpórea parcial, são predominantemente aeróbicos ou fermentadores facultativos, apresentam estrutura corpórea pluricelular micelial (fungos filamentosos) ou unicelular leveduriforme (leveduras), possuem parede celular constituída principalmente de quitina, glicanos e proteínas, tendo o ergosterol como principal esteroide constituinte da membrana plasmática (Alexopoulos et al., 1996; Moraes et al., 2010). Os fungos são predominantemente sapróbios, e a decomposição, particularmente em ambientes terrestres, é a principal função ecológica desempenhada por este grupo de organismos. Eles podem ainda viver associados a outros seres vivos como parasitas ou mutualistas, e também podem formar associações que não compreendem nem relação de parasitismo ou mutualismo estritos, como no caso de determinados fungos epi e endobióticos, considerados comensais (Boddy & Coleman, 2010; Moraes et al., 2010). Os fungos

filamentosos possuem reprodução sexuada e assexuada pela formação de esporos e pela fragmentação de suas hifas. O estado sexual é chamado teleomorfo, e o assexual, anamorfo (Tortora et al., 2005; Moraes et al., 2010). Estas características permitem que os fungos se desenvolvam nos mais diversos substratos e condições.

A importância dos fungos em nossa sociedade compreende tanto aspectos negativos quanto positivos (Moraes et al., 2010). Sua principal função na natureza é a decomposição de compostos orgânicos, sendo essenciais para a reciclagem de nutrientes. São utilizados também nas indústrias alimentícia e de ração animal, farmacêutica, têxtil, química (detergentes e polímeros), e na produção de biocombustíveis (etanol veicular). São também responsáveis por causar doenças em plantas, insetos e animais, inclusive o homem (Kendrick, 2011; Lange et al., 2012; Visagie et al., 2014b). No setor agrícola são responsáveis por grandes perdas econômicas, quer por via direta pela sua proliferação no alimento, quer por via indireta pela síntese de compostos indesejáveis. Perdas quantitativas e qualitativas devido a contaminantes, na pré e pós-colheita de grãos, são uma realidade nacional e tem comprometido cerca de 10% da produção e a segurança alimentar dos homens e animais. Os principais contaminantes são inseto-pragas de grãos armazenados, fungos, bactérias, micotoxinas e resíduos de agrotóxicos, que seguem por toda a cadeia dos grãos, chegando à mesa do consumidor (Lorini & Bacaltchuk, 2009).

Geralmente, o processo de infecção pelos fungos nos grãos começa ainda no campo, principalmente durante a fase de maturação fisiológica, e prossegue nas etapas seguintes de colheita, secagem, armazenamento, transporte e processamento (Lázzari, 1997), havendo necessidade de monitoramento constante. Os fungos que invadem sementes e grãos são divididos em dois grupos: fungos do campo, que infectam o produto ainda no campo e fungos de armazenamento, cuja infecção ocorre pouco antes e durante o armazenamento. A distinção entre os dois grupos não é baseada na classificação taxonômica, e nem absoluta, mas de acordo com as condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o crescimento dos fungos e de acordo com seus hábitos de crescimento e onde os danos ocorrem (Márcia & Lázzari, 1998).

Os fatores que afetam o crescimento de fungos nos grãos de milho incluem: temperatura, teor de umidade dos grãos, condição física e sanitária do grão, concentração do inóculo, tempo, conteúdo de oxigênio e armazenamento anterior,

insetos e ácaros. A invasão de um lote de grãos por insetos pode iniciar ou agravar o desenvolvimento de fungos, pois sua atividade metabólica gera o aumento de teor de umidade e temperatura da massa dos grãos (Miller, 1995; Lázari, 1997; Márcia & Lázari, 1998).

Alguns fungos filamentosos são capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos em condições naturais e laboratoriais, excretados por vias metabólicas secundárias, não essenciais para o crescimento e sobrevivência dos fungos. Estes metabólitos, conhecidos como micotoxinas, contaminam os alimentos e representam potencial risco à saúde humana e animal quando ingeridas (Berthiller et al., 2007; Maziero & Bersot, 2010; Prado, 2014).

Os principais fungos, capazes de produzir micotoxinas, encontrados em grãos de milho pertencem aos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* e são amplamente associados à produção de fumonisinas, aflatoxinas, ocratoxina e zearalenona (Jobim et al., 2001; Covarelli et al., 2011; Gallo et al., 2015). O *Fusarium* é considerado um fungo de campo, que invade grãos e sementes durante o amadurecimento e o dano é causado antes da colheita, enquanto *Aspergillus* e *Penicillium* são fungos de armazenamento, encontrados onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas (Márcia & Lázari, 1998).

3.2.1 O gênero *Fusarium*

Os fungos do gênero *Fusarium* possuem a seguinte classificação (International Mycological Association, 2015):

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Sub-Filo: Pezizomycotina

Classe: Sordariomycetes

Sub-Classe: Hypocreomycetidae

Ordem: Hypocreales

Família: Nectriaceae

O gênero *Fusarium* foi descrito em 1809 por Link (1809) e atualmente são registrados 850 nomes publicados associados ao gênero *Fusarium* (International Mycological Association, 2015). É o terceiro gênero de fungos com maior número de espécies que podem causar doenças em plantas e animais. E ainda, produzem uma ampla gama de toxinas e metabólitos secundários que estão associados a doenças de plantas, mas podem também causar danos à saúde de homens e animais (Goldschmied et al., 1993; Leslie & Summerell, 2006). É um gênero anamórfico e sua principal característica genérica é a formação de conídios alongados, fusiformes e com vários septos (Figura 2) (Link, 1809; Gerlach & Nirenberg, 1982).

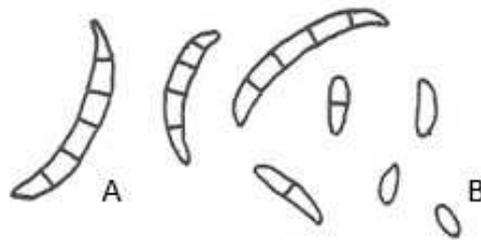


Figura 2. Desenho esquemático dos conídios de *Fusarium* spp.

A: Macroconídio. B: Microconídio. Fonte: <http://lyonsfungiatlas.blogspot.com.br>.

Muitas espécies de *Fusarium* utilizadas atualmente em sistemas taxonômicos são mal definidas e, em muitos casos, os espécimes tipo não existem mais (Leslie & Summerell, 2006). Inicialmente haviam cerca de mil espécies de *Fusarium*, muitas descritas especificamente para cada hospedeiro. Wollenweber e Reinking (1935) propuseram então um sistema baseado em 16 seções, com 65 espécies e 77 variações e formas subespecíficas. Embora algumas espécies de uma mesma seção possam não ser monofiléticas (O'Donnell et al., 1998; Kistler, 2001), algumas destas seções e espécies ainda continuam em uso. Embora Wollenweber e Reinking tenham colocado certa ordem do processo de identificação diminuindo o número de espécies, seu conceito de espécie manteve-se baseado na diferença entre os espécimes, e não nas semelhanças que compartilham (Leslie & Summerell, 2006).

Nas décadas de 40 e 50, Snyder e Hansen (Snyder & Hansen, 1940; 1941; 1945; 1954) reduziram o número de espécies a nove e demonstraram a necessidade da utilização de culturas monospóricas para que a identificação de espécies pudesse ser confiável. Apesar de terem tornado a identificação relativamente mais fácil, os

taxons limitados por estas espécies eram polifiléticos, levando a grandes perdas de informação e gerando dados difíceis de interpretar (Leslie & Summerell, 2006).

No decorrer dos anos, vários pesquisadores propuseram novos sistemas de identificação, baseados em variações dos sistemas de Wollenweber e Reinking e de Snyder e Hansen (Raiillo, 1936; 1950; Bilai, 1955; Cassini, 1968; Booth, 1971; Messiaen & Matuo, 1972; Bilai, 1978; Gerlach & Nirenberg, 1982; Nelson et al., 1983; Joffe, 1986).

Atualmente a taxonomia de *Fusarium* envolve três conceitos de espécie: o da espécie morfológica, baseada na similaridade dos caracteres morfológicos observáveis, denominados marcadores morfológicos; o da espécie biológica, baseado na compatibilidade sexual entre os membros da mesma espécie; e o da espécie filogenética, baseado na análise de sequências gênicas (O'Donnell et al., 2000; Summerell et al., 2003).

As descrições de espécies, mesmo completas, dependem de um conjunto limitado de caracteres relativos a todas que poderiam ser descritas. Enquanto a maioria das espécies continua baseada em caracteres morfológicos, os conceitos de espécies biológicas e filogenéticas têm sido amplamente utilizados atualmente por Leslie e Summerell (2006) (Tabela 2).

Baseado no conceito de espécie filogenética o *Fusarium fujikuroi species complex* (FFSC) é um grupo monofilético diverso de aproximadamente 50 espécies, sendo que muitas delas ainda permanecem desconhecidas (O'Donnell et al., 2013). As espécies do FFSC são as principais responsáveis por produzirem micotoxinas e outros metabólitos secundários (Leslie et al., 2005). As principais espécies encontradas em grãos são *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. solani* e *F. equiseti*, associadas às micotoxinas fumonisinas, zearalenona e deoxynivalenol (Blandino et al., 2014).

Tabela 2. Relação entre as espécies de Snyder e Hansen, as seções de Wollenweber e Reinking, e as espécies descritas por Leslie e Summerell

Snyder and Hansen Species	Wollenweber and Reinking Sections	Species Described in Chapter 13 of this Book *
<i>F. episphaeria</i>	<i>Eupionnotes</i> <i>Macroconia</i>	<i>F. dimerum</i> , <i>F. merismoides</i>
<i>F. lateritium</i>	<i>Lateritium</i>	<i>F. lateritium</i>
<i>F. moniliforme</i>	<i>Liseola</i>	<i>F. anthophilum</i> , <i>F. circinatum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. thapsinum</i> , <i>F. verticillioides</i> , and other species in the <i>Gibberella fujikuroi</i> species complex
<i>F. nivale</i>	<i>Arachnites</i>	No longer considered <i>Fusarium</i>
<i>F. oxysporum</i>	<i>Elegans</i>	<i>F. oxysporum</i>
<i>F. rigidiuscula</i>	<i>Spicarioides</i>	<i>F. decemcellulare</i>
<i>F. roseum</i>	<i>Discolor</i> <i>Gibbosum</i> <i>Roseum</i> <i>Arthrosporiella</i>	<i>F. acuminatum</i> , <i>F. armeniacum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. compactum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. heterosporum</i> , <i>F. longipes</i> , <i>F. polyphialidicum</i> , <i>F. pseudo-graminearum</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. torulosum</i>
<i>F. solani</i>	<i>Martiella</i> <i>Ventricosum</i>	<i>F. solani</i>
<i>F. tricinctum</i>	<i>Sporotrichiella</i>	<i>F. chlamydosporum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. tricinctum</i>

Nota: * Capítulo 13 do livro “*Fusarium Laboratory Manual*”. Fonte: Leslie & Summerell, 2006, p. 82.

3.2.2 O gênero *Aspergillus*

Os fungos do gênero *Aspergillus* possuem a seguinte classificação (International Mycological Association, 2015):

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Sub-Filo: Pezizomycotina

Classe: Eurotiomycetes

Sub-Classe: Eurotiomycetidae

Ordem: Eurotiales

Família: Trichocomaceae

O gênero *Aspergillus* foi descrito em 1729 por Micheli (1729), posteriormente Tom e Church em 1926 (Thom & Church, 1926) publicaram a principal monografia sobre o gênero, e a partir daí se tornou um dos mais conhecidos e estudados gênero de fungos. Em 1965, Rapper e Fennel (1965) realizaram uma descrição completa do gênero, reconhecendo cerca de 132 espécies e 18 variedades (Geiser et al., 2007; Bennett, 2010). Atualmente compreende mais de 260 espécies (Samsom & Varga, 2009) e são registrados 695 nomes publicados associados ao gênero (International Mycological Association, 2015).

É um gênero cosmopolita, com maior abundância em regiões de clima tropical e subtropical (Pitt & Hocking, 1999). Apresentam impacto econômico positivo na sociedade, na produção de medicamentos, enzimas e ácidos (Hara et al., 1992). Porém, os impactos negativos chamam mais atenção, como a patogenicidade a humanos e animais, a degradação de produtos agrícolas e a produção de micotoxinas (Klich, 2002; Mallmann et al., 2014).

Aspergillus spp. podem ser caracterizadas pela morfologia, técnicas moleculares, perfil de metabólitos secundários, coloração dos conídios e sua taxa de crescimento em determinadas temperaturas e atividade de água (Samsom & Varga, 2009). A coloração das colônias é uma importante característica macroscópica para a classificação das espécies, e apresentam ampla variação em tons de verde, amarelo, cinza, marrom, preto e branco (Klich, 2002).

É um gênero de fungos anamórficos que produzem conidióforo típico septado e com base em forma de “T” ou “L”, denominada “célula pé”, através do qual se conecta com a hifa vegetativa. O ápice do estipe se expande em uma vesícula, que pode apresentar diferentes formas. Em algumas espécies as fiálides surgem diretamente da vesícula, e em outras há uma camada de células entre a fiálide e a vesícula, denominada metula, o que caracteriza a espécie como bisseriada (Figura 3) (Raper & Fennel, 1965; Kozakiewicz, 1989; Klich, 2002). Os estágios sexuais (teleomorfos) pertencem a oito ou mais gêneros, sendo *Eurotium*, *Neosartorya* e *Emericella* os mais significantes em alimentos (Klich, 2002; Pitt & Hocking, 2009).

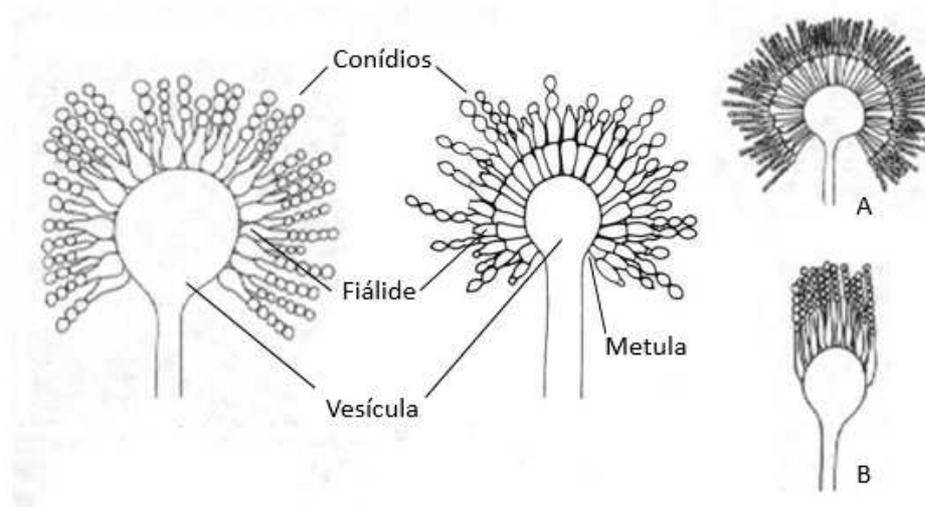


Figura 3. Desenho esquemático do conidióforo de *Aspergillus* spp.

A: Conidióforo radial. B: Conidióforo colunar. Fonte: <http://www.telmeds.org>, adaptado.

As espécies podem ser divididas em seções, dentre as quais as seções *Circumdati*, *Flavi* e *Nigri* são as mais importantes economicamente tendo em vista que algumas de suas espécies produzem micotoxinas (Klich, 2002; Varga et al., 2004). As espécies mais comumente associadas à contaminação de produtos agrícolas são *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. alliaceus*, associadas à produção de ocratoxina e aflatoxinas (Perrone et al., 2007).

3.2.3 O gênero *Penicillium*

Os fungos do gênero *Penicillium* possuem a seguinte classificação (International Mycological Association, 2015):

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Sub-Filo: Pezizomycotina

Classe: Eurotiomycetes

Sub-Classe: Eurotiomycetidae

Ordem: Eurotiales

Família: Trichocomaceae

O gênero *Penicillium* foi descrito em 1809 por Link (1809), e o primeiro trabalho sobre taxonomia de *Penicillium* foi escrito por Raper e Thom em 1949 (1949). Atualmente são registrados 1057 nomes publicados associados ao gênero (International Mycological Association, 2015).

As espécies deste gênero são adaptadas aos mais variados tipos de *habitat*, a maioria é saprófita oportunista, pouco exigente nutricionalmente e tolera diversas condições físico-químicas. Por serem encontrados no solo, no ar, em ambientes internos e produtos alimentares, sua interação com o homem é diversa, com impactos positivos e negativos (Pitt, 2000). Positivamente são utilizados na produção de medicamentos, como a Penicilina (Fleming, 1929), na produção de enzimas (Terrasan et al., 2012) e algumas espécies são exploradas na produção de alimentos fermentados como queijos e salsichas (Giraud et al., 2010; Ludemann et al., 2010). Negativamente contaminam culturas alimentares, muitas vezes produzindo micotoxinas (Frisvad & Samsom, 2004), e também podem causar alergias (Pitt, 2000).

No gênero *Penicillium*, os esporos assexuais (ou conídios) são produzidos em cadeia a partir das fiálides, formando uma estrutura típica denominada *penicillus* (do latim: pequeno pincel), que caracteriza o grupo (Figura 4) (Pitt, 2000).

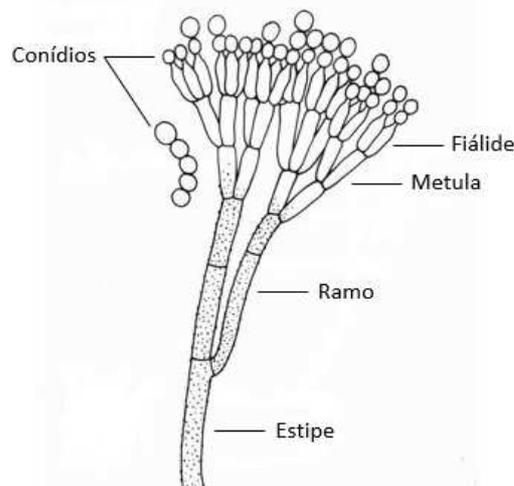


Figura 4. Desenho esquemático do conidióforo de *Penicillium* spp.

Fonte: free-stock-illustration.com, adaptado.

As características das colônias e seu diâmetro em meios específicos são importantes na identificação de espécies, assim como a textura, coloração, produção de pigmentos solúveis e exsudatos. Padrões de ramificação dos conidióforos também

são importantes na classificação e podem ser monoverticilados, biverticilados, terverticilados ou quaterverticilados (Figura 5) (Visagie et al., 2014b).

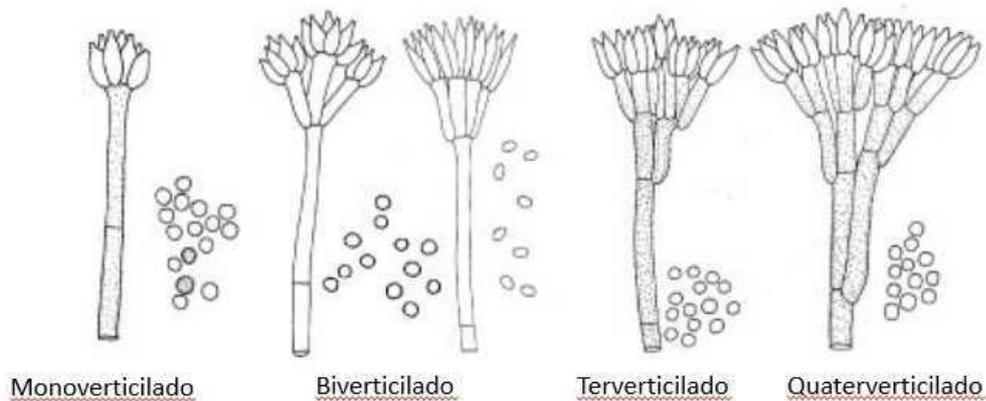


Figura 5. Desenho esquemático dos padrões de ramificação dos conidióforos de *Penicillium* spp.

Fonte: Samsom et al. 2004, adaptado.

Com base nas características morfológicas e de cultivo, principalmente os arranjos de conidióforos e conídios, o gênero é dividido em quatro subgêneros: *Aspergilloides* (monoverticilados), *Biverticillium* e *Furcatum* (biverticilados), e *Penicillium* (terverticilados e quaterverticilados) (Pitt & Hocking, 1999). Espécies de *Penicillium* são associadas a dois gêneros teleomorfos: *Eupenicillium* F. Ludw. e *Talaromyces* C. R. Benj., filogeneticamente e taxonomicamente distintos (Pitt, 2000).

O gênero *Penicillium* contém um grande número de espécies micotoxigênicas, e sua capacidade de produção é superior a qualquer outro gênero fúngico (Pitt & Leistner, 1). As espécies frequentemente encontradas em milho e derivados são *P. funiculosum*, *P. citrinum* e *P. oxalicum*, associados a ocratoxinas e citrinina (Pitt & Hocking, 1999; Prado, 2014).

3.3 As Micotoxinas

As micotoxinas são compostos de baixo peso molecular, resultantes do metabolismo secundário de fungos filamentosos, com ocorrência mundial em diferentes produtos agrícolas. São consideradas contaminantes naturais e, apesar de constituírem um grupo toxigenicamente e quimicamente heterogêneo, são agrupadas por apresentarem efeito tóxico para seres humanos e animais, além de plantas e

microrganismos (Kuiper-Goodman, 1995; Bennett & Klich, 2003). Dentre os efeitos tóxicos das micotoxinas destacam-se o carcinogênico, o hepatotóxico, o nefrotóxico, o imunossupressor e o mutagênico (Lewis et al., 2005; Zain, 2011; Prado, 2014; Rocha et al., 2014).

Todas as micotoxinas tem origem fúngica, mas nem todos os compostos tóxicos produzidos por fungos são chamados micotoxinas. As micotoxinas são tóxicas em baixas concentrações, enquanto outros metabólitos fúngicos de baixo peso molecular, tóxicos em altas concentrações, como o etanol, não são considerados micotoxinas (Bennett & Klich, 2003). Uma única espécie ou gênero de fungo pode produzir diversos tipos de micotoxinas, como diferentes espécies ou gêneros também podem produzir um mesmo tipo de micotoxina (Hussein & Brasel, 2001; Zain, 2011). Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são responsáveis pela produção das principais micotoxinas encontradas em alimentos, sendo as mais relevantes: aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, desoxinivalenol e zearalenona (Tabela 3) (Blandino et al., 2014; Prado, 2014; Yang et al., 2014).

A presença de fungos filamentosos micotoxigênicos em um alimento não significa obrigatoriamente a presença de micotoxinas, mas simplesmente que existe um potencial para a sua produção. Por outro lado, sua ausência não garante que o alimento esteja livre de micotoxinas, pois as mesmas podem persistir por longo tempo mesmo após a perda da viabilidade dos fungos (Prado, 2014; Terzi, 2014). Além disso, as micotoxinas são termoestáveis, o que significa que são resistentes a determinados tratamentos utilizados para eliminar os fungos dos alimentos (Maziero & Bersot, 2010).

As condições climáticas de um país, como temperatura, humidade relativa e chuva, determinam as classes de fungos que poderão crescer e os tipos de micotoxinas que poderão produzir nos alimentos (Hussein & Brasel, 2001). Além disso, técnicas de manuseio e armazenamento de alimentos inadequadas aumentam a probabilidade da exposição da população às micotoxinas. No Brasil as condições são apropriadas para o crescimento de todos os tipos de fungos micotoxigênicos (Bennett & Klich, 2003; Maziero & Bersot, 2010).

Tabela 3. Principais micotoxinas e seus respectivos fungos produtores, substratos e efeitos em humanos e animais

Principais Substratos	Principais fungos produtores	Principal toxina	Efeitos
Amendoim e milho	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxina B1	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica
Trigo, aveia, cevada, milho e arroz	<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinina	Nefrotóxica para suínos
Centeio e grãos em geral	<i>Claviceps purpurea</i>	Ergotamina	Gangrena de extremidades ou convulsões
Milho	<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisinias	Câncer de esôfago
Cevada, café e vinho	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Ocratoxina	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica
Frutas e suco de frutas	<i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium griseofulvum</i>	Patulina	Toxicidade vagamente estabelecida
Milho, cevada, aveia, trigo e centeio	<i>Fusarium</i> sp. <i>Myrothecium</i> sp. <i>Stachybotrys</i> sp. <i>Trichothecium</i> sp.	Tricotecenos: T2, neosolaniol, fusanona x, nivalenol, deoxinivalenol	Hemorragias, vômitos e dermatites
Cereais	<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenona	Baixa toxicidade; síndrome da masculinização e feminização em suínos

Fonte: Food Ingredients Brasil, 2009.

No Brasil, a RDC nº 7 de 18 de fevereiro de 2011 dispõe sobre os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. A Resolução e seu Anexo I entraram em vigor na data de sua publicação, o Anexo II em 2012, o Anexo III em 2014, e o Anexo IV passará a vigorar a partir de 1º de janeiro de 2016, devido à necessidade de adequação do setor produtivo (BRASIL, 2011).

3.3.1 Histórico

O início da micotoxicologia moderna se deu na década de 60, quando um surto de mortes inexplicáveis de filhotes de perus no Reino Unido foi investigado. Animais com aproximadamente quatro semanas de vida em boas condições adquiriram uma

doença desconhecida, responsável por altas taxas de mortalidade em curto período de tempo, além de provocar o aparecimento de lesões *post-mortem* envolvendo rins e fígado. A doença que ficou conhecida como “*turkey x disease*” inicialmente foi atribuída a algum tipo de vírus, mas chegou-se à conclusão de que o problema estava na ração dos animais, a qual era produzida à base de amendoim proveniente da África e do Brasil. Este amendoim estava contaminado por uma substância fluorescente produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*, daí a denominação aflatoxina (*A. flavus toxin*). Atualmente são conhecidas no mínimo 17 aflatoxinas, entre as quais a aflatoxina B1 é considerada o agente natural mais carcinogênico conhecido (Stevens et al., 1960; Barnes, 1970; FIB, 2009 N.07).

3.3.2 Micotoxicoses

Existem micotoxinas que são benéficas para o homem, como a penicilina e as cefalosporinas, que apresentam toxicidade apenas para bactérias sensíveis. Porém, em relação aos cultivos agrícolas, as micotoxinas são responsáveis por causarem doenças em animais e humanos (FIB, 2009 N.07). Os fungos produtores de micotoxinas causam preocupação com relação à segurança alimentar, bem como aos impactos decorrentes no comércio de grãos, alimentos e rações (Desjardins et al., 2003; Prado, 2014).

A ingestão ou contato com micotoxinas pode causar efeitos patológicos graves sobre a saúde animal e humana, que são conhecidos como micotoxicoses. As micotoxicoses são "envenenamentos por meios naturais", cujos sintomas dependem do tipo de micotoxina; quantidade e duração da exposição; idade, saúde, e sexo do indivíduo, estado nutricional e alguns fatores ainda pouco estudados envolvendo genética (Bhatnagar et al., 2002; Maziero & Bersot, 2010). A gravidade de uma micotoxicose pode ser aumentada por fatores como deficiência de vitaminas, privação calórica, abuso de álcool, e doenças infecciosas. Por sua vez, as micotoxicoses podem aumentar a vulnerabilidade do indivíduo a doenças microbianas, agravar os efeitos da desnutrição, e interagir sinergeticamente com outras toxinas. (Bennett & Klich, 2003).

A entrada de micotoxinas no organismo normalmente ocorre através da ingestão de alimentos contaminados, e muitas delas tem afinidade por determinado

órgão ou tecido, sendo o fígado, os rins e o sistema nervoso os mais frequentemente atingidos (Rocha et al., 2014).

Os efeitos da absorção de micotoxinas podem ser agudos ou crônicos. A micotoxicose aguda, de manifestação e percepção rápidas, é resultante da ingestão de doses moderadas a altas de micotoxinas, podendo levar à morte por causar alterações irreversíveis. Um quadro clínico agudo pode incluir sinais e sintomas como hemorragias, hepatite, nefrite, necrose de mucosas digestivas e morte, dependendo da susceptibilidade da espécie, das condições individuais e da interação com outras micotoxinas. Já a micotoxicose crônica é resultante da ingestão de doses moderadas a baixas de micotoxinas e provocam distúrbios e alterações em órgãos humanos e animais. Os efeitos podem incluir indução de câncer, lesão renal, depressão do sistema imune, *déficit* de eficiência reprodutiva, redução do ganho de peso e da taxa de crescimento, entre outros. Muitas vezes os efeitos crônicos somente são detectados quando cuidadosamente observados, e geralmente ocorrem sem a caracterização clínica da micotoxicose aguda primária (Carvalho, 1995; Shephard, 2008; Maziero & Bersot, 2010).

Existem também as doenças secundárias causadas pela ingestão de baixos níveis de micotoxinas incapazes de causar uma micotoxicose evidente, porém são capazes de predispor o hospedeiro a doenças infecciosas devido à quebra de mecanismos de resistência orgânica (Carvalho, 1995).

A grande preocupação com relação aos efeitos crônicos em baixos níveis de exposição às micotoxinas, está relacionada à carcinogenicidade das mesmas. Muitas micotoxinas são consideradas carcinogênicas ou potencialmente carcinogênicas aos humanos pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC), segundo sua classificação para agentes, misturas e circunstâncias de exposição (Kuiper-Goodman, 1995).

As micotoxinas geram perdas econômicas significativas e podem estar associadas à redução de alimentos de qualidade para humanos e animais; diminuição da produção animal devido à recusa de alimento ou doenças; aumento do custo para tratamento médico de intoxicação e aumento dos custos para encontrar alimentos alternativos (Prado, 2014).

3.3.3 Formas de Contaminação

A contaminação do homem pode ocorrer direta ou indiretamente, através da ingestão de alimentos vegetais processados ou *in natura*, ou do consumo de alimentos de origem animal, quando estes são alimentados com ração contaminada (FIB, 2009 N.07; Prado, 2014). Frequentemente, mais de uma micotoxina é encontrada nos substratos contaminados (Hussein & Brasel, 2001).

Dentre os fatores que influenciam o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas são descritos fatores implícitos, intrínsecos e extrínsecos (Ashiq et al., 2014). Os fatores implícitos são inerentes ao fungo, não somente à espécie, mas também à cepa, e à concentração do inóculo. Espécies de fungos toxigênicos podem produzir cepas não toxigênicas, e ainda, cepas produtoras de micotoxinas podem reduzir ou parar completamente sua produção quando há presença de outros fungos (JICA, 1993; Resnik, 1993). Fatores intrínsecos são inerentes ao substrato, como a disponibilidade de nutrientes, atividade de água, pH, etc. A condição estrutural do substrato também é um parâmetro importante. Nos substratos intactos, a casca constitui uma barreira natural ao ataque dos fungos. Quando há danos estruturais, causados por ataques de pragas ou descuidos no manuseio, a penetração dos esporos fúngicos nos vegetais fica facilitada (JICA, 1993; Resnik, 1993). Fatores extrínsecos são inerentes às condições que envolvem o substrato, como temperatura, umidade relativa, luz e tempo. Além disso, o uso de fertilizantes, fungicidas e praguicidas afeta as inter-relações entre o fungo, o substrato e o meio ambiente, interferindo no crescimento destes microrganismos e na produção de micotoxinas (Resnik, 1993). Não é possível descrever um conjunto único de condições favoráveis ao crescimento e à produção de toxinas pelos fungos, pela grande variedade de espécies envolvidas. A sua ocorrência no campo não pode ser eliminada, mas pode ser diminuída pela aplicação de boas práticas agrícolas (Desjardins et al., 2003).

3.3.4 Micotoxinas em Milho e Derivados

As micotoxinas são amplamente encontradas em cereais, café, cacau, amendoim e em alimentos de origem animal como carne, leite e ovos. Uma grande variedade de micotoxinas é encontrada em cereais, sendo o milho o produto que

apresenta as maiores taxas e variedades de contaminação (Resanovic et al., 2013; Battilani & Leggieri, 2015). As principais micotoxinas encontradas nas forragens e grãos estão geralmente associadas a fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* destacando-se as aflatoxinas, as fumonisinas, a ocratoxina e a zearalenona (Jobim et al., 2001; Covarelli et al., 2011; Blandino et al., 2014; Battilani & Leggieri, 2015). A contaminação do milho por micotoxinas depende da co-existência de susceptibilidade do grão e condições ambientais favoráveis para a infecção, crescimento e toxigenese fúngica (Blandino et al., 2014).

As aflatoxinas possuem efeitos tóxicos imediatos imunossupressores, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. São encontradas no leite e na urina de animais alimentados com ração contaminada. Os principais fungos aflatoxigênicos que possuem afinidade por grãos são *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (Maziero & Bersot, 2010; Prado, 2014). São classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) no Grupo 1 (Tabela 4) (IARC, 2002).

As fumonisinas podem ser fatais para alguns animais e seu efeito em humanos está associado a ocorrência de câncer de esôfago. São produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum*. O principal alimento descrito como fonte de contaminação por fumonisinas é o milho, sendo esta uma constante (Maziero & Bersot, 2010; Prado, 2014). A fumonisina B1, isômero mais abundante e mais tóxico do grupo, é classificada no Grupo 2B pela IARC (Tabela 4) (IARC, 2002).

A zearalenona é classificada no Grupo 3 de acordo IARC (Tabela 4) (IARC, 1993). Pode provocar efeitos estrogênicos, incluindo infertilidade, redução dos níveis de testosterona, redução da incidência de gravidez, hipertrofia mamária em fêmeas, feminização de machos, atrofia testicular, prolapso vaginal e edema vulvar. É produzida por fungos do gênero *Fusarium*, principalmente as espécies *F. graminearum* e *F. culmorum* (Maziero & Bersot, 2010; Prado, 2014).

A ocratoxina pode ser encontrada em vários alimentos, incluindo o milho, e é produzida por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Possui efeitos teratogênicos, imunossupressores, carcinogênicos, embriotóxicos, genotóxicos e nefrotóxicos, sendo classificada no Grupo 1 pela IARC (Tabela 4) (IARC, 1993; Prado, 2014).

Tabela 4. Categorização de substâncias pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) segundo seu potencial carcinogênico

Grupo	Critério para Inclusão na Categoria
1	Evidência suficiente de carcinogenicidade em humanos e animais experimentais.
2A	Evidência limitada de carcinogenicidade em humanos e evidência suficiente em animais experimentais.
2B	Evidência limitada de carcinogenicidade em humanos e animais experimentais.
3	Evidência inadequada para carcinogenicidade em humanos e evidência limitada em animais experimentais.
4	Evidências sugerem a não carcinogenicidade em humanos e animais experimentais.

Fonte: IARC Vol.82, 2002.

3.4 Identificação de Fungos

A grande dificuldade na identificação/classificação de fungos está relacionada ao fato do método tradicional se basear em aspectos morfológicos e fisiológicos aplicados a chaves de classificação (Arx, 1974; Hebert et al., 2003a; Sangeetha & Thangadurai, 2013). Muitas vezes os taxonomistas encontram dificuldades em determinar as características que definem uma espécie ou gênero (Guarro et al., 1999). E ainda, fases sexuadas (teleomórficas) e assexuadas (anamórficas) de um mesmo genótipo são classificadas como espécies distintas, e apresentam capacidades distintas de compartilhar material genético, resultando em dificuldade na distinção dos indivíduos (Azevedo et al., 2005).

A identificação clássica de fungos filamentosos leva em consideração principalmente as características morfológicas das estruturas reprodutivas (sexuais e assexuais). Para se identificar estas estruturas, os isolados devem ser cultivados a partir de colônias puras em meios de cultura específicos e corados com técnicas apropriadas para a manutenção das estruturas. Algumas vezes é necessário alterar

as condições de cultivo para induzir a esporulação, com a alteração do meio de cultura, aumento da iluminação ou irradiação com luz UV. Após o preparo para observação microscópica, as estruturas observadas são comparadas através de chaves de classificação (Barnett & Hunter, 1972; Azevedo et al., 2005).

Os estudos morfológicos, complementados por técnicas de coloração e métodos bioquímicos, desempenham um importante papel na identificação de fungos (Sangeetha & Thangadurai, 2013). Diferentes métodos de coloração são utilizados para a visualização de fungos, alguns de uso geral e outros especiais, portanto a escolha do mesmo se baseia principalmente na amostra utilizada (Hussain et al., 2001). Adicionalmente, métodos bioquímicos são utilizados na distinção entre gêneros de uma família e entre espécies de um gênero (Ryan & Ray, 2004). A identificação de alguns fungos, especialmente os unicelulares (leveduras) depende da sua capacidade ou incapacidade de crescer na ausência de substâncias nutricionais como fontes de carbono e nitrogênio. Outros testes se baseiam na produção de urease e proteólise, e na fermentação de carboidrato do meio produzindo ácidos, álcoois, gases, metabólitos e enzimas (Ryan & Ray, 2004).

Porém, os métodos de coloração e bioquímicos não extinguem a observação morfológica, e devem ser usados de forma complementar. A análise microscópica fornece informações importantes sobre características como tipo, tamanho, forma, e arranjo de esporos, e tamanho, cor e septação de hifas (Woods & Walker, 1996; Sangeetha & Thangadurai, 2013).

Os métodos tradicionais de identificação de espécies apresentam limitações como: demanda de mão-de-obra altamente especializada em cada grupo de organismo, impossibilidade de identificação de espécies crípticas e identificação incorreta devido à plasticidade fenotípica, variabilidade dos caracteres de acordo com a fase de vida e outros fatores (Knowlton, 1993; Jarman & Elliot, 2000).

Nos últimos anos, a capacidade de identificação precisa e reprodutível de fungos tem sido aprimorada através de métodos moleculares, dentre os quais os baseados em PCR e o sequenciamento de regiões conservadas do DNA são amplamente utilizados como ferramentas robustas (Azevedo et al., 2005; Tsui et al., 2011). Como a identidade dos seres vivos é determinada pela composição e sequência do material genético, as técnicas moleculares não estão sujeitas a

variações fenotípicas, à ação do ambiente, ao estágio de desenvolvimento do fungo (sexual ou assexual, juvenil ou adulto) e a outros fatores que possam alterar a morfologia do organismo (Martin, 2007).

As técnicas moleculares contribuem significativamente para um dos objetivos da taxonomia moderna que é entender as relações evolutivas entre as diferentes espécies. Além disso, possibilitam o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, análises filogenéticas, epidemiologia, genética de populações e ainda permitem a identificação e classificação de novas espécies (Hofreiter et al., 2000; Deguilloux et al., 2002; Azevedo et al., 2005).

3.5 DNA Barcode

Com o intuito de contornar as limitações do método tradicional de identificação de espécies, Paul Hebert e colaboradores (2003a) propuseram a padronização de um marcador para a identificação molecular de espécies animais, denominado código de barras de DNA, ou *DNA barcode*. A ferramenta, de comunicação universal, se baseia em dados de sequências curtas e padronizadas do genoma para a identificação rápida, precisa e automatizada de espécies. Segundo Hebert et al. (2003a), assim como o código de barras universal de produtos do mercado, que emprega 10 números alternados em 11 posições para gerar 100 bilhões de identificadores únicos, no *DNA barcode*, no qual há até quatro possibilidades de nucleotídeos (adenina, citosina, guanina e timina) em cada posição, a combinação de apenas 15 dessas posições de nucleotídeos criaria um bilhão de códigos únicos, número muito maior do que o de aproximadamente 15 milhões espécies conhecidas. Isso permitiria que cada táxon fosse identificado por apresentar uma sequência única de DNA barcode.

A proposta, então, foi de utilizar um fragmento de aproximadamente 650pb do gene mitocondrial da subunidade I do citocromo c oxidase (*COI* ou *cox1*) (Hebert et al., 2003b). Na prática, a sequência do DNA de um marcador padronizado pode ser obtida de uma pequena amostra de tecido de um organismo não identificado e comparada com as sequências de espécies já conhecidas depositadas em um banco de dados, a partir daí a correspondência da sequência do organismo desconhecido a

uma das sequências de referência pode fornecer uma identificação rápida e reprodutível (Kress & Erickson, 2007).

O código de barras de DNA vem sendo utilizado para diversas finalidades, como: revisões taxonômicas (Hajibabaei et al., 2007), identificação e descrição de novas espécies (Hebert et al., 2004b), identificação de espécies crípticas (Hebert et al., 2004a; Smith et al., 2007), detecção de espécies invasivas no ecossistema (Armstrong & Ball, 2005; Van den Wiel et al., 2009), estudos de biodiversidade (Costion et al., 2011), identificação de pragas agrícolas (Miller, 2007), autenticação de alimentos (Gil, 2007; Wong & Hanner, 2008), fiscalização contra o comércio ilegal de espécies ameaçadas de extinção e madeira extraída ilegalmente (Eaton et al., 2010; Lowe & Cross, 2011), entre outras.

A região do gene *COI* é utilizada na identificação de quase todos os grupos animais, se mostrando altamente eficaz na identificação de pássaros (Hebert et al., 2004b; Yoo et al., 2006), borboletas (Hajibabaei et al., 2005; Hebert et al., 2010), peixes (Ward et al., 2005), barbeiros (Footit et al., 2008) e outros grupos (Smith et al., 2008; Clare et al., 2011; Nagy et al., 2012). A vantagem desta região é que é curta o suficiente para ser sequenciada de forma rápida e barata, e longa o suficiente para identificar variações entre as espécies (Br-BOL, 2015).

Apesar do *COI* ser eficaz na discriminação da maioria das espécies de animais, este sucesso não se repete para o estudo de plantas e fungos. A alta taxa evolutiva do genoma mitocondrial seria uma característica sinapomórfica para os animais e não seria compartilhada com as plantas e com os fungos. Entre as plantas, o *COI* frequentemente apresenta introns derivados de transferências gênicas horizontais (Cho et al., 1998) e baixas taxas de substituição, assim como o genoma mitocondrial das plantas como um todo (Palmer & Herbon, 1988). Neste caso, o CBoL (Consortium for the Barcode of Life) recomenda a utilização dos marcadores *rbcL* (ribulose-1,5-biphosfate carboxylase/oxygenase) e *matK* (megakaryocyte-associated tyrosine kinase) (CBoL Plant Working Group, 2009).

Entre os fungos, a região *COI* funciona razoavelmente bem somente para alguns gêneros, como *Penicillium* (Seifert et al., 2007), no entanto é inconsistente para alguns grupos (Gilmore et al., 2009; Dentinger et al., 2011). Assim sendo, *COI* foi rejeitada como código de barras de DNA de fungos por ser de difícil amplificação, não

ser suficientemente variável e frequentemente incluir múltiplos introns. O rDNA é uma região importante para avaliação de polimorfismo nos fungos. Existem muitas cópias de rDNA, como 18S, 5.8S e 28S, altamente conservadas entre espécies de fungos, e que são arranjadas por espaços não codificados (Bruns et al., 1991). Neste caso, a região ITS (*Internal Transcribed Spacer* – espaçador interno transcrito) tem sido amplamente utilizada e foi estabelecida como o código de barras de DNA de fungos (Begerow et al., 2010; Schoch, C L; Seifert, K A; Huhndorf, S; Robert, V; Spouge, J L; Levesque, C A; Chen, W and Fungal Barcoding Consortium, 2012). Localiza-se entre as regiões mais conservadas 18S e 28S, e inclui a região 1 do espaçador interno transcrito (ITS1), o gene 5.8S do rDNA e a região 2 do espaçador interno transcrito (ITS2) (Gomes et al., 2002). Estas regiões espaçadoras são menos conservadas e evoluem mais rapidamente que os genes ribossomais, por isso são muito úteis na determinação de relações evolutivas em nível de espécie (Wang et al., 2015). Desta forma, a região ITS é conservada em uma mesma espécie e variável entre espécies diferentes.

Além da região ITS, outros marcadores nucleares têm mostrado eficiência para alguns grupos de fungos e também têm sido usados, ainda informalmente, como códigos de barra de DNA secundários (Schoch et al., 2011). São eles: a β -tubulina (bTUB) (Frisvad & Samsom, 2004), o fator de alongação 1- α (EF-1- α) (O'Donnell et al., 2010), a segunda subunidade maior da RNA polimerase II (RPB2) (James T et al., 2006) e determinados trechos das subunidades nucleares ribossômicas maior (LSU rDNA) (Kurtzman & Robnett, 1998) e menor (SSU rDNA) (Mahé et al., 2012). A escolha da sequência candidata a código de barras de DNA deve se basear nos seguintes critérios: ser constante e única para uma espécie e apresentar variação interespecífica maior do que a intraespecífica (*barcode gap*) (Hebert et al., 2003a; 2003b).

4 METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado em parceria entre a Fundação Ezequiel Dias (Laboratório de Micologia e Laboratório de Biologia Molecular da Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental), o Centro de Pesquisas René Rachou (Grupo de Genômica e Biologia Computacional), a Universidade Federal de Lavras (Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos) e a Universidade Estadual de Feira de Santana (Laboratório de Pesquisas em Microbiologia e Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia).

Este projeto faz parte de outros dois projetos do CNPq e um convênio da ANVISA: **Biodiversidade de fungos micotoxigênicos em grão de milho de cultivo convencional, orgânico e transgênico por taxonomia clássica e molecular** (Coordenadora: Jovita E. Gazzinelli Cruz Madeira - Edital MCT-SECIS/CNPq Nº 019/2010), **Identificação molecular de fungos do Brasil** (Coordenador: Aristóteles Góes Neto - Edital MCT/CNPq/FNDCT Nº 50/2010 – Identificação Molecular da Biodiversidade, visando a formação de uma Rede de Pesquisa Nacional de Identificação Molecular da Biodiversidade Brasileira - Rede brasileira de identificação molecular da biodiversidade/ BR-BoL), e **Implantação e validação de metodologias e análises de alimentos que visam verificar a conformidade com a Resolução – RDC nº 7, de 18 fevereiro de 2011** (Coordenadora: Marize Silva de Oliveira – MS-ANVISA 04/2011)

4.1 Amostras

Foram utilizados fungos filamentosos isolados de amostras de milho e derivados provenientes de coletas do comércio pela Vigilância Sanitária do estado de Minas Gerais (VISA), de fazendas da região da cidade de Patos de Minas (MG), grande produtora de milho, e do Centro Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), no período de 2010 a 2013, pelo laboratório de Micologia da Fundação Ezequiel Dias. Após a identificação morfológica, os isolados fúngicos foram preservados em água destilada de acordo com o método de Castellani (1939). O isolamento foi realizado como parte do projeto “**Biodiversidade de fungos micotoxigênicos em grão de milho de cultivo convencional, orgânico e transgênico por taxonomia clássica e molecular**”.

No início deste trabalho foi verificada a viabilidade de crescimento dos fungos e foram selecionados até 5 espécimes de cada espécie identificada, pertencentes aos gêneros potencialmente micotoxigênicos: *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, para compor o grupo de estudo. Para as espécies que não apresentaram o mínimo de 3 espécimes isolados, foram utilizadas sequências provenientes de Bancos de Dados públicos, como NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e UNITE (<http://unite.ut.ee>), para as análises de código de barras de DNA.

4.2 Identificação morfológica e depósito em coleção de cultura credenciada pelo Ministério do Meio Ambiente

Os fungos isolados segundo Beuchat & Cousin (2001) foram identificados no Laboratório de Micologia da Fundação Ezequiel Dias de acordo com Samson *et al.* (2002), Pitt (2000), Pitt & Hocking (1999), Klich (2002) e Leslie & Summerell (2006). Adicionalmente, os fungos do gênero *Fusarium* foram identificados no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos da Universidade Federal de Lavras, de acordo com Leslie & Summerell (2006).

Foi realizado registro fotográfico macro e microscópico dos 41 isolados selecionados para o estudo, os quais foram depositados na Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB), da Universidade Estadual de Feira de Santana, correspondendo aos seguintes números de acesso: CCMB 618P a CCMB 658P.

4.3 Extração de DNA genômico

Para a extração do DNA genômico (gDNA) as colônias dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram crescidas em placa contendo ágar CZAPEK + 0,5% de extrato de levedura (CYA), e as colônias do gênero *Fusarium* foram crescidas em placas contendo Ágar-Dextrose-Batata. Após crescimento fúngico a 25°C ± 2°C por 7 a 10 dias, e em seguida foi coletada uma pequena quantidade de micélio da placa, de acordo com a textura do fungo. Para fungos mais rígidos, uma área de aproximadamente 1x1 cm, removendo o máximo de meio de cultura possível. Para fungos mais cotonosos, com crescimento aéreo, uma área de aproximadamente 2x2

cm foi raspada superficialmente. Estes micélios foram transferidos para microtubos de 1,5mL contendo 400 μ L de tampão de lise (Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS 1%). Os microtubos foram congelados e os micélios triturados com auxílio de um pistilo estéril. A cada microtubo, foram adicionados aproximadamente 10 mg de PVP e 10 μ L de Proteinase K (20 mg/mL), seguido de homogeneização em vórtex e incubação por 30 minutos a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente foram adicionados 162 μ L de tampão CTAB (Tris 0,2 M, NaCl 8,2%, EDTA 0,2 M e CTAB 0,2%), homogeneizados em vórtex e incubados por 10 minutos a $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Em seguida foram adicionados 570 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), os tubos foram homogeneizados por inversão e incubados em gelo por 30 minutos. Após este período, o material foi centrifugado a 16500 xg por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5mL onde foi adicionado 10% do volume de acetato de sódio 3 M e realizada homogeneização por inversão. Os tubos foram incubados a $-22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por, no mínimo, 30 minutos. Nova centrifugação a 16500 xg por 10 min foi realizada após descongelamento das amostras. O líquido sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, ao qual foi adicionado 50% do volume de isopropanol PA gelado e realizada homogeneização por inversão seguida de centrifugação a 16500 xg por 5 minutos. O líquido sobrenadante foi desprezado por inversão e o *pellet* foi lavado com 200 μ L de etanol 70% gelado seguido de centrifugação a 16500 xg por 5 minutos. As etapas de lavagem e centrifugação foram repetidas, e o sobrenadante foi retirado com pipeta. Após secagem completa do precipitado, o DNA foi eluído em 50 μ L de TE (Tris-EDTA 10:1) aquecido a $65-70^{\circ}\text{C}$ e quantificado em espectrofotômetro (Nanovue Plus - GE Healthcare) nos comprimentos de onda de 260, 280 e 320 nm. As soluções de gDNA foram armazenadas a $-22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ até utilização e passaram a compor um banco de gDNA associado aos espécimes-testemunhos (*vouchers*) da coleção micológica.

4.4 Amplificação dos segmentos de DNA por PCR

Para a obtenção de amplicons que abranjam completamente o segmento de DNA definido como código de barras de DNA para fungos (Região ITS do DNA ribossômico nuclear), o gDNA de todas as amostras foi amplificado através de PCR

qualitativa em termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf) utilizando os iniciadores ITS5 e ITS4 de acordo com White et al., 1990 (Tabela 5). A reação foi preparada para um volume total de 25 μ L, contendo 1X tampão Taq, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de DNTP's, 0,25 pmoles de cada iniciador, 0,5 U de Taq DNA Polimerase e 1 a 5 ng de DNA. O programa de ciclagem estabelecido foi: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 31 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, sendo finalizado com uma extensão a 72°C por 5 minutos.

O gene que codifica a subunidade maior da RNA polimerase II (RPB2) também foi amplificado em todas as amostras, utilizando os iniciadores 5F2 e 7cR de acordo com O'Donnell et al. (2008) (Tabela 5). A reação foi preparada para um volume total de 25 μ L, contendo 1X tampão Taq, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de DNTP's, 0,25 pmoles de cada iniciador, 0,5 U de Taq DNA Polimerase e 0,1 a 5 ng de DNA. O programa de ciclagem estabelecido para este gene foi: desnaturação inicial a 94°C por 90 segundos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 90 segundos e extensão a 68°C por 2 minutos, sendo finalizado com extensão a 68°C por 5 minutos.

Além destas regiões, foi amplificado ainda o gene da beta-tubulina (bTUB ou BenA), utilizando os iniciadores T1 e T2 de acordo com O'Donnell & Cigelnik (1997) (Tabela 5). A reação foi preparada para um volume total de 25 μ L, contendo 1X tampão Taq, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de DNTP's, 0,25 pmoles de cada iniciador, 0,5 U de Taq DNA Polimerase e 1 a 5 ng de DNA. O programa de ciclagem estabelecido para foi: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 61°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, sendo finalizado com extensão a 72°C por 5 minutos.

Em todas as reações de PCR foi realizado o controle dos reagentes através de uma reação contendo água tipo I estéril ao invés do DNA molde (Controle negativo). Da mesma forma, a partir da segunda reação de cada região, foi realizado também um controle de eficiência da reação, utilizando como controle positivo alguma amostra que tenha apresentado o amplicon esperado na reação anterior. Os produtos resultantes das amplificações foram submetidos a eletroforese convencional em gel de agarose a 2%, corado com Brometo de Etídeo (0,5 μ g/mL), utilizando-se 10 μ L do

produto e 2 µL de tampão de amostra 6X (Azul de Bromofenol 0,25%, Xileno de Cianol 0,25%, Glicerol 30%), para visualização dos resultados.

Para obter sucesso de amplificação de todas as amostras, as reações foram realizadas em diferentes condições. A cada condição testada, as amostras que apresentaram resultado satisfatório, ou seja, apresentaram o amplicon esperado, seguiram para a etapa seguinte, e as amostras que não apresentaram o amplicon esperado (resultado insatisfatório), foram submetidas a novas condições, até a obtenção dos amplicons de todas as amostras. Inicialmente foi utilizada Taq DNA polimerase (Uniscience) para todas as reações. As amostras que não apresentaram o amplicon esperado foram amplificadas sob diferentes condições, como: utilizando a mesma enzima com os aditivos BSA 1,5 µg (Albumina de soro bovino), DMSO 1% (Dimetilsulfóxido) e Betaína 1 M (Trimetilglicina) ou utilizando uma enzima mais sensível, HiFi HotStart PCR Kit (Kapa), seguida da utilização da mesma enzima com os aditivos citados anteriormente. Alternativamente, algumas amostras foram amplificadas com outras três enzimas: GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega), JumpStart Taq DNA Polimerase (Sigma) e Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen), com e sem os aditivos. Além da enzima DNA polimerase e da utilização dos aditivos, foi realizada também uma variação na concentração de DNA (0,01; 0,05; 0,1; 1,0 e 5,0 ng).

Tabela 5. Identificação dos iniciadores específicos para amplificação das regiões ITS, RPB2 e bTUB

Região	Iniciador	Direção	Sequência (5'- 3')	Referência	Fragmento esperado
ITS	ITS5	Direta	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	White et al., 1990	~580 pb
	ITS4	Reversa	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		
RPB2	5F2	Direta	GGA AGT ACC AGT GAT CAT GTT	O'Donnell et al., 2008	~860 pb
	7cR	Reversa	GGG GWG AYC AGA AGA AGG C		
bTUB	T1	Direta	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	O'Donnell & Cigel'nik, 1997	~560 pb
	T2	Reversa	TAG TGA CCC TTG GCC CAG TTG		

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

4.5 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos das reações de PCR foram purificados utilizando o kit *GE Illustra GFX PCR DNA and Gel band*, conforme instruções do fabricante. Aos 15 µL restantes de cada reação satisfatória foram adicionados 500 µL do *Buffer type 3*. O volume total foi transferido para uma coluna *GFX Microspin* acoplada a um tubo de coleta, que foram submetidos à centrifugação a 16000xg por 30 segundos. O filtrado foi descartado por inversão e a coluna recolocada no tubo de coleta. Foram adicionados 500 µL do *Wash buffer type 1* à coluna e realizada novamente centrifugação a 16000 xg por 30 segundos. O tubo de coleta foi descartado com o filtrado e a coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL estéril. Para eluição do DNA foram adicionados 50 µL do *Elution buffer type 6* ao centro da coluna, que foi incubada à temperatura ambiente por 1 minuto e em seguida centrifugada a 16000 xg por 1 minuto. As soluções de DNA purificado foram armazenadas a $-22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ até utilização.

O DNA amplificado de uma única amostra foi purificado a partir do gel de agarose utilizando o mesmo kit *GE Illustra GFX PCR DNA and Gel band*. Um pedaço de gel contendo o amplicon de interesse foi cortado sob luz UV com auxílio de um bisturi estéril, e, em seguida, pesado e acondicionado em microtubo de 1,5 mL. Foram adicionados 300 µL do *Capture buffer type 3* e o microtubo foi incubado a 60°C até completa dissolução da agarose, sendo homogeneizado por inversão a cada 3 minutos. Em seguida a mistura foi transferida para uma coluna *GFX Microspin* acoplada a um tubo de coleta e submetida aos mesmos passos da purificação das reações de PCR descritos anteriormente.

4.6 Sequenciamento de DNA

As amostras purificadas foram submetidas a sequenciamento capilar pelo método de Sanger na plataforma de Sequenciamento de DNA e Genotipagem (RPT01E) da RPT do PDTIS, localizada no Centro de Pesquisa René Rachou. Para a reação de sequenciamento foram utilizados os mesmos iniciadores das reações de PCR na concentração de 5,0 pmol/µL, 5 a 20 ng de DNA, 0,5 µL de *Big Dye*, 1,75 µL

de tampão e quantidade suficiente de água ultrapura estéril para volume final de 10 μ L. O programa de ciclagem consistiu em desnaturação por 1 minuto a 96°C, seguida de 35 a 40 ciclos de anelamento a 96°C e extensão a 50°C por 15 segundos cada, e extensão final a 60°C por 4 minutos. Os produtos do sequenciamento foram precipitados em microplaca protegidos da luz. Em cada poço foram adicionados 1 μ L de EDTA 125 mM, 1 μ L de acetato de amônio 7,5 M e 50 μ L de etanol absoluto. A placa foi selada, vortexada e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foi centrifugada a 1800 xg por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e foram adicionados 100 μ L de etanol 70%. A placa foi centrifugada a 1800 xg por 15 minutos e o sobrenadante novamente descartado por inversão. Para completa secagem da placa, foi realizado um rápido spin com a placa invertida. Foram adicionados 10 μ L de Formamida Hi-Di para posterior injeção das amostras no sistema automatizado ABI Prism 3730 (Applied Biosystems).

4.7 Análise das sequências obtidas pelo sequenciamento

As sequências obtidas no sequenciamento foram editadas e analisadas utilizando o programa *Geneious* v. 6.1. Primeiramente as sequências foram marcadas como direta ou reversa, de acordo com o iniciador utilizado na reação, e em seguida foi feito o corte das extremidades que apresentam baixa qualidade de leitura. A qualidade das sequências foi avaliada manualmente, através da verificação dos parâmetros: HQ% (percentual de bases com alta qualidade), LQ% (percentual de bases com baixa qualidade) e *Post-Trim* (tamanho da sequência após corte das extremidades). Sequências com HQ% <40, LQ% >35 e/ou *Post-Trim* <200pb foram consideradas insatisfatórias e as amostras foram sequenciadas novamente. Em seguida, as sequências satisfatórias foram alinhadas para a montagem do *contig* referente a cada amostra. Os *contigs* foram então avaliados e editados manualmente, sempre que necessário e possível, através da comparação dos eletroferogramas de cada leitura (direta e reversa). Foram então geradas as sequências-consenso que, em seguida, foram comparadas a sequências depositadas no banco de dados de sequências nucleotídicas do NCBI através da ferramenta *Linnaeus Search* do *Geneious*. As amostras cujo *Top Hit* não chegou a uma espécie definida, ou

apresentou identidade com uma espécie diferente da espécie identificada por morfologia tiveram, adicionalmente, suas sequências-consenso comparadas ao banco de sequências nucleotídicas diretamente no *website* do NCBI, para a verificação de possíveis identificações morfológicas incorretas ou contaminações durante os experimentos.

4.8 Análise tradicional de código de barras de DNA

Para cada região genômica, as sequências selecionadas nos bancos de dados foram importadas em formato FASTA para o programa *Geneious* v. 6.1 para análise tradicional de código de barras de DNA juntamente com as sequências-consenso geradas. Foi então gerada uma matriz de distâncias (utilizando-se a distância de *Jukes-Cantor*) entre as sequências de cada gênero, através da ferramenta *Tree*, que foi importada para o *Microsoft Excel*. Os dados de distância gerados foram organizados de acordo com as distâncias intraespecíficas e interespecíficas, e em seguida foram inseridos no programa *Past* 3.0. Foram gerados gráficos dos tipos *BoxPlot* e *JitterPlot* utilizando a ferramenta *Plot*, para a visualização da dispersão das comparações par-a-par entre as amostras de cada gênero e análise dos resultados encontrados. Em seguida foi realizada a comparação entre as hipóteses de espécies geradas com as espécies identificadas morfológicamente segundo metodologia descrita em Schoch et al. (2012).

4.9 Análise de *barcode Gap* (ABGD)

Adicionalmente foi realizada uma análise de *barcode Gap* utilizando o programa *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) disponível em <http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html> (Puillandre et al., 2012). Para esta análise, as sequências de cada região genômica foram alinhadas no programa *Geneious* v. 6.1, através da ferramenta *Multiple Align*. Os dados gerados foram inseridos no ABGD e analisados com base na distância *Jukes-Cantor*, para

visualização das possíveis hipóteses de espécies e comparação com os resultados obtidos por análise de código de barras tradicional e as identificações por morfologia.

5 RESULTADOS

5.1 Amostras: Identificação morfológica, seleção, depósito em Coleção de Culturas e extração de DNA genômico

Foram obtidos 2149 isolados fúngicos dos grãos e derivados de milho analisados entre 2010 e 2013, como parte do projeto “Biodiversidade de fungos micotoxigênicos em grão de milho de cultivo convencional, orgânico e transgênico por taxonomia clássica e molecular”. Destes isolados, 1273 pertencem ao gênero *Fusarium*, 190 ao gênero *Aspergillus* e 386 ao gênero *Penicillium* (Figura 6). Os demais isolados (400) pertencem aos gêneros não-micotoxigênicos: *Absidia* (0,09%), *Acremonium* (14,19%), *Aureobasidium* (0,79%), *Eurotium* (1,02%), *Geomyces* (0,60%), *Geotrichum* (0,05%), *Moniliella* (1,21%), *Paecilomyces* (0,42%), *Rhizopus* (0,09%) e *Scopulariopsis* (0,14%).

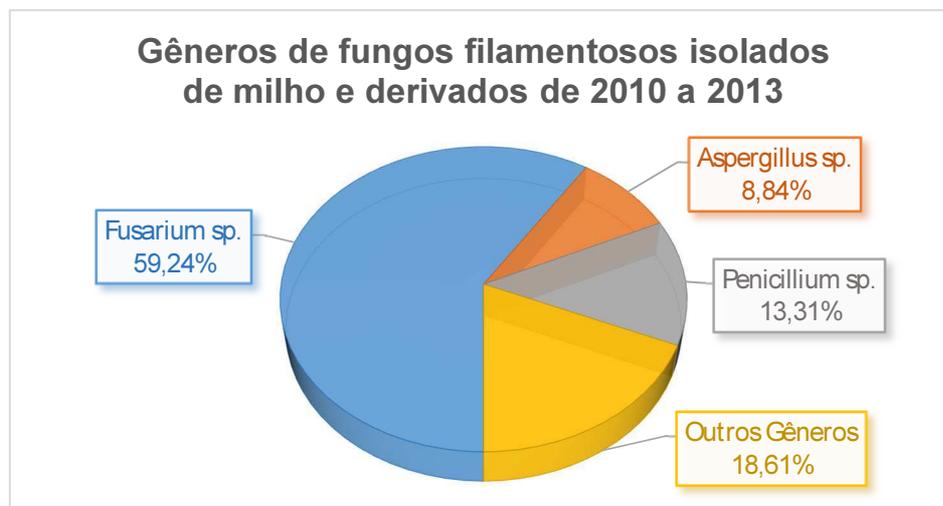


Figura 6. Gráfico representativo dos gêneros fúngicos isolados no projeto “Biodiversidade de fungos micotoxigênicos em grão de milho de cultivo convencional, orgânico e transgênico por taxonomia clássica e molecular”.

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

Dentre os isolados identificados por morfologia como espécies do gênero *Fusarium* na FUNED, 53 foram re-identificados no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos da UFLA, por especialistas no gênero. Uma amostra apresentou

controvérsia nas identificações tendo sido identificada como *Fusarium semitectum* na FUNED e *Fusarium lateritium* na UFLA (amostra PBC-045). A amostra PBC-002 foi identificada como *Fusarium* sp. na FUNED e como *Fusarium semitectum* na UFLA. Os demais isolados foram identificados como *Fusarium verticillioides* em ambos os laboratórios.

Sete espécies do gênero *Aspergillus* foram identificadas morfológicamente na FUNED, sendo elas *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niveus*, *A. terreus* e *A. wentii*.

Nove espécies do gênero *Penicillium* foram identificadas morfológicamente na FUNED, correspondendo a *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. funiculosum*, *P. glabrum*, *P. islandicum*, *P. oxalicum*, *P. raistrickii*, *P. paxilli* e *P. decumbens*. Os isolados das espécies *P. paxilli* e *P. decumbens* não foram incluídos no estudo por não apresentarem viabilidade de crescimento, assim como um isolado da espécie *P. corylophilum*.

De acordo com a viabilidade dos fungos, e respeitando o critério de seleção de até 5 espécimes de cada espécie identificada, foram definidas então 41 amostras, isoladas de diferentes substratos e de diferentes procedências, para compor o grupo de estudo (Tabela 6). As fotografias do registro macro e microscópico, representativas das espécies pertencentes ao grupo de estudo, encontram-se no Apêndice A.

Tabela 6. Identificação das amostras, número do *voucher* associado, espécie identificada por morfologia, substrato e procedência

Cód. FUNED	Voucher CCMB	Espécie identificada morfológicamente	Substrato	Procedência
PBC-001	618P	<i>Fusarium verticillioides</i>	Grão	Fazenda Farroupilha
PBC-002	619P	<i>Fusarium</i> sp. (FUNED) <i>Fusarium semitectum</i> (UFLA)	Grão	Fazenda Farroupilha
PBC-007	620P	<i>Fusarium verticillioides</i>	Grão	IAC
PBC-040	621P	<i>Fusarium verticillioides</i>	Farinha de milho orgânica	Comércio
PBC-043	622P	<i>Fusarium verticillioides</i>	Fubá creme	Comércio
PBC-045	623P	<i>Fusarium semitectum</i> (FUNED) <i>Fusarium lateritium</i> (UFLA)	Pipoca	Comércio
PBC-049	624P	<i>Fusarium verticillioides</i>	Canjiquinha	Comércio

Tabela 6. Cont.

Cód. FUNED	Voucher CCMB	Espécie identificada morfológicamente	Substrato	Procedência
PBC-054	625P	<i>Aspergillus candidus</i>	Farinha de milho	Comércio
PBC-055	626P	<i>Aspergillus clavatus</i>	Fubá	Comércio
PBC-057	627P	<i>Aspergillus flavus</i>	Fubá	Comércio
PBC-058	628P	<i>Aspergillus flavus</i>	Fubá	Comércio
PBC-059	629P	<i>Aspergillus flavus</i>	Farinha de milho	Comércio
PBC-061	630P	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Farinha de milho	Comércio
PBC-062	631P	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fubá	Comércio
PBC-063	632P	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fubá	Comércio
PBC-064	633P	<i>Aspergillus niveus</i>	Fubá	Comércio
PBC-065	634P	<i>Aspergillus niveus</i>	Fubá	Comércio
PBC-066	635P	<i>Aspergillus terreus</i>	Fubá	Comércio
PBC-067	636P	<i>Aspergillus wentii</i>	Fubá	Comércio
PBC-100	637P	<i>Aspergillus flavus</i>	Farinha de milho	Comércio
PBC-101	638P	<i>Aspergillus flavus</i>	Farinha de milho	Comércio
PBC-076	639P	<i>Penicillium citrinum</i>	Canjica	Comércio
PBC-077	640P	<i>Penicillium citrinum</i>	Canjiquinha	Comércio
PBC-078	641P	<i>Penicillium citrinum</i>	Fubá	Comércio
PBC-079	642P	<i>Penicillium citrinum</i>	Grão	IAC
PBC-080	643P	<i>Penicillium citrinum</i>	Grão	IAC
PBC-082	644P	<i>Penicillium corylophilum</i>	Fubá	Comércio
PBC-083	645P	<i>Penicillium corylophilum</i>	Farinha de milho	Comércio
PBC-085	646P	<i>Penicillium funiculosum</i>	Fubá	Comércio
PBC-086	647P	<i>Penicillium funiculosum</i>	Farinha de milho	Comércio
PBC-087	648P	<i>Penicillium funiculosum</i>	Canjiquinha	Comércio
PBC-088	649P	<i>Penicillium funiculosum</i>	Grão	IAC
PBC-089	650P	<i>Penicillium funiculosum</i>	Grão	Fazenda Pindorama
PBC-090	651P	<i>Penicillium glabrum</i>	Grão	IAC
PBC-091	652P	<i>Penicillium islandicum</i>	Fubá	Comércio

Tabela 6. Cont.

Cód. FUNED	Voucher CCMB	Espécie identificada morfológicamente	Substrato	Procedência
PBC-092	653P	<i>Penicillium oxalicum</i>	Fubá	Comércio
PBC-093	654P	<i>Penicillium oxalicum</i>	Fubá	Comércio
PBC-094	655P	<i>Penicillium oxalicum</i>	Fubá	Comércio
PBC-095	656P	<i>Penicillium oxalicum</i>	Grão	IAC
PBC-096	657P	<i>Penicillium oxalicum</i>	Fubá	Comércio
PBC-099	658P	<i>Penicillium raistrickii</i>	Cuscuz	Comércio

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

O método de extração de DNA utilizado permitiu a obtenção de quantidade suficiente de gDNA para a realização dos experimentos de amplificação de todas as amostras. A concentração de gDNA obtido, num total de 50 μL , variou de 16 a 115 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para as amostras de *Fusarium*, com média de 53 $\text{ng}/\mu\text{L}$; de 65 a 452 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para as amostras de *Aspergillus*, com média de 237 $\text{ng}/\mu\text{L}$; e de 56 a 789 $\text{ng}/\mu\text{L}$, com média de 398 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Foram selecionadas ainda 41 sequências nos bancos de dados públicos (NCBI e UNITE), identificadas na Tabela 7, correspondentes às espécies cujo número de amostras foi inferior a três, para compor também o grupo de estudo.

A amostra PBC-002 não pôde ser incluída nas análises de código de barras de DNA, pois não há sequências disponíveis da espécie *Fusarium semitectum* nos bancos de dados pesquisados.

As matrizes de distâncias geradas a partir das comparações par-a-par entre as sequências das amostras do estudo, para cada região, encontram-se no Apêndice C.

Tabela 7. Identificação das sequências selecionadas em bancos de dados

Região	Espécie	Cód.
ITS	<i>Fusarium lateritium</i>	AY904057
	<i>Fusarium lateritium</i>	FN547445
	<i>Aspergillus candidus</i>	AY373842
	<i>Aspergillus candidus</i>	EF66960
	<i>Aspergillus clavatus</i>	GU183164
	<i>Aspergillus clavatus</i>	HQ026749
	<i>Aspergillus niveus</i>	AY373853
	<i>Aspergillus terreus</i>	EF432562
	<i>Aspergillus wentii</i>	AY373884
	<i>Aspergillus wentii</i>	EF652158
	<i>Penicillium corylophilum</i>	AF033450
	<i>Penicillium corylophilum</i>	KP329705
	<i>Penicillium corylophilum</i>	KP329605
	<i>Penicillium glabrum</i>	FJ904924
	<i>Penicillium glabrum</i>	JN887323
	<i>Penicillium islandicum</i>	AF455543
	<i>Penicillium islandicum</i>	FJ872071
	<i>Penicillium islandicum</i>	JN899318
	<i>Penicillium raistrickii</i>	KP152490
	<i>Penicillium raistrickii</i>	KR12430
RPB2	<i>Fusarium lateritium</i>	JF740959
	<i>Fusarium lateritium</i>	JF741009
	<i>Aspergillus candidus</i>	EF669651
	<i>Aspergillus candidus</i>	JN121535
	<i>Aspergillus clavatus</i>	EF669785
	<i>Aspergillus clavatus</i>	EU982099
	<i>Aspergillus niveus</i>	EF669657
	<i>Aspergillus terreus</i>	EF669660
	<i>Aspergillus terreus</i>	LC000577
	<i>Aspergillus wentii</i>	EF652095
	<i>Aspergillus wentii</i>	JN121418
	<i>Penicillium corylophilum</i>	FJ004460
	<i>Penicillium corylophilum</i>	JN406569
	<i>Penicillium glabrum</i>	FJ004470
	<i>Penicillium glabrum</i>	GU372898
	<i>Talaromyces islandicus</i>	KF985015
<i>Penicillium islandicum</i>	JN121495	
<i>Talaromyces islandicus</i>	KF196969	
<i>Penicillium raistrickii</i>	JN606589	
bTUB	<i>Fusarium lateritium</i>	FN554626
	<i>Fusarium lateritium</i>	KJ125878

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

5.2 Experimentos e Análises da Região ITS

O primeiro experimento de PCR para a região ITS, utilizando Taq DNA Polimerase (Uniscience) e 5 ng de DNA, foi satisfatório para 26 das 41 amostras totais (Figura 7). Em seguida, experimentos utilizando menores concentrações de DNA (0,01; 0,05 e 0,1 ng) não foram satisfatórios para nenhuma amostra. O experimento seguinte utilizando Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 1 ng de DNA foi satisfatório para 2 de 15 amostras (Figura 8). Posteriormente o experimento utilizando HIFI HotStart PCR Kit (Kapa) e 1 ng de DNA foi satisfatório para 5 de 13 amostras (Figura 9). E finalmente, o experimento utilizando HIFI HotStart PCR Kit (Kapa) com os aditivos BSA, DMSO e Betáína, e 1 ng de DNA, foi satisfatório para as 8 amostras restantes (Figura 10).

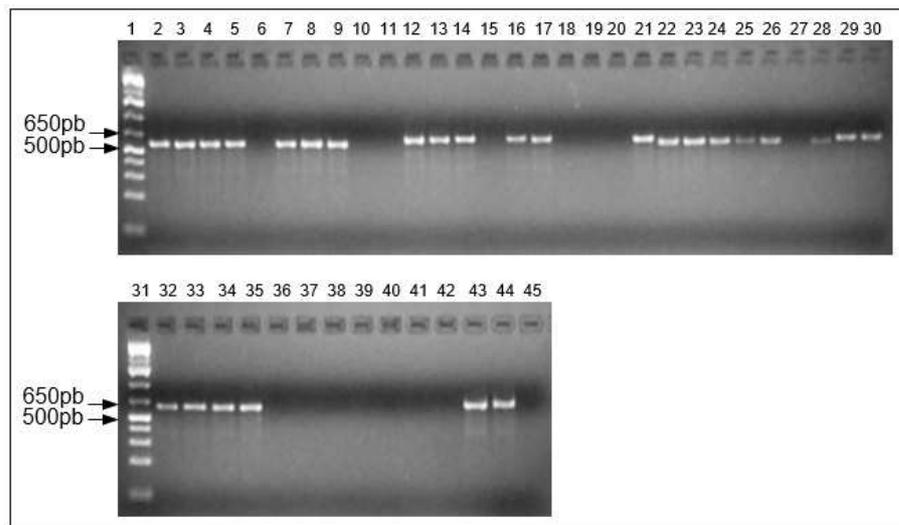


Figura 7. Eletroforese da Região ITS utilizando Taq DNA polimerase (Uniscience) e 5 ng de DNA.

Canaletas: 1 e 31-Marcador Molecular 1 kb Plus, 2-PBC-001, 3-PBC-002, 4-PBC-007, 5-PBC-007, 6-PBC-040, 7-PBC-043, 8-PBC-045, 9-PBC-049, 10-PBC-054, 11-PBC-055, 12-PBC-057, 13-PBC-058, 14-PBC-059, 15-PBC-061, 16-PBC-062, 17-PBC-063, 18-PBC-064, 19-PBC-065, 20-PBC-066, 21-PBC-067, 22-PBC-076, 23-PBC-077, 24-PBC-078, 25-PBC-079, 26-PBC-080, 27-PBC-082, 28-PBC-083, 29-PBC-085, 30-PBC-086, 32-PBC-087, 33-PBC-088, 34-PBC-089, 35-PBC-090, 36-PBC-091, 37-PBC-092, 38-PBC-093, 39-PBC-094, 40-PBC-095, 41-PBC-096, 42-PBC-099, 43-PBC-100, 44-PBC-101, 45-Controle Negativo. Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

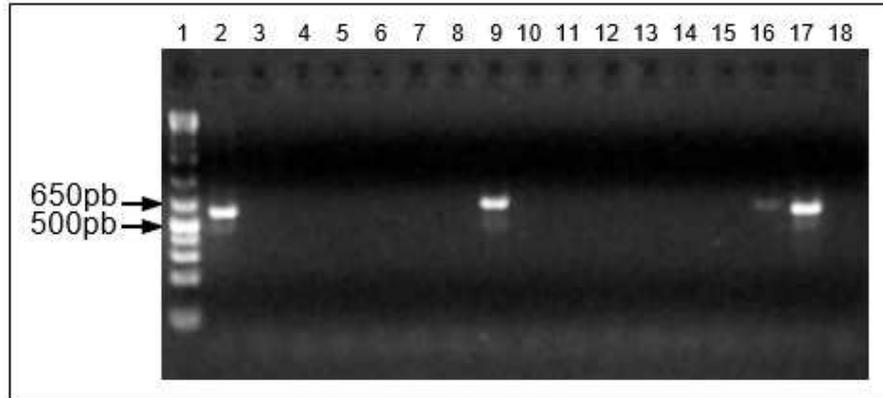


Figura 8. Eletroforese da Região ITS utilizando Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 1 ng de DNA.

Canaletas: 1-Marcador Molecular 1 kb Plus, 2-PBC-040, 3-PBC-054, 4-PBC-055, 5-PBC-061, 6-PBC-064, 7-PBC-065, 8-PBC-066, 9-PBC-082, 10-PBC-091, 11-PBC-092, 12-PBC-093, 13-PBC-094, 14-PBC-095, 15-PBC-096, 16-PBC-099, 17-Controle Positivo (5 ng PBC-001), 18-Controle Negativo. Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

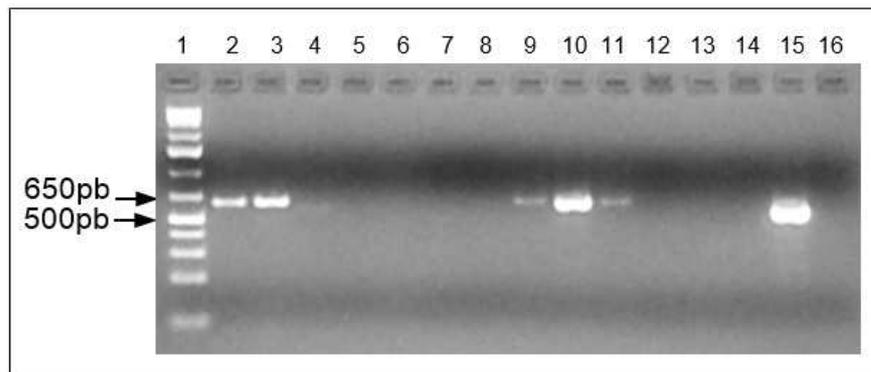


Figura 9. Eletroforese da Região ITS utilizando HIFI HotStart PCR Kit (Kapa) e 1 ng de DNA.

Canaletas: 1-Marcador Molecular 1 kb Plus, 2-PBC-054, 3-PBC-055, 4-PBC-061, 5-PBC-064, 6-PBC-065, 7-PBC-066, 8-PBC-091, 9-PBC-092, 10-PBC-093, 11-PBC-094, 12-PBC-095, 13-PBC-096, 14-PBC-099, 15-Controle Positivo (5 ng PBC-001), 16-Controle Negativo. Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

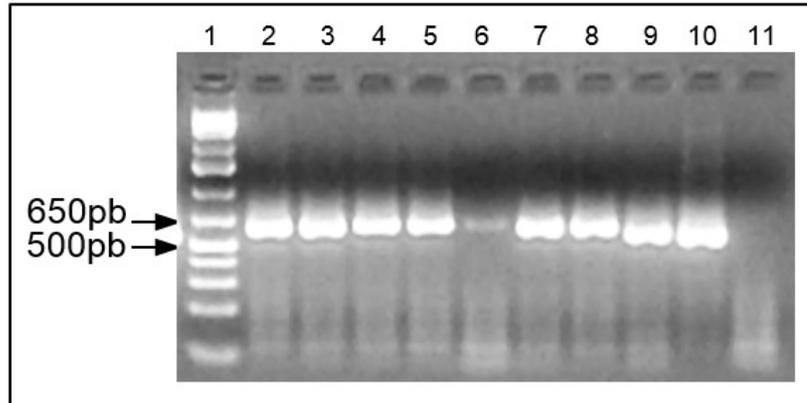


Figura 10. Eletroforese da Região ITS utilizando HIFI HotStart PCR Kit (Kapa) com os aditivos BSA, DMSO e Betaína, e 1 ng de DNA.

Canaletas: 1-Marcador Molecular 1 kb Plus, 2-PBC-061, 3-PBC-064, 4-PBC-065, 5-PBC-066, 6-PBC-091, 7-PBC-095, 8-PBC-096, 9-PBC-099, 10-Controle Positivo (5 ng PBC-001), 11-Controle Negativo.
Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

As reações de sequenciamento da região ITS apresentaram eletroferogramas com picos bem definidos, e boa qualidade de leitura (Figura 11). O sequenciamento apresentou sucesso em 91,5% das amostras na primeira corrida, sendo necessário refazer apenas sete reações, que apresentaram resultados satisfatórios na segunda corrida.

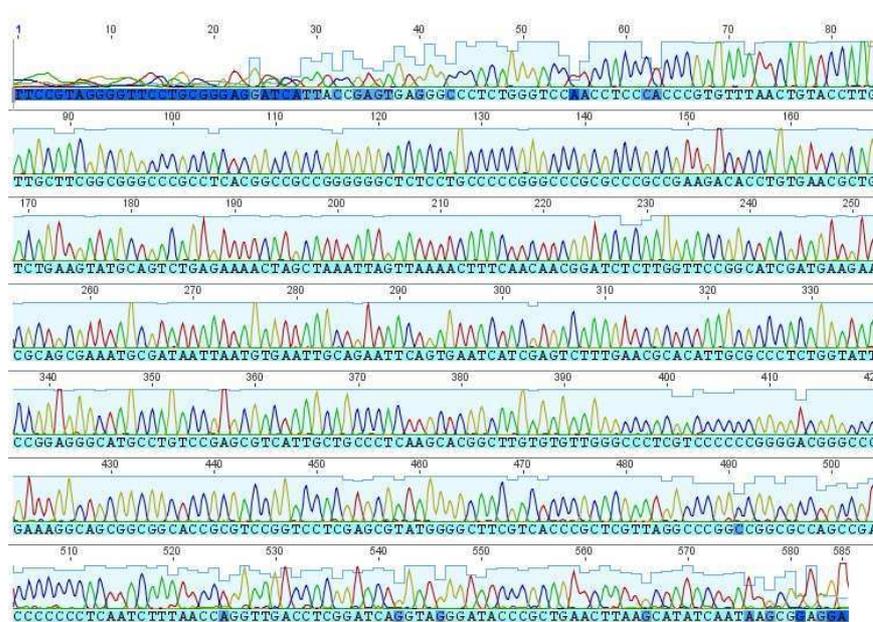


Figura 11. Eletroferograma da amostra PBC-082 utilizando iniciador direto ITS5, representativo dos resultados do sequenciamento capilar da região ITS, original sem edições.

Fonte: Visualizado no *Geneious*.

Após análise e edição das sequências, as comparações realizadas pela ferramenta *Linnaeus Search* do *Geneious* e diretamente no *website* do NCBI geraram os resultados mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Comparação das sequências obtidas da região ITS com o banco de dados do NCBI diretamente no *website* e através da ferramenta *Linnaeus Search* do *Geneious*

Cód. FUNED	Identificação Morfológica	Top Hit Linnaeus Search (Identidade)	Nucleotide Blast NCBI (Identidade)
PBC-001	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> KP132245 (99,5%)	–
PBC-002	<i>Fusarium</i> sp. (FUNED) <i>Fusarium semitectum</i> (UFLA)	<i>F. equiseti</i> JQ936153 (99,6%)	<i>F. equiseti</i> JQ936153 (99%)
PBC-007	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> KP132245 (99,4%)	–
PBC-040	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> KP132245 (99,5%)	–
PBC-043	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> KP132245 (99,5%)	–
PBC-045	<i>Fusarium semitectum</i> (FUNED) <i>Fusarium lateritium</i> (UFLA)	<i>F. verticillioides</i> KP132245 (99,5%)	<i>F. verticillioides</i> KP132245 (99%)
PBC-049	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> KP132245 (99,5%)	–
PBC-054	<i>Aspergillus candidus</i>	environmental samples uncultured fungus KF800284 (94,9%)	<i>A. candidus</i> NR077149 (99%)
PBC-055	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>A. clavatus</i> KP131551 (96,7%)	–
PBC-057	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>A. flavus</i> JX292092 (99,8%)	–
PBC-058	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>A. flavus</i> EF409783 (99,7%)	–
PBC-059	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Davidiella</i> sp. JX164075 (99,7%)	<i>A. flavus</i> JF951750 (99%)
PBC-061	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Neosartorya quadricincta</i> AF459730 (98,2%)	<i>A. fumigatus</i> KM268716 (98%)
PBC-062	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> KP131567 (99,7%)	–
PBC-063	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> KM268716 (99,7%)	–
PBC-064	<i>Aspergillus niveus</i>	environmental samples uncultured fungus KF800284 (94,8%)	<i>A. candidus</i> NR077149 (98%)
PBC-065	<i>Aspergillus niveus</i>	<i>A. terreus</i> GU966497 (98,3%)	<i>A. terreus</i> GU966497 (99%)
PBC-066	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>A. terreus</i> GU966497 (98,3%)	–
PBC-067	<i>Aspergillus wentii</i>	<i>A. fumigatus</i> GU183175 (95,0%)	<i>A. wentii</i> NR077152 (99%)
PBC-100	<i>Aspergillus flavus</i>	uncultured fungus JF497143 (99,7%)	<i>A. flavus</i> HQ340108 (99%)

Tabela 8. Cont.

Cód. FUNED	Identificação Morfológica	Top Hit Linnaeus Search (Identidade)	Nucleotide Blast NCBI (Identidade)
PBC-101	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>uncultured fungus</i> JF497143 (99,7%)	<i>A. flavus</i> HQ340108 (99%)
PBC-076	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>P. citrinum</i> KF624801 (99,7%)	–
PBC-077	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>P. citrinum</i> KF624801 (99,7%)	–
PBC-078	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium</i> sp. HQ832991 (99,7%)	<i>P. citrinum</i> KF624801 (99%)
PBC-079	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>P. citrinum</i> KM491892 (99,7%)	–
PBC-080	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>P. citrinum</i> KF624801 (99,7%)	–
PBC-082	<i>Penicillium corylophilum</i>	<i>P. paxilli</i> JN617709 (94,3%)	<i>P. paxilli</i> JN617709 (100%)
PBC-083	<i>Penicillium corylophilum</i>	<i>uncultured Ascomycota</i> HM162136 (99,2%)	<i>Fusarium oxysporum</i> FJ867936 (99%)
PBC-085	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Penicillium</i> sp. KF931337 (97,9%)	<i>Talaromyces funiculosus</i> KP784312 (99%)
PBC-086	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Penicillium</i> sp. KF931337 (97,9%)	<i>Talaromyces funiculosus</i> KP784312 (99%)
PBC-087	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Penicillium</i> sp. KF931337 (97,7%)	<i>Talaromyces funiculosus</i> KP784312 (99%)
PBC-088	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Penicillium</i> sp. KF931337 (97,8%)	<i>Talaromyces funiculosus</i> KP784312 (99%)
PBC-089	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Penicillium</i> sp. KF931337 (97,8%)	<i>Talaromyces funiculosus</i> KP784312 (99%)
PBC-090	<i>Penicillium glabrum</i>	<i>uncultured fungus</i> GQ999239 (94,5%)	<i>P. laeve</i> KF667369 (95%)
PBC-091	<i>Penicillium islandicum</i>	<i>Talaromyces islandicus</i> KF984882 (95,9%)	–
PBC-092	<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>uncultured fungus</i> GQ999322 (96,5%)	<i>Talaromyces radicus</i> EU262660 (99%)
PBC-093	<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>Talaromyces radicus</i> EU262660 (96,5%)	<i>Talaromyces radicus</i> EU262660 (99%)
PBC-094	<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>uncultured fungus</i> GQ999322 (96,4%)	<i>Talaromyces radicus</i> EU262660 (99%)
PBC-095	<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>Talaromyces radicus</i> EU262660 (96,4%)	<i>Talaromyces radicus</i> EU262660 (99%)
PBC-096	<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>Talaromyces radicus</i> EU262660 (96,5%)	<i>Talaromyces radicus</i> EU262660 (99%)

Tabela 8. Cont.

Cód. FUNED	Identificação Morfológica	Top Hit Linnaeus Search (Identidade)	Nucleotide Blast NCBI (Identidade)
PBC-099	<i>Penicillium raistrickii</i>	<i>P. citrinum</i> KP329844 (100,0%)	<i>P. citrinum</i> KP329844 (99%)

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

Os gráficos gerados pela análise tradicional de código de barras de DNA no programa *Past* 3.0, para cada região e gênero separadamente, foram do tipo *BoxPlot* e *JitterPlot* (Figuras 13, 14, 16, 27, 28, 30, 36, 39, 40, 41, 42 e 43). O gráfico *BoxPlot* é representado por 2 caixas que contemplam metade dos dados, no intervalo de 25-75%, das comparações par-a-par, sendo a da esquerda referente às comparações intraespecíficas e a da direita às comparações interespecíficas. A mediana é mostrada por uma linha horizontal no interior de cada caixa e os valores mínimo e máximo são mostrados como uma linha horizontal acima e abaixo das caixas. Os valores atípicos (*outliers*), pontos mais distantes que 1,5X a altura de cada caixa, foram excluídos das análises e são representados nos gráficos por círculos, ou quando mais distantes que 3X a altura da caixa, são representados por asteriscos. No gráfico *JitterPlot* cada ponto representa uma comparação par-a-par, sendo à esquerda as comparações intraespecíficas e à direita as interespecíficas.

Uma importante característica dos conjuntos de dados de código de barras de DNA usada para delimitar espécies é uma lacuna observada na distribuição de diferenças emparelhadas, ou *barcode gap*. A presença desta lacuna significa que a divergência entre os organismos pertencentes à mesma espécie (distâncias genéticas intraespecíficas) é menor do que a divergência entre os organismos de espécies diferentes (distâncias genéticas interespecíficas).

A análise ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) (Puillandre et al., 2012) classifica as sequências em espécies hipotéticas com base na diferença de código de barras de DNA, através de uma faixa (amplitude) de divergência intraespecífica anterior para inferir a partir dos dados de um limite de confiança unilateral baseado em um modelo estatístico para a divergência intraespecífica. O método detecta o intervalo do código de barras de DNA como o primeiro intervalo significativo para além deste limite e o utiliza para particionar os dados. Em seguida, a inferência do limite e de detecção do intervalo (*gap*) são recursivamente aplicadas aos grupos previamente obtidos para obter partições mais finas até que não haja mais nenhuma partição. Este

método representa uma análise sem pressupostos, pois não leva em consideração a identificação morfológica ou a análise tradicional de código de barras de DNA, e serve como uma hipótese nula para testar os resultados obtidos nestas análises anteriores.

A matriz de distâncias gerada pelo *Geneious* demonstra que a amostra PBC-045, identificada morfológicamente como *F. lateritium* é muito semelhante às amostras identificadas como *F. verticillioides*. Da mesma forma, a amostra PBC-040, identificada como *F. verticillioides* se assemelha mais às duas sequências de *F. lateritium* do banco de dados (Figura 12). Os gráficos de dispersão para o gênero *Fusarium* mostram uma sobreposição entre os conjuntos de dados das comparações intra e interespecíficas, ou seja, não apresenta o *barcode gap* desejável (Figura 13). A análise ABGD gerou dois grupos de hipóteses de espécies, conforme identificação morfológica, porém, os isolados pertencentes aos grupos são discordantes da identificação morfológica. O Grupo 1 contém os isolados de *F. verticillioides* PBC-001, PBC-007, PBC-043, PBC-049 e o isolado de *F. lateritium* PBC-045; e o Grupo 2 contém o isolado de *F. verticillioides* PBC-040, e as sequências de banco de dados de *F. lateritium* AY904057 e FN547445, o que representa uma mistura.

	PBC-001ITS	PBC-007ITS	PBC-040ITS	PBC-043ITS	PBC-049ITS	PBC-045ITS	AY904057	FN547445
PBC-001ITS		0.002	0.644	0.000	0.000	0.000	0.709	0.734
PBC-007ITS	0.002		0.659	0.002	0.002	0.002	0.771	0.726
PBC-040ITS	0.644	0.659		0.659	0.640	0.638	0.095	0.091
PBC-043ITS	0.000	0.002	0.659		0.000	0.000	0.715	0.743
PBC-049ITS	0.000	0.002	0.640	0.000		0.000	0.711	0.742
PBC-045ITS	0.000	0.002	0.638	0.000	0.000		0.697	0.722
AY904057	0.709	0.771	0.095	0.715	0.711	0.697		0.010
FN547445	0.734	0.726	0.091	0.743	0.742	0.722	0.010	

Figura 12. Matriz de distâncias das comparações par-a-par da região ITS de *Fusarium* sp.

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

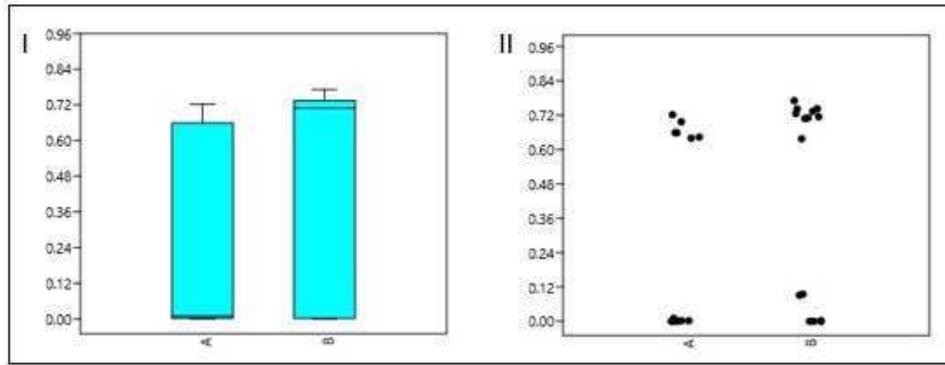


Figura 13. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região ITS de *Fusarium* sp.

I: *BoxPlot*, II: *JitterPlot*. A: Intraespecifica, B: Interespecifica. Fonte: Gerados no *Past*.

Os gráficos de dispersão para o gênero *Aspergillus* mostram uma pequena sobreposição de dados entre as comparações intra e interespecíficas de 25-75% das amostras, mas não representam ainda o gráfico ideal por não apresentar o *barcode gap* desejado (Figura 14). A análise ABGD gerou sete grupos de hipóteses de espécies de modo similar à identificação morfológica, porém os isolados agrupados não coincidem (Figura 15). Observam-se uma correspondência (Grupo 3), uma divisão (Grupos 1 e 6) e duas misturas (Grupos 2 e 4; Grupos 5 e 7).

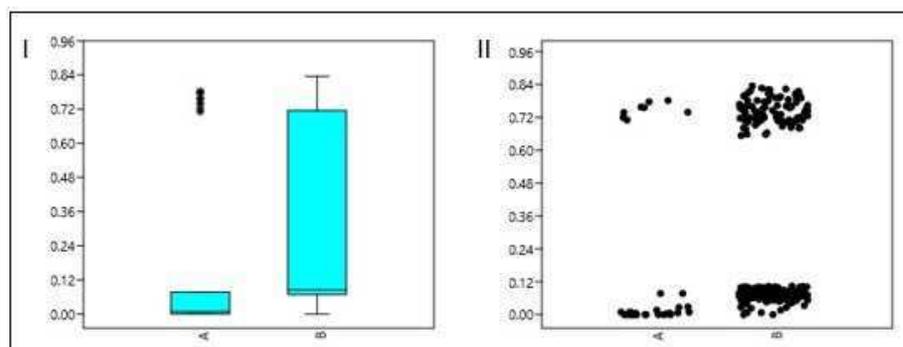


Figura 14. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região ITS de *Aspergillus* sp.

I: *BoxPlot*, II: *JitterPlot*. A: Intraespecifica, B: Interespecifica. Fonte: Gerados no *Past*.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7
<i>A. flavus</i> PBC-100	<i>A. terreus</i> PBC-066	<i>A. wentii</i> PBC-067	<i>A. candidus</i> AY373842	<i>A. fumigatus</i> PBC-061	<i>A. flavus</i> PBC-057	<i>A. fumigatus</i> PBC-062
<i>A. flavus</i> PBC-101	<i>A. niveus</i> PBC-065	<i>A. wentii</i> AY373884	<i>A. candidus</i> EF66960	<i>A. clavatus</i> PBC-055	<i>A. flavus</i> PBC-059	<i>A. fumigatus</i> PBC-063
	<i>A. niveus</i> AY373853	<i>A. wentii</i> EF652158	<i>A. candidus</i> PBC-054	<i>A. clavatus</i> GU183164	<i>A. flavus</i> PBC-058	
	<i>A. terreus</i> EF432562		<i>A. niveus</i> PBC-064	<i>A. clavatus</i> HQ026749		

Figura 15. Grupos de hipóteses de espécies gerados pelo programa ABGD para a região ITS do gênero *Aspergillus*.

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

Já os gráficos para o gênero *Penicillium* apresentam *barcode gap* entre 25-75% das as divergências intra e interespecíficas, porém, para a amostragem total, excluindo-se os *outliers*, os maiores valores das distâncias intraespecíficas se sobrepõem às menores distâncias interespecíficas (Figura 16). A identificação morfológica gerou sete grupos, enquanto a análise ABGD gerou onze grupos de hipóteses de espécies (Figura 17), sendo duas correspondências (Grupos 2 e 3), três divisões (Grupos 1, 9 e 10; Grupos 5 e 6; Grupos 7 e 8) e uma mistura (Grupos 4 e 11).

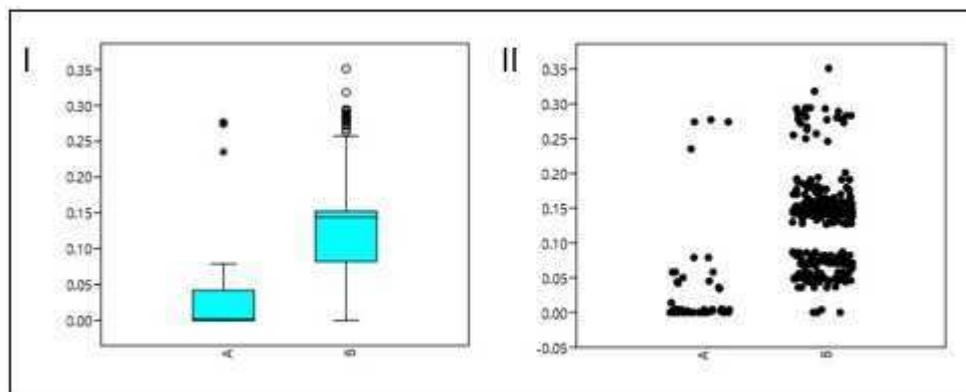


Figura 16. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região ITS de *Penicillium* sp.

I: *BoxPlot*, II: *JitterPlot*. A: Intraespecífica, B: Interespecífica. Fonte: Gerados no *Past*.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
<i>P. corylophilum</i> PBC-083	<i>P. funiculosum</i> PBC-089	<i>P. oxalicum</i> PBC-092	<i>P. raistrickii</i> KP152490	<i>P. islandicum</i> AF455543	<i>P. islandicum</i> PBC-091
	<i>P. funiculosum</i> PBC-085	<i>P. oxalicum</i> PBC-096	<i>P. raistrickii</i> KR012430	<i>P. islandicum</i> FJ872071	<i>T. islandicus</i> JN899318
	<i>P. funiculosum</i> PBC-088	<i>P. oxalicum</i> PBC-094			
	<i>P. funiculosum</i> PBC-086	<i>P. oxalicum</i> PBC-095			
	<i>P. funiculosum</i> PBC-087	<i>P. oxalicum</i> PBC-093			

Grupo 7	Grupo 8	Grupo 9	Grupo 10	Grupo 11
<i>P. glabrum</i> FJ904924	<i>P. glabrum</i> PBC-090	<i>P. corylophilum</i> AF033450	<i>P. corylophilum</i> PBC-082	<i>P. citrinum</i> PBC-078
<i>P. glabrum</i> JN887323		<i>P. corylophilum</i> KP329705		<i>P. citrinum</i> PBC-077
		<i>P. corylophilum</i> KP329605		<i>P. citrinum</i> PBC-080
				<i>P. citrinum</i> PBC-079
				<i>P. citrinum</i> PBC-076
				<i>P. raistrickii</i> PBC-099

Figura 17. Grupos de hipóteses de espécies gerados pelo programa ABGD para a região ITS do gênero *Penicillium*.

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

Os resultados obtidos pela análise tradicional de *barcode* para a região ITS mostram que a região preconizada como código de barras de DNA de fungos não foi satisfatória para os gêneros *Fusarium* e *Aspergillus*. E para o gênero *Penicillium* foi parcialmente satisfatória. Diante destes resultados foi preciso analisar um código de barras secundário, o gene que codifica a segunda subunidade maior da RNA polimerase II (RPB2).

5.3 Experimentos e Análises da região RPB2

Os primeiros experimentos de PCR para o gene RPB2 foram realizados utilizando 5 ng de DNA e as enzimas Taq DNA polimerase (Uniscience) e Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen), como um teste inicial de eficiência. Utilizando a Taq

DNA polimerase (Uniscience), foi satisfatório para 3 das 5 amostras testadas, sendo PBC-001, PBC-002 e PBC-076, enquanto o experimento utilizando Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) foi satisfatório para 4 das 5 amostras, sendo PBC-001, PBC-002, PBC-045, PBC-057 (Figura 18). Em seguida, o experimento utilizando HiFi HotStart PCR Kit (Kapa) e 1 ng de DNA foi insatisfatório para as 36 amostras, por apresentarem muitas bandas inespecíficas (Figura 19). Posteriormente o experimento utilizando Taq DNA polimerase (Uniscience) e 1 ng de DNA, para tentar reduzir as bandas inespecíficas, foi satisfatório para 20 de 36 amostras (Figura 20). Em seguida, o experimento utilizando HiFi HotStart PCR Kit (Kapa) com os aditivos BSA, DMSO e Betaína, e 1 ng de DNA foi insatisfatório para as 16 amostras testadas (Figura 21). Posteriormente o experimento utilizando 1 ng de DNA e Taq DNA polimerase (Uniscience) com os aditivos BSA, DMSO e Betaína foi satisfatório para 14 das 16 amostras (Figura 22). Em seguida o experimento utilizando 0,1 e 0,01 ng de DNA Taq DNA polimerase (Uniscience) com os aditivos BSA, DMSO e Betaína, foi satisfatório para uma das duas amostras restantes na concentração 0,1 ng de DNA (Figura 23). Finalmente o experimento utilizando GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega), ainda apresentou banda inespecífica utilizando 1,0 e 5 ng de DNA da amostra, e então, foi realizada a purificação do DNA a partir do gel (Figura 24).

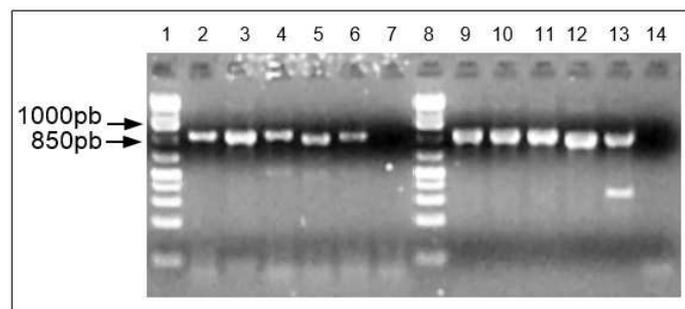


Figura 18. Eletroforese da Região RPB2 utilizando as enzimas Taq DNA polimerase Uniscience (canaletas 2 a 7) e Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen (canaletas 9 a 14) e 5 ng de DNA.

Canaletas: 1 e 8-Marcador Molecular 1 kb Plus, 2 e 9-PBC-001, 3 e 10-PBC-002, 4 e 11-PBC-045, 5 e 12-PBC-057, 6 e 13-PBC-076, 7 e 14-Controles Negativos. Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

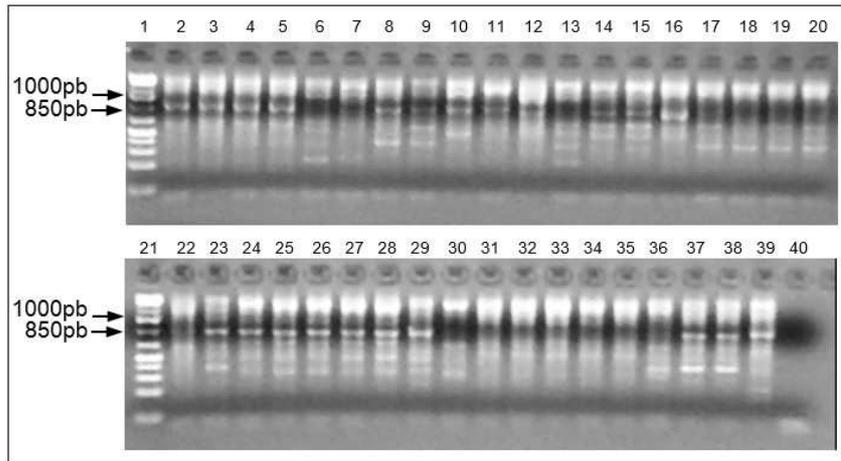


Figura 19. Eletroforese da Região RPB2 HiFi HotStart PCR Kit (Kapa) e 1 ng de DNA.

Canaletas: 1 e 21-Marcador Molecular 1 kb Plus, 2 a 20 e 22 a 38-Amostras PBC, 39- Controle Positivo (5 ng PBC-001), 40-Controle Negativo. Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

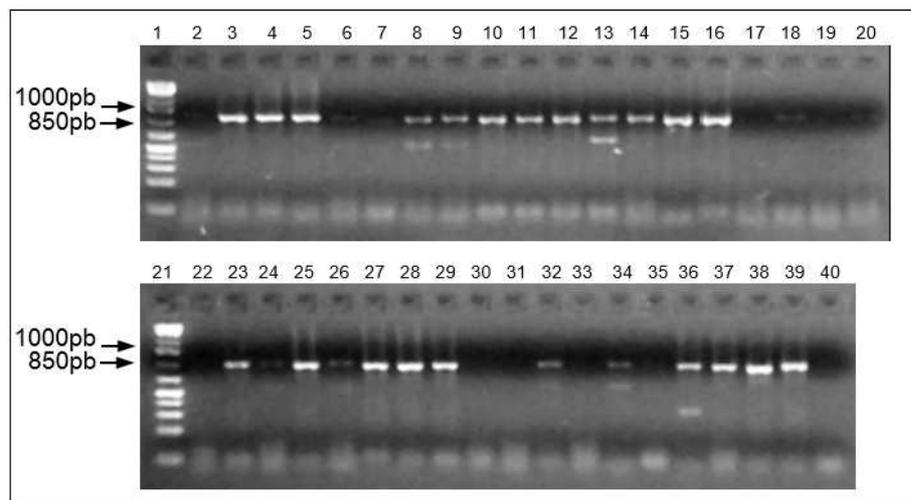


Figura 20. Eletroforese da Região RPB2 utilizando Taq DNA polimerase (Uniscience) e 1 ng de DNA.

Canaletas: 1 e 21-Marcador Molecular 1 kb Plus, 2-PBC-007, 3-PBC-040, 4-PBC-043, 5-PBC-049, 6-PBC-054, 7-PBC-055, 8-PBC-058, 9-PBC-059, 10-PBC-061, 11-PBC-062, 12-PBC-063, 13-PBC-064, 14-PBC-065, 15-PBC-066, 16-PBC-067, 17-PBC-077, 18-PBC-078, 19-PBC-079, 20-PBC-080, 22-PBC-082, 23-PBC-083, 24-PBC-085, 25-PBC-086, 26-PBC-087, 27-PBC-088, 28-PBC-089, 29-PBC-090, 30-PBC-091, 31-PBC-092, 32-PBC-093, 33-PBC-094, 34-PBC-095, 35-PBC-096, 36-PBC-099, 37-PBC-100, 38-PBC-101, 39-Controle Positivo (1 ng PBC-001), 40-Controle Negativo. Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

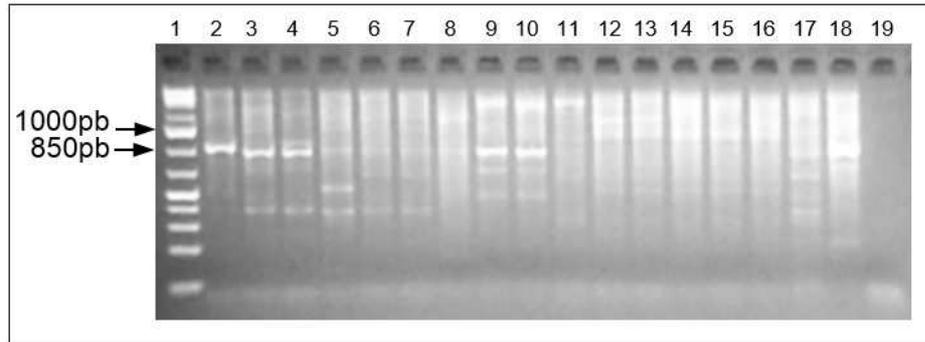


Figura 21. Eletroforese da Região RPB2 utilizando 1 ng de DNA e HiFi HotStart PCR Kit (Kapa) com os aditivos BSA, DMSO e Betaína.

Canaletas: 1-Marcador Molecular 1 kb Plus, 2-PBC-007, 3-PBC-058, 4-PBC-059, 5-PBC-064, 6-PBC-077, 7-PBC-079, 8-PBC-082, 9-PBC-085, 10-PBC-087, 11-PBC-091, 12-PBC-092, 13-PBC-093, 14-PBC-094, 15-PBC-095, 16-PBC-096, 17-PBC-099, 18-Controle Positivo (1 ng PBC-001), 19-Controle Negativo. Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

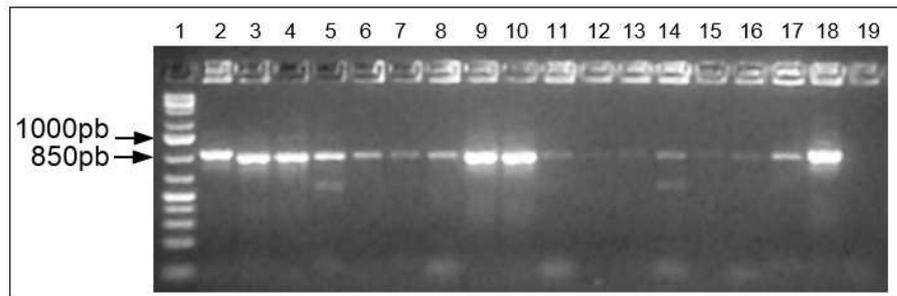


Figura 22. Eletroforese da Região RPB2 utilizando 1 ng de DNA e Taq DNA polimerase (Uniscience) com os aditivos BSA, DMSO e Betaína.

Canaletas: 1-Marcador Molecular 1 kb Plus, 2-PBC-007, 3-PBC-058, 4-PBC-059, 5-PBC-064, 6-PBC-077, 7-PBC-079, 8-PBC-082, 9-PBC-085, 10-PBC-087, 11-PBC-091, 12-PBC-092, 13-PBC-093, 14-PBC-094, 15-PBC-095, 16-PBC-096, 17-PBC-099, 18-Controle Positivo (1 ng PBC-001), 19-Controle Negativo. Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

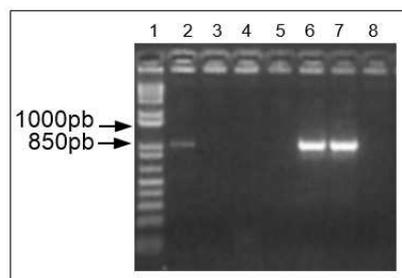


Figura 23. Eletroforese da Região RPB2 utilizando 0,1 e 0,01 ng de DNA e Taq DNA polimerase (Uniscience) com os aditivos BSA, DMSO e Betaína.

Canaletas: 1-Marcador Molecular 1 kb Plus, 2-PBC-064 0,1ng, 3-PBC-064 0,01ng, 4-PBC-094 0,1ng, 5- PBC-094 0,01ng, 6-Controle Positivo (0,1 ng PBC-001), 7-Controle Positivo (1 ng PBC-001), 8-Controle Negativo. Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

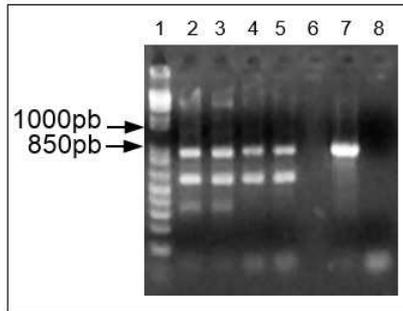


Figura 24. Eletroforese da Região RPB2 utilizando 5 e 1 ng de DNA e GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega).

Canaletas: 1-Marcador Molecular 1 kb Plus, 2 e 3-PBC-094 5 ng, 4 e 5-PBC-094 1 ng, 6-Controle Positivo (5 ng PBC-001), 7-Controle Negativo. Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

As reações de sequenciamento do gene RPB2 também apresentaram eletroferogramas com picos bem definidos, e boa qualidade de leitura (Figura 25). O sucesso da primeira corrida foi em 93,9% das amostras, sendo necessário refazer apenas cinco reações, que apresentaram resultados satisfatórios na segunda corrida.

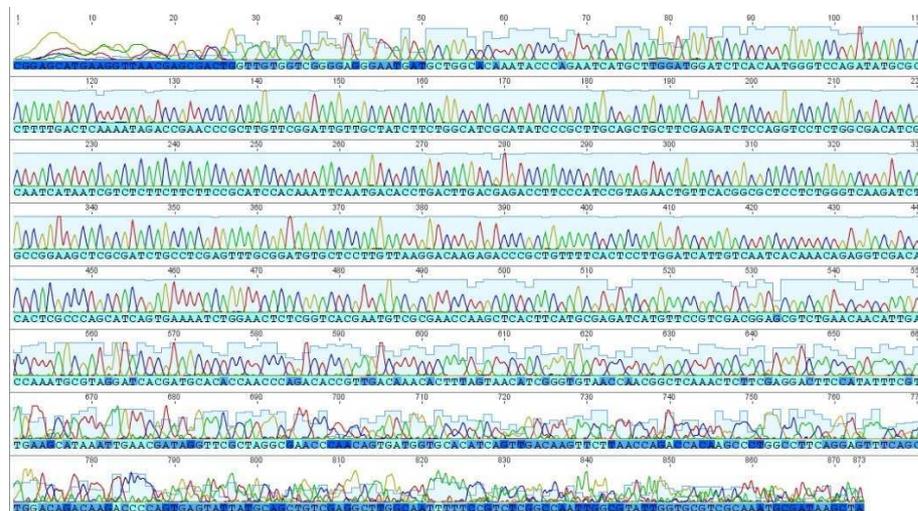


Figura 25. Eletroferograma da amostra PBC-094 utilizando iniciador reverso 7cR, representativo dos resultados do sequenciamento capilar da região RPB2, original sem edições.

Fonte: Visualizado no *Geneious*.

Após análise e edição das sequências, as comparações realizadas pela ferramenta *Linnaeus Search* do *Geneious* e diretamente no *website* do NCBI geraram os resultados mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Comparação das sequências obtidas da região RPB2 com o banco de dados do NCBI através da ferramenta *Linnaeus Search* do *Geneious*

Cód. FUNED	Identificação Morfológica	Top Hit Linnaeus Search (Identidade)	Nucleotide Blast NCBI (Identidade)
PBC-001	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> FN552106 (97,1%)	-
PBC-002	<i>Fusarium</i> sp. (FUNED) <i>Fusarium semitectum</i> (UFLA)	<i>F. incarnatum</i> KF255542 (97,6%)	<i>F. incarnatum</i> KF255542 (99%)
PBC-007	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> FN552106 (97,1%)	-
PBC-040	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> FN552106 (97,0%)	-
PBC-043	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> FN552106 (97,0%)	-
PBC-045	<i>Fusarium semitectum</i> (FUNED) <i>Fusarium lateritium</i> (UFLA)	<i>F. verticillioides</i> FN552106 (96,9%)	<i>Gibberella moniliformis</i> FN552106 (99%)
PBC-049	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> FN552106 (97,0%)	-
PBC-054	<i>Aspergillus candidus</i>	<i>A. candidus</i> EF669636 (84,1%)	-
PBC-055	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Malassezia restricta</i> KF706520 (85,5%)	<i>Malassezia restricta</i> KF706520 (89%)
PBC-057	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>A. flavus</i> LC000581 (85,4%)	-
PBC-058	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>A. flavus</i> HM802975 (85,5%)	-
PBC-059	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>A. flavus</i> LC000581 (85,5%)	-
PBC-061	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Neosartorya quadricincta</i> EF669763 (88,3%)	<i>A. fumigatus</i> XM741647 (95%)
PBC-062	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> XM741647 (88,8%)	-
PBC-063	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> EF669786 (88,7%)	-
PBC-064	<i>Aspergillus niveus</i>	<i>A. candidus</i> EF669636 (85,3%)	<i>A. candidus</i> EF669636 (99%)
PBC-065	<i>Aspergillus niveus</i>	<i>A. terreus</i> EF669622 (86,2%)	<i>A. niveus</i> EF669626 (92%)
PBC-066	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>A. terreus</i> EF669622 (86,3%)	-
PBC-067	<i>Aspergillus wentii</i>	<i>A. wentii</i> EF652093 (85,3%)	-
PBC-100	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>A. flavus</i> LC000581 (85,8%)	-
PBC-101	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>A. flavus</i> LC000581 (85,6%)	-
PBC-076	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>P. citrinum</i> KJ476427 (84,2%)	-
PBC-077	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>P. citrinum</i> KJ476427 (84,6%)	-
PBC-078	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>P. citrinum</i> KJ476427 (84,3%)	-
PBC-079	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>P. citrinum</i> KJ476427 (84,4%)	-

Tabela 9. Cont.

Cód. FUNED	Identificação Morfológica	Top Hit Linnaeus Search (Identidade)	Nucleotide Blast NCBI (Identidade)
PBC-080	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>P. citrinum</i> KJ476427 (84,6%)	–
PBC-082	<i>Penicillium corylophilum</i>	<i>P. paxilli</i> JN606610 (87,0%)	<i>P. paxilli</i> JN606610 (99%)
PBC-083	<i>Penicillium corylophilum</i>	<i>P. charlesii</i> JN406570 (83,2%)	<i>P. charlesii</i> JN406570 (99%)
PBC-085	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Talaromyces stollii</i> JX965318 (85,0%)	<i>Talaromyces stollii</i> JX965318 (99%)
PBC-086	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Talaromyces stollii</i> JX965318 (85,1%)	<i>Talaromyces stollii</i> JX965318 (99%)
PBC-087	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Talaromyces stollii</i> JX965318 (84,9%)	<i>Talaromyces stollii</i> JX965318 (100%)
PBC-088	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Talaromyces stollii</i> JX965318 (85,2%)	<i>Talaromyces stollii</i> JX965318 (100%)
PBC-089	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Talaromyces stollii</i> JX965318 (85,1%)	<i>Talaromyces stollii</i> JX965318 (99%)
PBC-090	<i>Penicillium glabrum</i>	<i>Penicillium</i> sp. EF198600 (86,9%)	<i>P. montanense</i> JN406579 (85%)
PBC-091	<i>Penicillium islandicum</i>	<i>Talaromyces islandicus</i> KF196969 (85,2%)	–
PBC-092	<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>P. concavorugulosum</i> KF196976 (85,1%)	<i>P. concavorugulosum</i> KF196976 (99%)
PBC-093	<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>Zygoascus hellenicus</i> JQ699003 (75,0%)	<i>Zygoascus hellenicus</i> JQ699003 (87%)
PBC-094	<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>P. concavorugulosum</i> KF196976 (85,3%)	<i>P. concavorugulosum</i> KF196976 (99%)
PBC-095	<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>P. concavorugulosum</i> KF196976 (85,1%)	<i>P. concavorugulosum</i> KF196976 (99%)
PBC-096	<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>P. concavorugulosum</i> KF196976 (85,0%)	<i>P. concavorugulosum</i> KF196976 (99%)
PBC-099	<i>Penicillium raistrickii</i>	<i>P. citrinum</i> KJ476427 (84,6%)	<i>P. citrinum</i> KJ476427 (100%)

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

Assim como nos resultados da região ITS, a amostra PBC-045 identificada como *F. lateritium* se assemelha mais aos isolados de *F. verticillioides* do que às duas sequências de *F. lateritium* do banco de dados (Figura 26). Os gráficos de dispersão da região RPB2 para o gênero *Fusarium* não apresentam o *barcode gap* desejável, apresentando uma sobreposição entre os conjuntos de dados das comparações intra e interespecíficas, uma vez que as comparações intraespecíficas ficaram concentradas (Figura 27). A análise ABGD gerou dois grupos de hipóteses de espécies, conforme identificação morfológica, porém, novamente os isolados

pertencentes aos grupos são discordantes da identificação morfológica. O Grupo 1 contém as sequências de banco de dados de *F. lateritium* JF740959 e JF741009, e o Grupo 2 contém os isolados de *F. verticillioides* PBC-001, PBC-007, PBC-040, PBC-043, PBC-049 e o isolado de *F. lateritium* PBC-045, representando novamente uma mistura.

	PBC-001RPB2	PBC-007RPB2	PBC-040RPB2	PBC-043RPB2	PBC-049RPB2	PBC-045RPB2	JF740959	JF741009
PBC-001RPB2		0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.770	0.765
PBC-007RPB2	0.001		0.001	0.001	0.001	0.001	0.757	0.752
PBC-040RPB2	0.000	0.001		0.000	0.000	0.000	0.767	0.762
PBC-043RPB2	0.000	0.001	0.000		0.000	0.000	0.738	0.733
PBC-049RPB2	0.000	0.001	0.000	0.000		0.000	0.767	0.762
PBC-045RPB2	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000		0.770	0.765
JF740959	0.770	0.757	0.767	0.738	0.767	0.770		0.001
JF741009	0.765	0.752	0.762	0.733	0.762	0.765	0.001	

Figura 26. Matriz de distâncias das comparações par-a-par da região RPB2 de *Fusarium* sp.

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

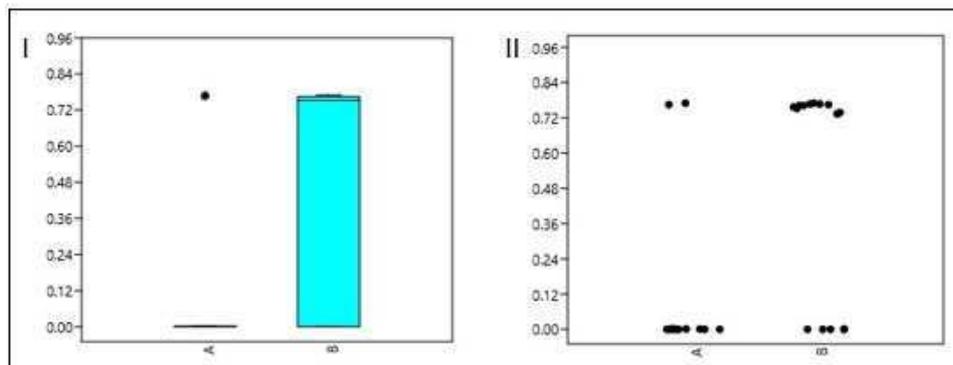


Figura 27. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região RPB2 de *Fusarium* sp.

I: BoxPlot, II: JitterPlot. A: Intraespecífica, B: Interespecífica. Fonte: Gerados no Past.

Os gráficos de dispersão para o gênero *Aspergillus* mostram uma completa separação de dados entre as comparações intra e interespecíficas, excluindo-se os *outliers* apresentando *barcode gap* de 10-15% (Figura 28). A análise ABGD novamente gerou sete grupos de hipóteses de espécies (Figura 29) de modo similar à identificação morfológica, sendo três correspondências (Grupos 2, 5 e 7), uma divisão (Grupos 1 e 6), e duas misturas (Grupos 3 e 4).

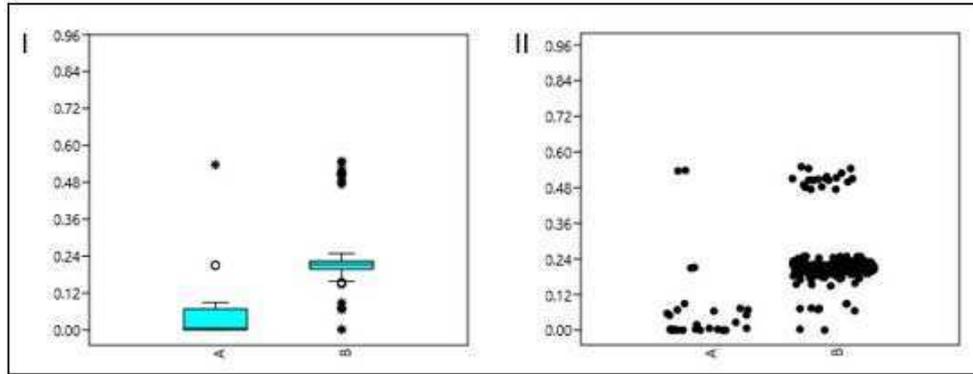


Figura 28. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região RPB2 de *Aspergillus* sp.

I: *BoxPlot*, II: *JitterPlot*. A: Intraespecifica, B: Interespecifica. Fonte: Gerados no *Past*.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7
<i>A. clavatus</i> 055	<i>A. flavus</i> 058	<i>A. candidus</i> 054	<i>A. niveus</i> EF669657	<i>A. wentii</i> 067	<i>A. clavatus</i> EF669785	<i>A. fumigatus</i> 061
	<i>A. flavus</i> 057	<i>A. niveus</i> 064	<i>A. terreus</i> EF669660	<i>A. wentii</i> EF652095	<i>A. clavatus</i> EU982099	<i>A. fumigatus</i> 062
	<i>A. flavus</i> 059	<i>A. candidus</i> EF669651	<i>A. terreus</i> LC000577	<i>A. wentii</i> JN121418		<i>A. fumigatus</i> 063
	<i>A. flavus</i> 100	<i>A. candidus</i> JN121535	<i>A. niveus</i> 065			
	<i>A. flavus</i> 101		<i>A. terreus</i> 066			

Figura 29. Grupos de hipóteses de espécies gerados pelo programa ABGD para a região RPB2 do gênero *Aspergillus*.

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

Os gráficos de dispersão para o gênero *Penicillium* novamente apresentaram *barcode gap* apenas entre 25-75% das divergências intra e interespecíficas, mas não quando se avalia a amostragem total (Figura 30). Enquanto a identificação morfológica gerou sete grupos, a análise ABGD gerou 12 grupos de hipóteses de espécies (Figura 31), sendo duas correspondências (Grupos 10 e 11), três divisões (Grupos 1 e 12; Grupos 2, 3, 5 e 6; Grupos 8 e 9) e uma mistura (Grupos 4 e 7).

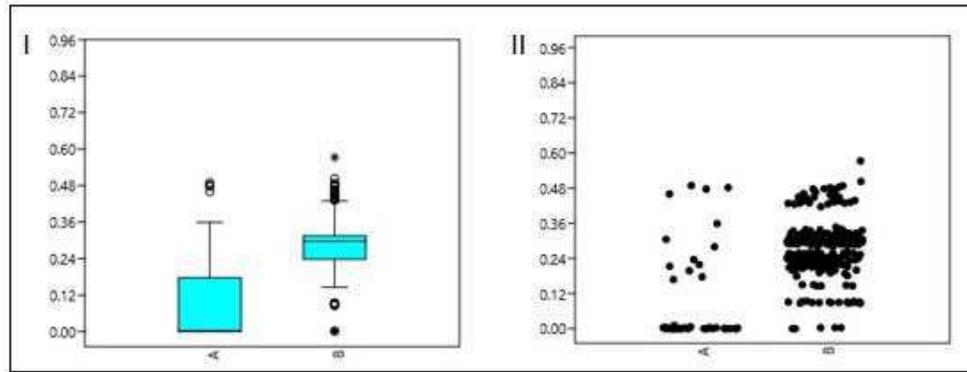


Figura 30. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região RPB2 de *Penicillium* sp.

I: *BoxPlot*, II: *JitterPlot*. A: Intraespecifica, B: Interespecifica. Fonte: Gerados no *Past*.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
<i>P. oxalicum</i> 093	<i>P. corylophilum</i> FJ004460	<i>P. corylophilum</i> JN406569	<i>P. raistrickii</i> JN606589	<i>P. corylophilum</i> 083	<i>P. corylophilum</i> 082
Grupo 7	Grupo 8	Grupo 9	Grupo 10	Grupo 11	Grupo 12
<i>P. citrinum</i> 077	<i>P. glabrum</i> 090	<i>P. glabrum</i> FJ004470	<i>P. funiculosum</i> 089	<i>T. islandicus</i> KF985015	<i>P. oxalicum</i> 092
<i>P. citrinum</i> 080		<i>P. glabrum</i> GU372898	<i>P. funiculosum</i> 085	<i>P. islandicum</i> JN121495	<i>P. oxalicum</i> 096
<i>P. citrinum</i> 078			<i>P. funiculosum</i> 088	<i>T. islandicus</i> KF196969	<i>P. oxalicum</i> 094
<i>P. citrinum</i> 079			<i>P. funiculosum</i> 086	<i>P. islandicum</i> 091	<i>P. oxalicum</i> 095
<i>P. citrinum</i> 076			<i>P. funiculosum</i> 087		
<i>P. raistrickii</i> 099					

Figura 31. Grupos de hipóteses de espécies gerados pelo programa ABGD para a região RPB2 do gênero *Penicillium*.

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

Os resultados obtidos pela análise tradicional de *barcode* para a região RPB2 mostram que esta região pode ser estabelecida como código de barras de DNA secundário para o gênero *Aspergillus*, quando comparada à região ITS para a amostragem estudada. Para o gênero *Penicillium* os resultados foram semelhantes entre as duas regiões. E para o gênero *Fusarium* foi analisado um terceiro código de barras de DNA, o gene da beta-tubulina (bTUB).

5.4 Experimentos e Análises da região bTUB

Os amplicons do gene da beta-tubulina não foram obtidos para todas as amostras do grupo de estudo. Para *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. não houve amplificação de todos os isolados. Foram realizados diversos experimentos nas mais diversas condições: diferentes concentrações de DNA, variando de 0,01 a 5ng; utilização dos aditivos BSA, DMSO e Betaína e com diferentes enzimas Taq Polimerase (Uniscience, Platinum Invitrogen, JumpStart Sigma, Go Taq flexi Pomega e Hi-Fi HotStart Kapa).

Para todas amostras de *Fusarium* spp. as amplificações obtiveram sucesso. Portanto, as análises de código de barras de DNA foram realizadas apenas para as amostras deste gênero.

O primeiro experimento de PCR para o gene da beta-tubulina (bTUB), utilizando Taq DNA Polimerase (Uniscience) e 5 ng de DNA, foi satisfatório para as três amostras de *Fusarium* testadas (Figura 32). Em seguida, o experimento utilizando a mesma enzima e 1 ng de DNA foi satisfatório para as quatro amostras restantes (Figura 33).

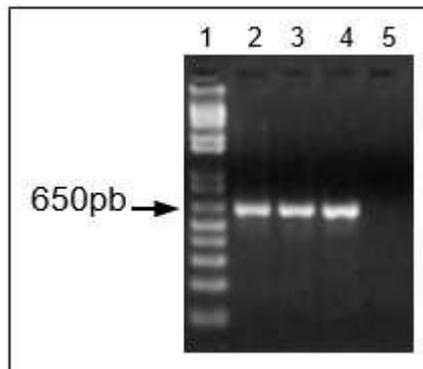


Figura 32. Eletroforese da Região bTUB utilizando 5 ng de DNA e Taq DNA polimerase (Uniscience).

Canaletas: 1-Marcador Molecular 1 kb Plus, 2-PBC-001, 3-PBC-002, 4-PBC-045, 5-Controle Negativo.
Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

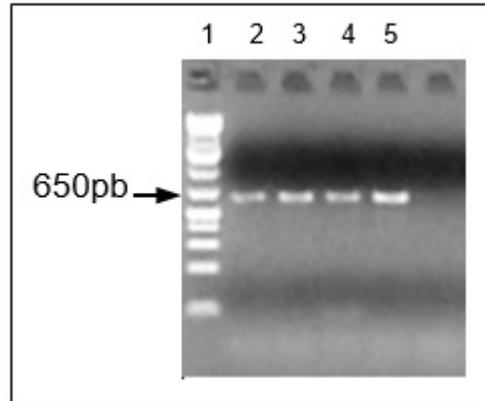


Figura 33. Eletroforese da Região bTUB utilizando 1 ng de DNA e Taq DNA polimerase (Uniscience).

Canaletas: 1-Marcador Molecular 1 kb Plus, 2-PBC-007, 3-PBC-040, 4-PBC-043, 5-PBC-049, 6- Controle Negativo. Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

As reações de sequenciamento do gene bTUB apresentaram sucesso em 100% das amostras na primeira corrida, gerando eletroferogramas com picos bem definidos, e boa qualidade de leitura (Figura 34).

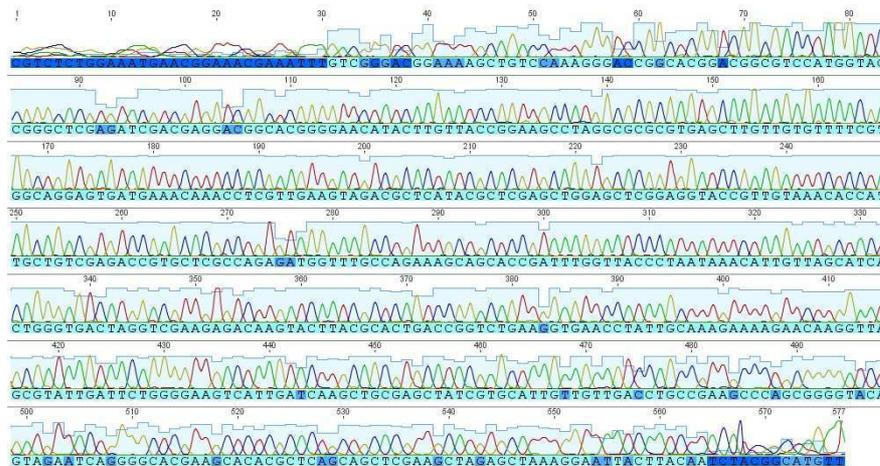


Figura 34. Eletroferograma da amostra PBC-002 utilizando iniciador reverso T2, representativo dos resultados do sequenciamento capilar do gene bTUB, original sem edições.

Fonte: Visualizado no *Geneious*.

Após análise e edição das sequências, as comparações realizadas pela ferramenta *Linnaeus Search* do *Geneious* e diretamente no *website* do NCBI geraram os resultados mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Comparação das sequências obtidas do gene bTUB com o banco de dados do NCBI através da ferramenta *Linnaeus Search* do *Geneious*.

Cód. FUNED	Identificação Morfológica	Top Hit Linnaeus Search (Identidade)	Nucleotide Blast NCBI (Identidade)
PBC-001	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> KC964148 (96,7%)	–
PBC-002	<i>Fusarium</i> sp. (FUNED) <i>Fusarium semitectum</i> (UFLA)	<i>F. incarnatum</i> GQ915444 (90,6%)	<i>F. incarnatum</i> KJ020853 (99%)
PBC-007	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> KC964148 (96,3%)	–
PBC-040	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> KF484461 (96,5%)	–
PBC-043	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> KC964148 (96,3%)	–
PBC-045	<i>Fusarium semitectum</i> (FUNED) <i>Fusarium lateritium</i> (UFLA)	<i>F. verticillioides</i> KC964148 (96,7%)	<i>F. verticillioides</i> KC964148 (100%)
PBC-049	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i> KC964148 (96,6%)	–

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

Novamente a amostra PBC-045 identificada como *F. lateritium* se assemelha mais aos isolados de *F. verticillioides* do que às duas sequências de *F. lateritium* do banco de dados, quando observada a matriz de distâncias (Figura 35). Os gráficos de dispersão para o gênero *Fusarium* não apresentam o *barcode gap* desejável, apresentando uma sobreposição entre os conjuntos de dados das comparações intra e interespecíficas (Figura 36). A análise ABGD apresentou o mesmo resultado da região RPB2, no qual foram gerados 2 grupos de hipóteses de espécies, conforme identificação morfológica e os isolados pertencentes a cada grupo discordantes da identificação morfológica. O Grupo 1 contém as sequências de banco de dados de *F. lateritium* FN554626 e KJ125878, e o Grupo 2 contém os isolados de *F. verticillioides* PBC-001, PBC-007, PBC-040, PBC-043, PBC-049 e o isolado de *F. lateritium* PBC-045.

	PBC-001TUB	PBC-007TUB	PBC-040TUB	PBC-043TUB	PBC-049TUB	PBC-045TUB	FN554626	KJ125878
PBC-001TUB		0.003	0.002	0.002	0.000	0.000	0.201	0.144
PBC-007TUB	0.003		0.002	0.002	0.002	0.002	0.196	0.144
PBC-040TUB	0.002	0.002		0.000	0.000	0.000	0.198	0.144
PBC-043TUB	0.002	0.002	0.000		0.000	0.000	0.201	0.144
PBC-049TUB	0.000	0.002	0.000	0.000		0.000	0.201	0.144
PBC-045TUB	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000		0.201	0.144
FN554626	0.201	0.196	0.198	0.201	0.201	0.201		0.000
KJ125878	0.144	0.144	0.144	0.144	0.144	0.144	0.000	

Figura 35. Matriz de distâncias das comparações par-a-par da região bTUB de *Fusarium* sp.

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

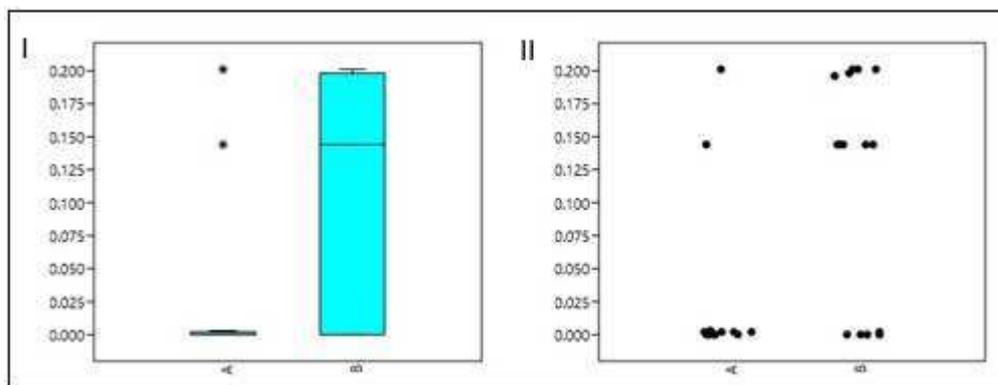


Figura 36. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências do gene bTUB de *Fusarium* sp.

I: *BoxPlot*, II: *JitterPlot*. A: Intraespecifica, B: Interespecifica. Fonte: Gerados no *Past*.

5.5 Novas análises baseadas na interpretação dos resultados obtidos

Após análises dos resultados das regiões ITS e RPB2 obtidos, foi necessário confirmar a identificação morfológica de uma amostra do gênero *Aspergillus* e uma do gênero *Penicillium*, para maior elucidação (Tabela 11).

A amostra PBC-064 foi inicialmente identificada por morfologia como *Aspergillus niveus*, porém quando comparadas as sequências de ITS e RPB2 com o banco de dados do NCBI, apresentaram identidade com *A. candidus*. Nas duas análises ABGD também ficou agrupada com as amostras de *A. candidus*. Após crescimento por 7 dias em CYA teve sua identificação morfológica confirmada como *A. niveus*, de acordo com observações macroscópicas da colônia e microscópica de estruturas típicas (Figura 37). Ambas as colônias apresentam uma coloração branca a creme. O conidióforo de *A. candidus* tem vesícula radial e possui fiáides inseridas

em toda a sua extensão, enquanto em *A. niveus* as fiáldes ocupam apenas o terço superior da vesícula.

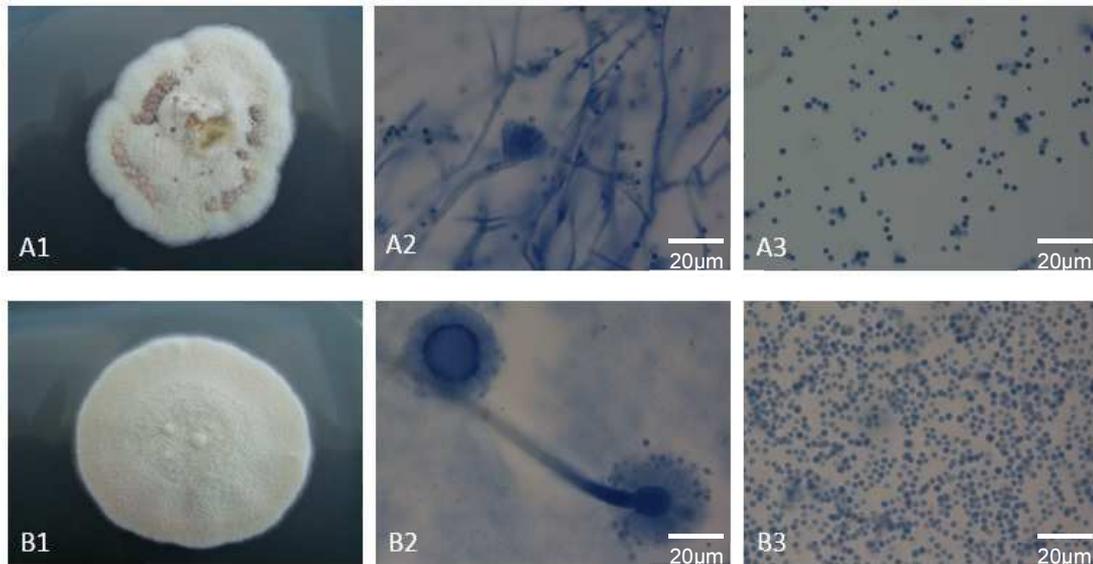


Figura 37. Fotografias das amostras PBC-064 (*A. niveus*) e PBC-054 (*A. candidus*).

A: *A. niveus* - A1: Colônia após 7 dias de crescimento em CYA, com produção de exsudato e escleródio. A2: Conidióforo com fiáldes no terço superior da vesícula, A3: Conídios, B: *A. candidus* - B1: Colônia após 7 dias de crescimento em CYA, B2: Conidióforo com fiáldes em toda a extensão da vesícula, B3: Conídios. Lâminas coradas com ácido láctico azul 85%, observadas ao microscópio óptico sob imersão (100X). Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015

A amostra PBC-099 foi inicialmente identificada por morfologia como *Penicillium raistrickii*, porém quando comparadas as sequências de ITS e RPB2 com o banco de dados do NCBI, apresentaram identidade com *P. citrinum*. Nas duas análises ABGD também ficou agrupada com as amostras de *P. citrinum*. Após crescimento por 7 dias em CYA houve alteração da coloração do meio devido à produção de pigmento solúvel característico e, de acordo com observações macroscópicas da colônia e microscópica de estruturas típicas (Figura 38), foi identificada como *P. citrinum*.

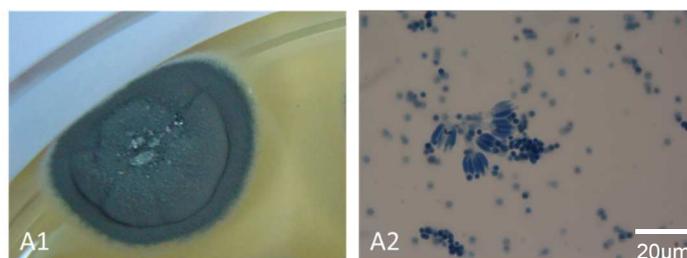


Figura 38. Fotografias das amostras PBC-099 (*P. citrinum*).

A1: Colônia após 7 dias de crescimento em CYA, com alteração da cor do meio. A2: Conidióforos e Conídios. Lâmina corada com ácido láctico azul 85%, observada ao microscópio óptico sob imersão (100X). Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015

Tabela 11. Resultados obtidos e identificação final das amostras PBC-064 e PBC-099

Cód. FUNED	Identificação Morfológica Inicial	Top Hit Linnaeus Search	Nucleotide Blast NCBI	ABGD	Identificação Morfológica Final
PBC-064	<i>Aspergillus niveus</i>	<i>A. candidus</i>	<i>A. candidus</i>	Agrupada com <i>A. candidus</i>	<i>A. niveus</i>
PBC-099	<i>Penicillium raistrickii</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>P. citrinum</i>	Agrupada com <i>P. citrinum</i>	<i>P. citrinum</i>

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

Após a confirmação da amostra PBC-099 como sendo *P. citrinum*, as análises de *barcode* tradicional foram refeitas e apresentaram melhores resultados. Os gráficos de dispersão mostram uma maior separação de dados entre as comparações intra e interespecíficas de 25-75% das amostras para a região ITS (Figura 39), e apresentam *barcode gap* de 2-14% para a região RPB2, analisando a amostragem total excluindo-se os *outliers* (Figura 40).

Da mesma maneira as análises ABGD passaram a apresentar mais duas correspondências para cada uma das regiões, sendo: região ITS, Grupos 4 e 11 e região RPB2, Grupos 4 e 7, que deixaram de representar misturas, como observado anteriormente.

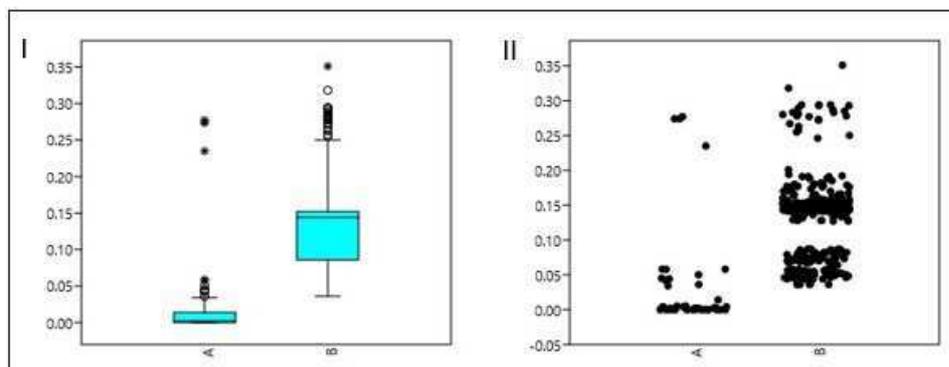


Figura 39. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região ITS de *Penicillium* sp. após nova identificação da amostra PBC-099.

I: BoxPlot, II: JitterPlot. A: Intraespecifica, B: Interespecifica. Fonte: Gerados no Past.

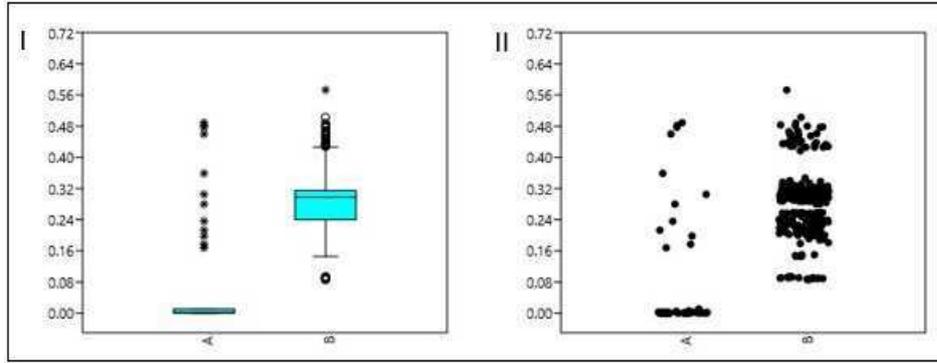


Figura 40. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região RPB2 de *Penicillium* sp. após nova identificação da amostra PBC-099.

I: *BoxPlot*, II: *JitterPlot*. A: Intraespecifica, B: Interespecifica. Fonte: Gerados no *Past*.

Diante da semelhança da amostra PBC-045 com as amostras de *F. verticillioides*, nas três regiões genômicas utilizadas, as análises de *barcode* tradicional também foram refeitas considerando PBC-045 como *F. verticillioides*. Os gráficos de dispersão mostram uma completa separação de dados entre as comparações intra e interespecíficas, apresentando *barcode gap* de 66-70% para a região ITS (Figura 41), de 1-73% para RPB2 (Figura 42) e de 0,3-14,4% para bTUB (Figura 43). A análise ABGD para a região ITS permanece como uma mistura, pois uma amostra de *F. verticillioides* (PBC-040) foi agrupada com as sequências do banco de dados de *F. lateritium*. Já para as regiões RPB2 e bTUB, as análises representam correspondências nos 2 grupos de cada região, nos quais as sequências de *F. lateritium* se agrupam entre si, assim como todas as amostras de *F. verticillioides*.

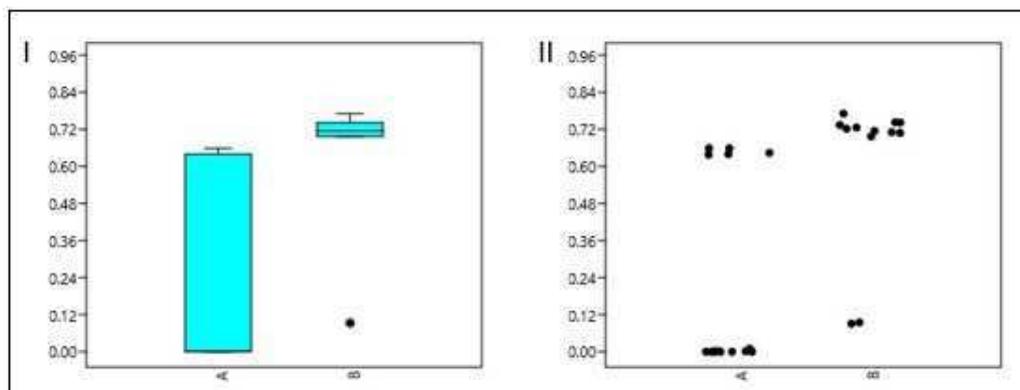


Figura 41. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das sequências da região ITS de *Fusarium* sp. considerando a amostra PBC-045 como *F. verticillioides*.

I: *BoxPlot*, II: *JitterPlot*. A: Intraespecifica, B: Interespecifica. Fonte: Gerados no *Past*.

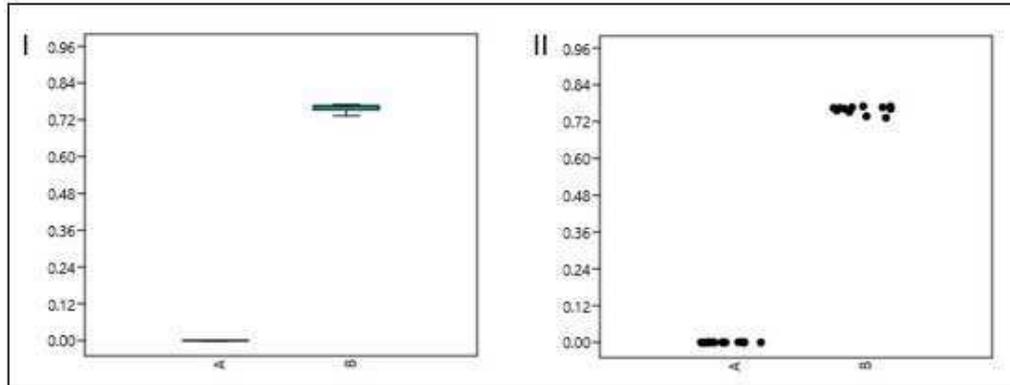


Figura 42. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das seqüências da região RPB2 de *Fusarium* sp. considerando a amostra PBC-045 como *F. verticillioides*.

I: *BoxPlot*, II: *JitterPlot*. A: Intraespecífica, B: Interespecífica. Fonte: Gerados no *Past*.

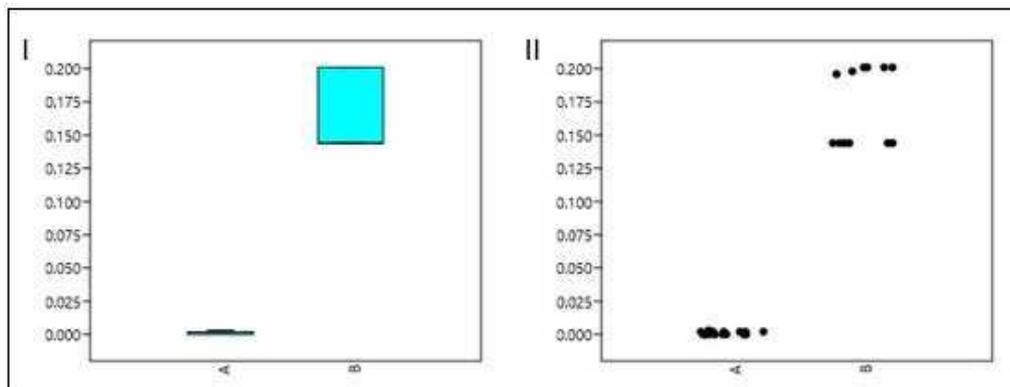


Figura 43. Gráficos de dispersão das comparações par-a-par das seqüências da região bTUB de *Fusarium* sp. considerando a amostra PBC-045 como *F. verticillioides*.

I: *BoxPlot*, II: *JitterPlot*. A: Intraespecífica, B: Interespecífica. Fonte: Gerados no *Past*.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do isolamento de fungos do Projeto “Biodiversidade de fungos micotoxigênicos em grão de milho de cultivo convencional, orgânico e transgênico por taxonomia clássica e molecular” corroboram com dados da literatura, nos quais os fungos mais frequentemente isolados de milho e seus derivados em todo o Brasil são *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Neurospora* e *Paecilomyces* (Rodríguez-Amaya & Sabino, 2002). Dentre os gêneros isolados, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais frequentemente associados à produção de micotoxinas, podendo ocorrer concomitantemente, apresentando efeito significativo na qualidade de alimentos como contaminantes e produtores de micotoxinas (Márcia & Lázari, 1998; González et al., 1999; Blandino et al., 2014).

Há mais de 20 anos os Laboratórios do Serviço de Ciências Bioquímicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) desenvolvem estudos nas áreas de detecção e identificação de fungos encontrados em alimentos, no ambiente e de importância médica. Porém, para a identificação de espécies do gênero *Fusarium*, o Laboratório de Micologia encontra dificuldades metodológicas e de infraestrutura para a produção de culturas monospóricas, por isso, foi realizada a re-identificação destes fungos no Laboratório de Sistemática e Ecologia dos Fungos da UFLA, especializado no gênero.

A metodologia de extração de gDNA utilizada é resultante de modificações de alguns métodos descritos na literatura e, ao contrário de alguns autores que utilizam apenas um tipo de detergente (Doyle & Doyle, 1990; Yu et al., 1993; Cubero et al., 1999), o protocolo estabelecido utiliza SDS e CTAB, conforme Möller (1992). A extração acontece em duas etapas: a primeira com SDS, Proteinase K (Möller et al., 1992; Yu et al., 1993) e PVP (Cubero et al., 1999), e a segunda com CTAB (Doyle & Doyle, 1990; Cubero et al., 1999), sem a adição de β -mercaptoetanol. A desnaturação de proteínas é feita com clorofórmio-álcool isoamílico e sua precipitação com acetato de sódio. Posteriormente o DNA é precipitado com isopropanol, lavado com etanol 70% e eluído em TE. A eficiência do método estabelecido neste trabalho para os gêneros de fungos estudados, resultou na elaboração de um Procedimento Operacional Padrão (POP) do Sistema de Gestão da Qualidade da Fundação

Ezequiel Dias, identificado como DIOM-DIVISA-SCB-LBM MET 0022 - EXTRAÇÃO DE DNA DE FUNGOS FILAMENTOSOS UTILIZANDO CTAB E SDS.

De acordo com os resultados de dosagem em espectrofotômetro do gDNA obtido, uma hipótese para explicar a diferença da eficiência do método entre os gêneros pode ser a diferença do tipo de colônia produzida pelos mesmos. As espécies de *Fusarium* produzem colônias mais cotonosas, de crescimento mais aéreo, e desta forma, a área coletada para a extração de DNA possui menor quantidade de material. Porém, mesmo com esta diferença, a quantidade de gDNA extraído foi suficiente para realizar todas as reações de amplificação e compor o banco de gDNA.

Em relação às reações de amplificação da região ITS, definida como código de barras de DNA de fungos, observou-se que a utilização de uma enzima DNA polimerase comum (Taq DNA Polimerase Uniscience) foi inicialmente satisfatória para 63,4% das amostras. Com outros experimentos alternando variáveis, observou-se um aumento da eficiência da reação com a utilização de uma enzima mais precisa (alta fidelidade) e mais sensível (*hotstart*), a enzima Kapa HiFi HotStart PCR Kit. O uso dos aditivos BSA, DMSO e Betaína, juntamente com esta enzima, possibilitou a obtenção dos amplicons das amostras restantes, alcançando a eficiência de 100% das amplificações. Estes aditivos funcionam aumentando a estabilidade da enzima, aumentando assim a especificidade e o rendimento da PCR (Frackman et al., 1998; Gene Link, 2015).

Já para as reações de amplificação da região RPB2, houve maior dificuldade na obtenção dos amplicons das amostras, sendo necessário realizar maior número de experimentos com mais variáveis, resultado este que concorda com dados da literatura (Schoch et al., 2012). Ao contrário das amplificações da região ITS, a utilização da enzima mais precisa e sensível não possibilitou a obtenção dos amplicons esperados, pois gerou muitas bandas inespecíficas. Assim como na amplificação por PCR, falhas podem ocorrer no sequenciamento da região RPB2, e está relacionada ao fato da existência de múltiplas cópias do gene em um único organismo (Lewis et al., 2011). Os melhores resultados foram alcançados utilizando uma enzima DNA polimerase comum (Taq DNA Polimerase Uniscience), com e sem os aditivos BSA, DMSO e Betaína.

Todas as variáveis testadas nas reações de amplificação não permitiram a obtenção dos amplicons para as amostras de *Aspergillus* e *Penicillium*, apesar de alguns autores não relatarem dificuldade (Peterson, 2008; Visagie et al., 2014a). Por outro lado, a amplificação deste fragmento para as amostras de *Fusarium* foi eficiente em uma única tentativa para cada amostra.

Segundo Schoch e colaboradores (2012), marcadores ribossomais apresentam menos problemas em relação às amplificações por PCR do que marcadores que codificam proteínas, portanto, a variação do sucesso das amplificações entre as regiões analisadas era esperada.

As comparações das sequências obtidas com sequências do NCBI, através da ferramenta *Linnaeus Search* e diretamente no *site* NCBI, foram realizadas com a finalidade de verificar a existência de alguma contaminação das amostras ou falhas na identificação por morfologia. O BLAST (*Basic Alignment Search Tool*) é uma ferramenta que compara sequências de nucleotídeos ou proteínas a sequências do banco de dados e calcula a significância estatística dos resultados. Algumas vezes, a ferramenta *Linnaeus Search* apresentou resultado discordante da identificação morfológica ou não chegou em uma espécie como *Top Hit* e, após a comparação diretamente no *site* NCBI, a identidade foi confirmada com a espécie identificada por morfologia ou com o seu teleomorfo (fase sexual). Esta situação pode ser observada quando avaliadas as sequências da região ITS das amostras PBC-054, PBC-059, PBC-061, PBC-067, PBC-100, PBC-101, PBC-078, PBC-085, PBC-086, PBC-087, PBC-088 e PBC-089. O mesmo acontece com a sequência da região RPB2 da amostra PBC-065.

Algumas amostras apresentaram identidade com o seu próprio teleomorfo (fase sexual), seja na comparação através do *Linnaeus Search* ou diretamente no NCBI, como: PBC-091, identificada como *P. islandicum* apresentou identidade das regiões ITS e RPB2 com *Talaromyces islandicus*, e as amostras PBC-085, PBC-086, PBC-087, PBC-088 e PBC-089, identificadas como *P. funiculosum*, apresentaram identidade da região ITS com *Talaromyces funiculosus*.

A sequência da amostra PBC-002, identificada como *Fusarium* sp. na FUNED e como *F. semitectum* na UFLA, quando comparada às sequências do NCBI, apresentou identidade com *F. equiseti* (ITS) e *F. incarnatum* (RPB2 e bTUB). Como

não foi possível incluir esta amostra nas análises de código de barras de DNA por não existir sequência desta espécie disponível nos bancos de dados pesquisados, o resultado das comparações é pouco conclusivo.

A amostra PBC-055, identificada como *Aspergillus clavatus* apresentou identidade da região ITS com sequências da própria espécie no NCBI, tanto na comparação realizada pela ferramenta *Linnaeus Search* quanto na matriz de distâncias gerada a partir das comparações par-a-par pelo programa *Geneious*. Entretanto, a região RPB2 da mesma amostra apresentou identidade, quando comparada às sequências no NCBI, com o fungo *Malassezia restricta*. Da mesma forma, as análises de código de barras de DNA da região RPB2 mostram que a amostra não se agrupa com as demais sequências de *A. clavatus*. *M. restricta* faz parte da microbiota normal da pele humana, podendo também estar associado a doenças como dermatite seborréica, foliculite, pitíriase versicolor, dermatite atópica e psoríase (Levin, 2009). Por ser um fungo lipofílico é comumente encontrado em áreas sebáceas do corpo incluindo rosto, couro cabeludo e tronco superior (Levin, 2009; Hiruma et al., 2014). Diante disso, pode ter havido contaminação da amostra durante os experimentos de PCR ou sequenciamento da região RPB2. Descarta-se a contaminação do gDNA devido aos resultados da região ITS.

Os resultados obtidos para a amostra PBC-064 (identificada como *Aspergillus niveus*) mostram identidade da mesma com espécies de *A. candidus* em todas as análises. Diante disso, a amostra foi novamente identificada por morfologia para a verificação de um possível erro, e foi confirmada como *A. niveus*. Estas duas espécies possuem características morfológicas típicas que permitem discriminá-las, principalmente a disposição das fiáldes na vesícula, o tamanho da vesícula e a coloração do exsudato quando produzido (Klich, 2002). A outra amostra de *A. niveus* (PBC-065), quando comparada às sequências do NCBI, apresentou identidade da região ITS com *A. terreus* e da região RPB2 com *A. niveus*. As análises ABGD agruparam amostras (PBC-065 e PBC-066) com sequências dos bancos de dados das espécies *A. niveus* e *A. terreus* em uma única hipótese de espécie, quando avaliadas ambas as regiões ITS e RPB2. A probabilidade de ocorrência de erro na identificação destas três espécies, *A. niveus*, *A. terreus* e *A. candidus*, é baixa devido ao fato de suas características morfológicas serem discriminatórias. De acordo com Peterson (2008), que descreveu as relações filogenéticas de espécies de *Aspergillus*

utilizando sequências de DNA de quatro regiões genômicas, entre elas ITS e RPB2, estas espécies apresentam baixa divergência interespecífica e são filogeneticamente muito próximas. *A. niveus* e *A. terreus*, que pertencem à seção *Terrei*, formam, juntamente com outras espécies, um grupo com suporte de 72% com a seção *Candidi*, à qual pertence a espécie *A. candidus* (ANEXO I).

O gênero *Penicillium* apresentou mais discordâncias do que *Fusarium* e *Aspergillus*, em relação às comparações das sequências obtidas com as do NCBI. As amostras PBC-082, PBC-090, PBC-092, PBC-094, PBC-095 e PBC-096 apresentaram identidade com outras espécies do gênero, que não as identificadas por morfologia, analisando as regiões ITS e RPB2. Da mesma forma, as amostras PBC-085, PBC-086, PBC-087, PBC-088 e PBC-089, identificadas como *P. funiculosum*, apresentaram identidade da região RPB2 com a espécie *Talaromyces stollii*, que é um teleomorfo de *Penicillium*. Este resultado era esperado por se tratar de um gênero grande, no qual algumas espécies comuns são muito parecidas entre si e ao mesmo tempo há uma grande variabilidade dentro de uma mesma espécie (Pitt, 2000). A identificação de *Penicillium* spp. é difícil, alguns caracteres da chave de classificação são inconspícuos, como a predominância de alguma característica microscópica, o diâmetro e a coloração da colônia, levando a erros frequentes. Assim, além da possibilidade de erros na identificação na FUNED, existe também grande possibilidade de erro no depósito das sequências no GenBank, que é um sistema aberto de baixa curadoria, onde é possível depositar dados imprecisos e/ou incorretos.

A amostra PBC-083, identificada como *Penicillium corylophilum*, apresentou identidade da região RPB2 com outra espécie do gênero, *P. charlesii*, enquanto a região ITS mostrou identidade com *Fusarium oxysporum*. O complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum* species complex - FOOSC) compreende cerca de 100 formas especiais associadas a hospedeiros específicos. Normalmente são fitopatógenos, mas podem ser patógenos oportunistas de humanos, causando infecções localizadas ou disseminadas (O'Donnell et al., 2004; Michielse & Rep, 2009).

Por outro lado, a amostra PBC-093, identificada como *P. oxalicum* apresentou identidade da região ITS com sequências de *Talaromyces radicus*, teleomorfo de *P. radicum*, assim como as demais amostras de *P. oxalicum* (PBC-092, PBC-094, PBC-095 e PBC-096). Porém, a região RPB2 apresentou identidade com a espécie

Zygoascus hellenicus. *Z. hellenicus* é um teleomorfo de *Candida hellenica*, espécies normalmente isoladas de uvas fermentadas e outras fontes ambientais, além de relatos de mastite bovina. Dois casos de infecção em humanos foram descritos em 2004 por Brandt et al. (Brandt et al., 2004), em um paciente que recebeu transplante de células-tronco, e em 2011 por Ioakimidou et al. (Ioakimidou et al., 2011), em um paciente pediátrico oncológico. As análises ABGD confirmam os resultados das comparações das sequências com o NCBI: quando analisada a região ITS a amostra PBC-093 ficou agrupada com as demais amostras identificadas como *P. oxalicum*, e na análise da região RPB2 ficou isolada como uma diferente hipótese de espécie.

Os resultados da região ITS da amostra PBC-083 e da região RPB2 da amostra PBC-093 podem sugerir uma possível contaminação durante os experimentos de PCR ou sequenciamento das mesmas. Porém, como ambas apresentaram identidade com espécies pouco comuns em nosso cotidiano, frequentemente associadas a substratos específicos, a hipótese que justificaria as divergências encontradas baseia-se na transferência horizontal de genes (THG). A transferência horizontal de genes, que difere da transferência vertical de genes (transmissão normal de material genético de pais para filhos), representa a troca e integração estável de genes individuais, agrupamentos de genes ou cromossomos inteiros entre organismos de diferentes espécies ou grupos (Fitzpatrick, 2012). Segundo Fitzpatrick (2012), inicialmente em fungos eram reportadas transferências de genes envolvendo bactérias como doadoras do material genético, porém estudos recentes demonstram sua ocorrência entre diferentes espécies de fungos. Os mecanismos da THG em fungos ainda não são completamente compreendidos, mas há evidências que sugerem a anastomose interespecífica em fungos (Friesen et al., 2006; Xie et al., 2008).

Segundo Azevedo e colaboradores (2005), a identificação de fungos por morfologia é laboriosa e, mesmo que realizada por especialistas, pode não ser conclusiva. A análise conjunta dos resultados das comparações das sequências obtidas com as sequências do NCBI, das matrizes de distância geradas pelo programa *Geneious*, dos gráficos gerados pelo programa *Past* baseados na análise tradicional de DNA *barcode* e dos agrupamentos ABGD é de extrema importância. A partir desta análise foi possível observar e corrigir dois erros de identificação por morfologia.

A amostra PBC-099, identificada como *P. raistrickii* se comportou como *P. citrinum* em todos os resultados. A primeira característica que separa estas duas

espécies na chave de classificação é o tamanho da colônia quando cultivadas em CYA por 7 dias a 25°C, se menor ou maior que 35mm (Pitt, 2000). Caracteres como este são subjetivos e passíveis de erro, pois o crescimento fúngico pode ser prejudicado ou favorecido por algum outro fator, e ainda a colônia pode apresentar 35mm, dificultando a decisão de qual caminho tomar. Ambas as espécies produzem conídios pequenos (menores que 3µm de diâmetro) e esféricos (ou quase esféricos). Porém, o *P. citrinum* pode produzir exsudato ou pigmento solúvel amarelo, que altera a cor do meio. Esta amostra então foi novamente cultivada em CYA para confirmação da espécie, e, embora o tamanho da colônia não tenha sido determinante, produziu pigmento solúvel, sendo identificada como *P. citrinum*.

A amostra PBC-045, identificada como *Fusarium semitectum* na FUNED e *F. lateritium* na UFLA, em todas as análises, apresentou elevada identidade com *F. verticillioides* (ou seu teleomorfo *Gibberella moniliformis*), espécie mais comumente encontrada em milho (González et al., 1999; Blandino et al., 2014) e que produz teores mais elevados de micotoxinas quando comparado a outras espécies do gênero (Han et al., 2014). Ao reinterpretar os resultados considerando-a como *F. verticillioides*, as análises de código de barras de DNA foram mais significativas, levando à conclusão de que a amostra PBC-045 é um isolado de *F. verticillioides*. Torna-se, portanto, necessário confirmar a identificação morfológica no Laboratório de Sistemática e Ecologia dos Fungos da UFLA.

Uma análise geral das comparações das sequências obtidas com as disponíveis no NCBI mostra que a concordância entre a espécie identificada e a espécie reportada pelo BLAST foi de 70,7% para a região ITS e de 56,1% para a região RPB2. Esta diferença pode estar relacionada ao fato da região ITS ser mais estudada até o momento, por ser reconhecida como código de barras de DNA de fungos, e, desta forma, apresentar maior número de sequências depositadas nos bancos de dados (Schoch et al., 2012).

Na primeira análise dos gráficos de dispersão, excluindo-se os valores atípicos (*outliers*), a região ITS não apresentou *barcode gap* para nenhum dos gêneros avaliados, a região RPB2 apresentou *barcode gap* apenas para o gênero *Aspergillus*, e a região bTUB também não apresentou *barcode gap* para *Fusarium*. No caso de *Fusarium*, as distâncias interespecíficas das três regiões e intraespecíficas da região ITS apresentaram uma variação muito grande, ou seja, grande distância genética

entre as amostras da mesma espécie e distância genética pequena entre espécies diferentes, o que sugere alguma falha na identificação. A possibilidade de erro de identificação pôde ser observada também para o gênero *Penicillium*, cujas distâncias interespecíficas e intraespecíficas também apresentaram grande variação, respectivamente, para as regiões ITS e RPB2. Para o gênero *Aspergillus* a região RPB2 apresentou *barcode gap* de 10-15%, excluindo-se os valores atípicos (*outliers*).

Após re-identificação das amostras PBC-045 e PBC-099, os dados foram reinterpretados e os resultados mostraram um aumento do poder discriminatório de todas as regiões testadas para as espécies de *Fusarium* e *Penicillium*. Para a região ITS, o maior valor das distâncias intraespecíficas do gênero *Penicillium* coincide com a menor distância interespecífica, não apresentando *barcode gap*. Porém, a região RPB2 passou a apresentar *barcode gap* de 2-14%, excluindo-se os *outliers*. Já para as amostras de *Fusarium*, a região ITS apresentou *barcode gap* de 66-70%, mas manteve a grande variação entre as distâncias intraespecíficas. A região RPB2 apresentou *barcode gap* enorme de 1-73%. E a região bTUB apresentou *barcode gap* de 0,3-14,4%. Os valores de *barcode gap* para *Fusarium* podem ser superestimados devido ao fato de terem sido analisadas poucas amostras, e as amostras referentes aos isolados na FUNED pertencerem ao mesmo gênero.

Uma vez que a análise ABGD não leva em consideração a identificação morfológica das espécies nem a análise tradicional de código de barras de DNA, funciona como uma hipótese nula (H_0) para testar os resultados obtidos nestas análises anteriores. As amostras são divididas em espécies hipotéticas, também denominadas MOTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares), com base no *barcode gap* determinado automaticamente pelo programa (Puillandre et al., 2012; Ratnasingham & Hebert, 2013). A partir da avaliação da concordância entre esta divisão e as espécies previamente identificadas, os grupos gerados (ou MOTUs) podem representar correspondência, fusão, divisão ou mistura. De acordo com Ratnasingham e Hebert (2013) (Ratnasingham & Hebert, 2013), considera-se: (i) correspondência quando as amostras de uma espécie pertencem a uma única MOTU; (ii) fusão quando as amostras de duas ou mais espécies identificadas por morfologia são organizadas em uma única MOTU; (iii) divisão quando as amostras de uma espécie identificada por morfologia são organizadas em mais de uma MOTU; e (iv) mistura quando acontece fusão e divisão na determinação da MOTU.

As correspondências mostram a correta identificação morfológica das espécies, ou no mínimo, que pertencem à mesma espécie. Fusões, divisões e misturas não necessariamente implicam em erro na identificação morfológica, uma vez que o comportamento de um mesmo grupo taxonômico pode ser diferente quando se avalia diferentes regiões do DNA, pois diferentes segmentos de DNA podem ter taxas de evolução distintas (Nahum, 2012). Exemplos disso são as espécies de *Fusarium* que se misturam quando avaliada a região ITS e se agrupam em correspondência nas regiões RPB2 e bTUB; isolados de *A. flavus*, que se dividem na região ITS e se agrupam na região RPB2; isolados de *A. fumigatus* e *A. clavatus* que se misturam na região ITS e se separam na região RPB2; isolados de *P. oxalicum* que apresentam correspondência na região ITS se separam na região RPB2; e isolados de *P. funiculosum* que se dividem na região ITS e se agrupam na região RPB2.

Estes resultados demonstram a capacidade discriminatória de cada região para as espécies estudadas, e podem ser melhor visualizados na Tabela 12.

Tabela 12. Síntese dos resultados das análises ABGD correlacionados à identificação morfológica das espécies, considerando as regiões ITS, RPB2 e bTUB

Região	Gênero	Resultado	Espécies	
ITS	<i>Fusarium</i>	Mistura	<i>F. verticillioides</i>	
			<i>F. lateritium</i> / <i>F. verticillioides</i>	
	<i>Aspergillus</i>	Correspondência	<i>A. wentii</i>	
			Divisão	<i>A. flavus</i> - 2 MOTUs
		Mistura	<i>A. candidus</i> / <i>A. niveus</i>	
			<i>A. niveus</i> / <i>A. terreus</i>	
			<i>A. fumigatus</i>	
			<i>A. fumigatus</i> / <i>A. clavatus</i>	
			<i>P. funiculosum</i>	
			<i>P. oxalicum</i>	
		<i>Penicillium</i>	Correspondência	<i>P. raistrickii</i>
				<i>P. citrinum</i>
	Divisão		<i>P. corylophilum</i> - 3 MOTUs	
			<i>P. islandicum</i> - 2 MOTUs	
			<i>P. glabrum</i> - 2 MOTUs	

Tabela 13. Cont.

Região	Gênero	Resultado	Espécies
RPB2	<i>Fusarium</i>	Correspondência	<i>F. verticillioides</i>
			<i>F. lateritium</i>
	<i>Aspergillus</i>	Correspondência	<i>A. wentii</i>
			<i>A. flavus</i>
		Divisão	<i>A. fumigatus</i>
			<i>A. clavatus</i> - 2 MOTUs
			<i>A. candidus</i> / <i>A. niveus</i>
			<i>A. niveus</i> / <i>A. terreus</i>
	<i>Penicillium</i>	Correspondência	<i>P. funiculosum</i>
			<i>P. islandicum</i>
			<i>P. raistrickii</i>
		Divisão	<i>P. citrinum</i>
<i>P. corylophilum</i> - 4 MOTUs			
<i>P. oxalicum</i> - 2 MOTUs			
bTUB	<i>Fusarium</i>	Correspondência	<i>P. glabrum</i> - 2 MOTUs
			<i>F. verticillioides</i>
			<i>F. lateritium</i>

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

A região RPB2 apresentou maior poder discriminatório entre as espécies de *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, pois gerou maior número de correspondências e, menor número de misturas entre elas.

De acordo com dados da literatura, a região ITS não é suficientemente variável para distinguir espécies próximas de alguns gêneros de Ascomycota (Skouboe et al., 1999; Seifert et al., 2007; Schoch et al., 2012; Visagie et al., 2014a). A avaliação geral de todos os resultados obtidos neste trabalho corrobora com estes dados, uma vez que ITS não foi eficiente na discriminação das espécies deste estudo.

A região RPB2, possibilitou a discriminação das espécies de *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas de milho e derivados de forma mais eficiente que a região ITS. No geral, marcadores de proteínas tem maior poder de resolução, porém apresentam mais falhas na PCR e no sequenciamento (Schoch et al., 2012), como

pôde ser observada a maior dificuldade de obtenção dos amplicons da região RPB2 neste estudo. Apesar de ter sido eliminado por Schoch e colaboradores (2012) como potencial código de barras de DNA para o reino Fungi devido a estas falhas, RPB2 demonstrou sucesso como código de barras de DNA secundário para Ascomycota (Zhu et al., 2014) e outros grupos (Lewis et al., 2011).

Como o reino Fungi é muito diverso filogeneticamente, até o momento não foi descrito um marcador único para todo o reino, sendo necessário um sistema de código de barras de DNA que combine dois marcadores, podendo um deles ser RPB2 (Zhao et al., 2011).

7 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostram que a técnica de identificação de espécies através de código de barras de DNA, uma vez padronizada e implantada no laboratório, torna-se uma ferramenta eficiente e rápida para auxiliar e confirmar a identificação morfológica de fungos filamentosos isolados de alimentos. A morfologia deve continuar sendo utilizada na identificação preliminar das espécies, pois fornece informações valiosas acerca dos espécimes, porém, as ferramentas moleculares desenvolvidas contribuem significativamente para a obtenção de resultados mais confiáveis.

A partir dos resultados obtidos conclui-se que o código de barras de DNA primário estabelecido para fungos (ITS) não foi eficiente para discriminar os gêneros potencialmente micotoxigênicos estudados. Os resultados indicam a utilização de um código de barras de DNA secundário, baseado no gene que codifica a subunidade maior da RNA polimerase II (RPB2), para identificação de espécies dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* isolados de milho e derivados.

Diante da importância do monitoramento de micotoxinas em alimentos para a saúde pública, este trabalho contribui para as ações de vigilância sanitária, pois através do estabelecimento da ferramenta molecular avaliada será possível agregar maior confiabilidade aos laudos emitidos pela FUNED.

7.1 Perspectivas

Devido ao fato de as amostras de *Fusarium* analisadas neste estudo pertencerem a uma única espécie, os resultados não são suficientes para afirmar a eficiência ou ineficiência das regiões testadas como códigos de barras de DNA, mas direcionam estudos futuros. Devem ser realizados novos estudos, principalmente com *Fusarium* spp., mas também *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., principais produtores de micotoxinas em milho e derivados, utilizando uma amostragem maior e mais diversa, de fungos isolados em diferentes regiões do Brasil.

Além disso, os estudos poderão ser ampliados para diferentes espécies e gêneros, de importância na produção de micotoxinas, isolados de outros tipos de alimentos analisados pelo Serviço de Ciências Bioquímicas da FUNED.

8 APÊNDICES

APÊNDICE A - FOTOGRAFIAS REPRESENTATIVAS DAS ESPÉCIES PERTENCENTES AO GRUPO DE ESTUDO.

Fotografias Macroscópicas:

Fusarium spp. – Crescimento por 7 dias a 25°C em Ágar-Dextrose-Batata.

Aspergillus spp. e *Penicillium* spp. – Crescimento por 7 dias a 25°C em CYA.

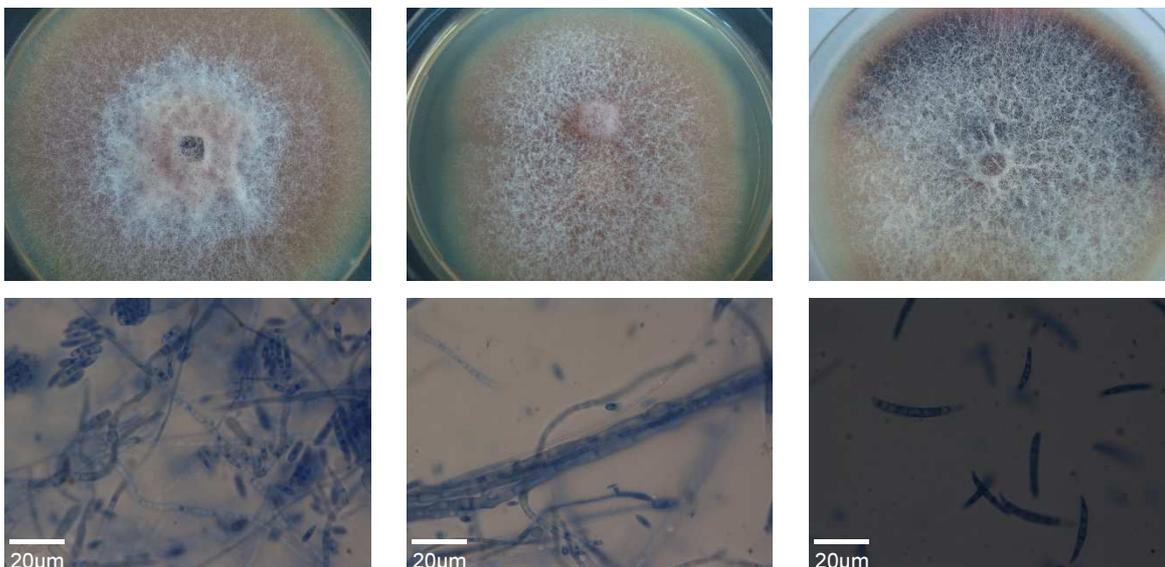
(Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015)

Fotografias Microscópicas:

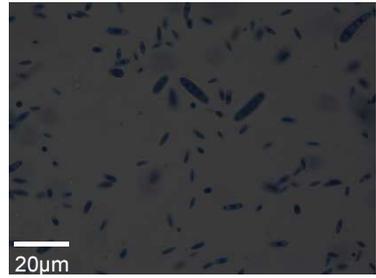
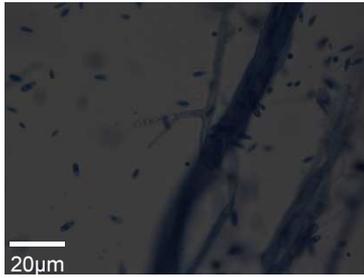
Lâminas coradas com ácido láctico azul 85% visualizadas ao microscópio óptico sob imersão (aumento de 1000X).

(Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015)

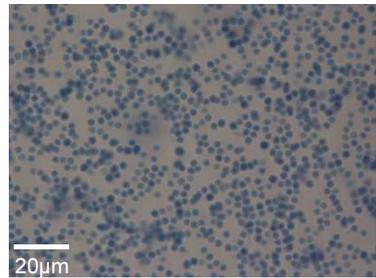
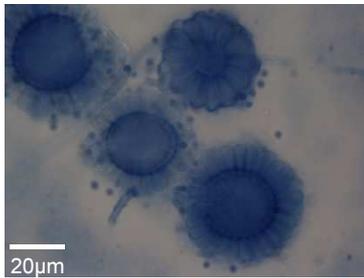
Fusarium verticillioides



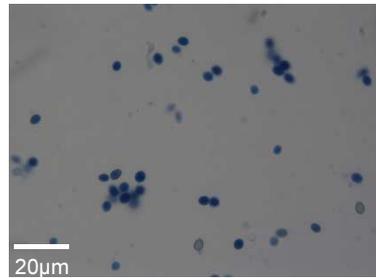
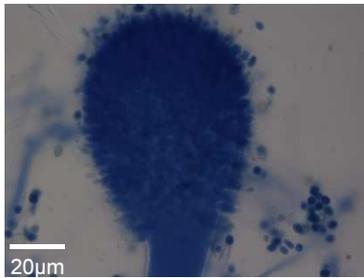
Fusarium semitectum



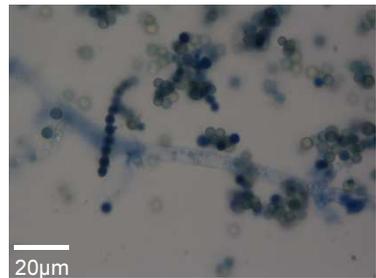
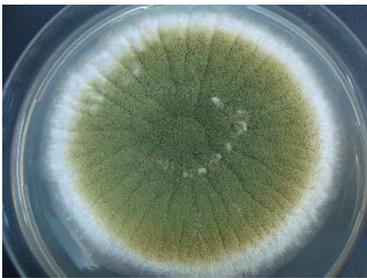
Aspergillus candidus



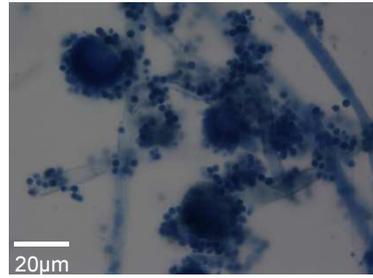
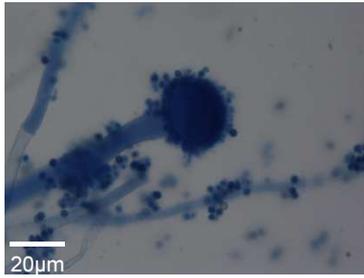
Aspergillus clavatus



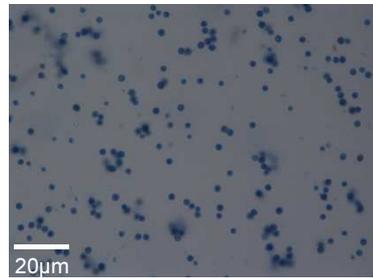
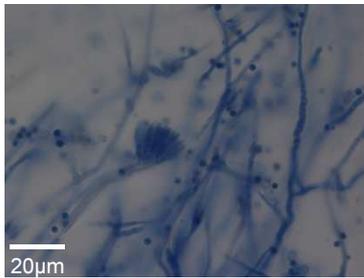
Aspergillus flavus



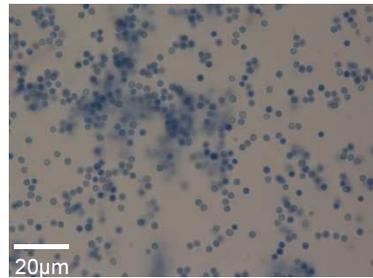
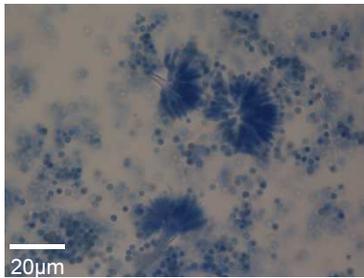
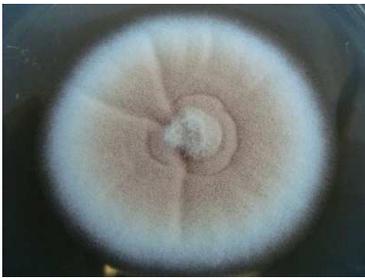
Aspergillus fumigatus



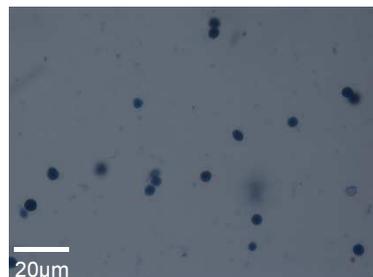
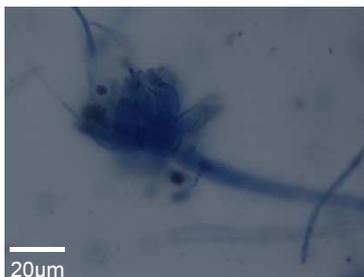
Aspergillus niveus



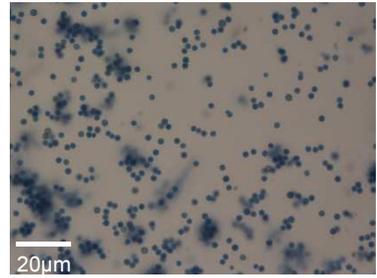
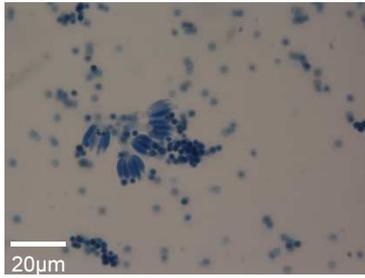
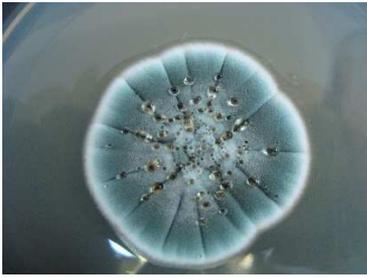
Aspergillus terreus



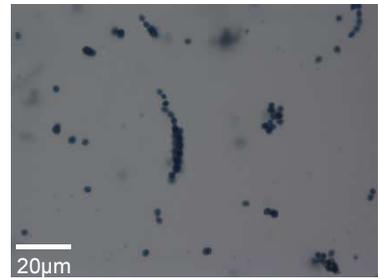
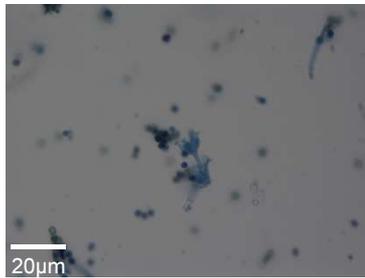
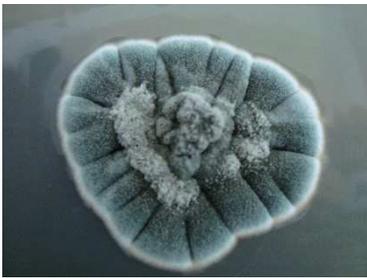
Aspergillus wentii



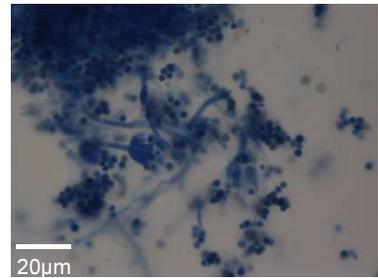
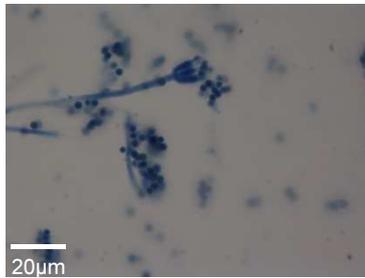
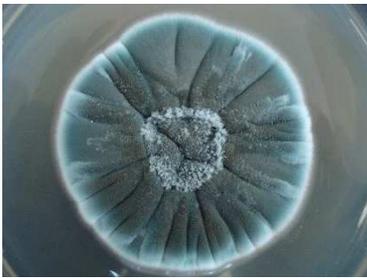
Penicillium citrinum



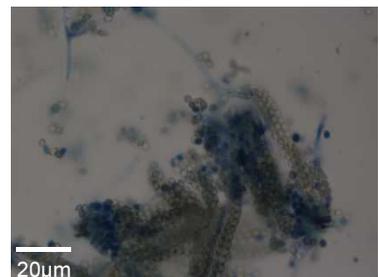
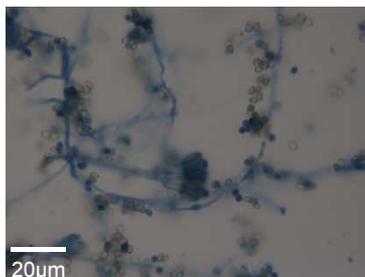
Penicillium corylophilum

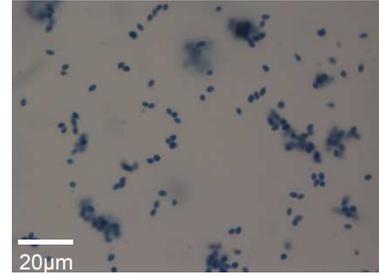
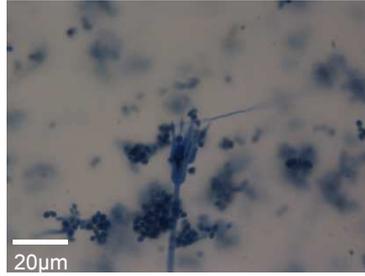


Penicillium glabrum



Penicillium islandicum



Penicillium oxalicum

APÊNDICE B - MATRIZES DE DISTÂNCIA GERADAS A PARTIR DA COMPARAÇÃO PAR-A-PAR ENTRE AS AMOSTRAS DO ESTUDO

REGIÃO ITS DE *Fusarium* spp.

	PBC-001ITS	PBC-007ITS	PBC-040ITS	PBC-043ITS	PBC-049ITS	PBC-045ITS	AY904057	FN547445
PBC-001ITS		0.002	0.644	0.000	0.000	0.000	0.709	0.734
PBC-007ITS	0.002		0.659	0.002	0.002	0.002	0.771	0.726
PBC-040ITS	0.644	0.659		0.659	0.640	0.638	0.095	0.091
PBC-043ITS	0.000	0.002	0.659		0.000	0.000	0.715	0.743
PBC-049ITS	0.000	0.002	0.640	0.000		0.000	0.711	0.742
PBC-045ITS	0.000	0.002	0.638	0.000	0.000		0.697	0.722
AY904057	0.709	0.771	0.095	0.715	0.711	0.697		0.010
FN547445	0.734	0.726	0.091	0.743	0.742	0.722	0.010	

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

REGIÃO RPB2 DE *Fusarium* spp.

	PBC-001RPB2	PBC-007RPB2	PBC-040RPB2	PBC-043RPB2	PBC-049RPB2	PBC-045RPB2	JF740959	JF741009
PBC-001RPB2		0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.770	0.765
PBC-007RPB2	0.001		0.001	0.001	0.001	0.001	0.757	0.752
PBC-040RPB2	0.000	0.001		0.000	0.000	0.000	0.767	0.762
PBC-043RPB2	0.000	0.001	0.000		0.000	0.000	0.738	0.733
PBC-049RPB2	0.000	0.001	0.000	0.000		0.000	0.767	0.762
PBC-045RPB2	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000		0.770	0.765
JF740959	0.770	0.757	0.767	0.738	0.767	0.770		0.001
JF741009	0.765	0.752	0.762	0.733	0.762	0.765	0.001	

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

REGIÃO bTUB DE *Fusarium* spp.

	PBC-001TUB	PBC-007TUB	PBC-040TUB	PBC-043TUB	PBC-049TUB	PBC-045TUB	FN554626	KJ125878
PBC-001TUB		0.003	0.002	0.002	0.000	0.000	0.201	0.144
PBC-007TUB	0.003		0.002	0.002	0.002	0.002	0.196	0.144
PBC-040TUB	0.002	0.002		0.000	0.000	0.000	0.198	0.144
PBC-043TUB	0.002	0.002	0.000		0.000	0.000	0.201	0.144
PBC-049TUB	0.000	0.002	0.000	0.000		0.000	0.201	0.144
PBC-045TUB	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000		0.201	0.144
FN554626	0.201	0.196	0.198	0.201	0.201	0.201		0.000
KJ125878	0.144	0.144	0.144	0.144	0.144	0.144	0.000	

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

REGIÃO ITS DE *Aspergillus* spp.

	PBC-054ITS	AY373842	EF669605	KP329615	PBC-055ITS	GU183164	HQ026749	PBC-057ITS	PBC-058ITS	PBC-059ITS	PBC-100ITS	PBC-101ITS	PBC-061ITS
PBC-054ITS		0.009	0.009	0.009	0.064	0.051	0.051	0.704	0.703	0.678	0.080	0.080	0.048
AY373842	0.009		0.000	0.000	0.062	0.053	0.053	0.688	0.709	0.711	0.079	0.077	0.050
EF669605	0.009	0.000		0.000	0.066	0.056	0.053	0.827	0.733	0.681	0.084	0.081	0.053
KP329615	0.009	0.000	0.000		0.064	0.055	0.050	0.812	0.824	0.821	0.082	0.079	0.052
PBC-055ITS	0.064	0.062	0.066	0.064		0.000	0.000	0.808	0.761	0.781	0.101	0.101	0.046
GU183164	0.051	0.053	0.056	0.055	0.000		0.005	0.785	0.792	0.800	0.103	0.100	0.038
HQ026749	0.051	0.053	0.053	0.050	0.000	0.005		0.741	0.706	0.720	0.101	0.100	0.038
PBC-057ITS	0.704	0.688	0.827	0.812	0.808	0.785	0.741		0.000	0.000	0.738	0.711	0.710
PBC-058ITS	0.703	0.709	0.733	0.824	0.761	0.792	0.706	0.000		0.000	0.777	0.782	0.706
PBC-059ITS	0.678	0.711	0.681	0.821	0.781	0.800	0.720	0.000	0.000		0.739	0.720	0.718
PBC-100ITS	0.080	0.079	0.084	0.082	0.101	0.103	0.101	0.738	0.777	0.739		0.000	0.097
PBC-101ITS	0.080	0.077	0.081	0.079	0.101	0.100	0.100	0.711	0.782	0.720	0.000		0.097
PBC-061ITS	0.048	0.050	0.053	0.052	0.046	0.038	0.038	0.710	0.706	0.718	0.097	0.097	
PBC-062ITS	0.720	0.719	0.735	0.758	0.746	0.756	0.741	0.101	0.104	0.101	0.726	0.721	0.758
PBC-063ITS	0.723	0.712	0.725	0.781	0.792	0.749	0.800	0.099	0.103	0.100	0.745	0.741	0.756
PBC-064ITS	0.000	0.007	0.007	0.007	0.060	0.057	0.057	0.694	0.745	0.722	0.078	0.078	0.044
PBC-065ITS	0.079	0.082	0.087	0.085	0.085	0.086	0.080	0.726	0.722	0.717	0.080	0.081	0.085
AY373853	0.081	0.077	0.082	0.080	0.084	0.083	0.082	0.700	0.731	0.760	0.085	0.082	0.096
PBC-066ITS	0.079	0.083	0.088	0.086	0.085	0.082	0.082	0.715	0.741	0.713	0.081	0.082	0.086
EF432562	0.088	0.091	0.089	0.089	0.098	0.099	0.099	0.782	0.792	0.777	0.097	0.097	0.095
AY822634	0.083	0.088	0.088	0.088	0.084	0.084	0.084	0.764	0.817	0.807	0.086	0.086	0.081
PBC-067ITS	0.059	0.064	0.068	0.066	0.064	0.064	0.064	0.768	0.799	0.796	0.069	0.069	0.064
AY373884	0.060	0.058	0.065	0.064	0.064	0.064	0.063	0.760	0.775	0.760	0.072	0.069	0.065
EF652158	0.066	0.065	0.061	0.064	0.063	0.064	0.069	0.816	0.805	0.801	0.074	0.071	0.065
KP131641	0.064	0.066	0.073	0.071	0.070	0.071	0.071	0.764	0.798	0.791	0.076	0.075	0.074

	PBC-062ITS	PBC-063ITS	PBC-064ITS	PBC-065ITS	AY373853	PBC-066ITS	EF432562	AY822634	PBC-067ITS	AY373884	EF652158	KP131641
PBC-054ITS	0.720	0.723	0.000	0.079	0.081	0.079	0.088	0.083	0.059	0.060	0.066	0.064
AY373842	0.719	0.712	0.007	0.082	0.077	0.083	0.091	0.088	0.064	0.058	0.065	0.066
EF669605	0.735	0.725	0.007	0.087	0.082	0.088	0.089	0.088	0.068	0.065	0.061	0.073
KP329615	0.758	0.781	0.007	0.085	0.080	0.086	0.089	0.088	0.066	0.064	0.064	0.071
PBC-055ITS	0.746	0.792	0.060	0.085	0.084	0.085	0.098	0.084	0.064	0.064	0.063	0.070
GU183164	0.756	0.749	0.057	0.086	0.083	0.082	0.099	0.084	0.064	0.064	0.064	0.071
HQ026749	0.741	0.800	0.057	0.080	0.082	0.082	0.099	0.084	0.064	0.063	0.069	0.071
PBC-057ITS	0.101	0.099	0.694	0.726	0.700	0.715	0.782	0.764	0.768	0.760	0.816	0.764
PBC-058ITS	0.104	0.103	0.745	0.722	0.731	0.741	0.792	0.817	0.799	0.775	0.805	0.798
PBC-059ITS	0.101	0.100	0.722	0.717	0.760	0.713	0.777	0.807	0.796	0.760	0.801	0.791
PBC-100ITS	0.726	0.745	0.078	0.080	0.085	0.081	0.097	0.086	0.069	0.072	0.074	0.076
PBC-101ITS	0.721	0.741	0.078	0.081	0.082	0.082	0.097	0.086	0.069	0.069	0.071	0.075
PBC-061ITS	0.758	0.756	0.044	0.085	0.096	0.086	0.095	0.081	0.064	0.065	0.065	0.074
PBC-062ITS		0.000	0.731	0.684	0.719	0.708	0.750	0.682	0.654	0.763	0.835	0.658
PBC-063ITS	0.000		0.707	0.692	0.761	0.701	0.750	0.682	0.659	0.755	0.821	0.664
PBC-064ITS	0.731	0.707		0.077	0.077	0.078	0.086	0.083	0.065	0.066	0.072	0.064
PBC-065ITS	0.684	0.692	0.077		0.026	0.000	0.027	0.016	0.070	0.071	0.069	0.076
AY373853	0.719	0.761	0.077	0.026		0.026	0.033	0.023	0.075	0.070	0.074	0.081
PBC-066ITS	0.708	0.701	0.078	0.000	0.026		0.028	0.016	0.070	0.071	0.070	0.076
EF432562	0.750	0.750	0.086	0.027	0.033	0.028		0.009	0.076	0.075	0.073	0.083
AY822634	0.682	0.682	0.083	0.016	0.023	0.016	0.009		0.068	0.068	0.068	0.068
PBC-067ITS	0.654	0.659	0.065	0.070	0.075	0.070	0.076	0.068		0.000	0.000	0.005
AY373884	0.763	0.755	0.066	0.071	0.070	0.071	0.075	0.068	0.000		0.002	0.005
EF652158	0.835	0.821	0.072	0.069	0.074	0.070	0.073	0.068	0.000	0.002		0.006
KP131641	0.658	0.664	0.064	0.076	0.081	0.076	0.083	0.068	0.005	0.005	0.006	

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

REGIÃO RPB2 DE *Aspergillus* spp.

	PBC-054RPB	EF669651	JN121535	PBC-055RPB	EF669785	EU982099	PBC-057RPB	PBC-058RPB	PBC-059RPB	PBC-100RPB	PBC-101RPB	PBC-061RPB
PBC-054RPB		0.068	0.068	0.481	0.218	0.219	0.248	0.248	0.248	0.248	0.248	0.202
EF669651	0.068		0.056	0.474	0.204	0.200	0.232	0.233	0.232	0.236	0.241	0.196
JN121535	0.068	0.056		0.474	0.204	0.203	0.244	0.243	0.242	0.247	0.246	0.202
PBC-055RPB	0.481	0.474	0.474		0.538	0.536	0.505	0.508	0.505	0.505	0.505	0.550
EF669785	0.218	0.204	0.204	0.538		0.018	0.216	0.214	0.216	0.213	0.214	0.155
EU982099	0.219	0.200	0.203	0.536	0.018		0.209	0.210	0.210	0.213	0.213	0.149
PBC-057RPB	0.248	0.232	0.244	0.505	0.216	0.209		0.003	0.000	0.000	0.000	0.207
PBC-058RPB	0.248	0.233	0.243	0.508	0.214	0.210	0.003		0.003	0.003	0.003	0.208
PBC-059RPB	0.248	0.232	0.242	0.505	0.216	0.210	0.000	0.003		0.000	0.000	0.206
PBC-100RPB	0.248	0.236	0.247	0.505	0.213	0.213	0.000	0.003	0.000		0.000	0.208
PBC-101RPB	0.248	0.241	0.246	0.505	0.214	0.213	0.000	0.003	0.000	0.000		0.211
PBC-061RPB	0.202	0.196	0.202	0.550	0.155	0.149	0.207	0.208	0.206	0.208	0.211	
PBC-062RPB	0.208	0.203	0.199	0.544	0.170	0.153	0.207	0.207	0.208	0.210	0.212	0.051
PBC-063RPB	0.208	0.204	0.199	0.544	0.170	0.158	0.213	0.213	0.213	0.213	0.214	0.050
PBC-064RPB	0.003	0.069	0.073	0.483	0.224	0.222	0.232	0.230	0.232	0.232	0.232	0.191
PBC-065RPB	0.220	0.213	0.214	0.513	0.195	0.202	0.218	0.221	0.218	0.220	0.222	0.183
EF669657	0.218	0.197	0.197	0.529	0.208	0.220	0.225	0.237	0.226	0.230	0.231	0.185
PBC-066RPB	0.221	0.209	0.211	0.511	0.197	0.204	0.217	0.221	0.216	0.222	0.224	0.183
EF669660	0.230	0.209	0.210	0.489	0.203	0.215	0.227	0.235	0.227	0.231	0.234	0.191
LC000577	0.218	0.200	0.205	0.499	0.209	0.219	0.221	0.227	0.221	0.225	0.227	0.194
PBC-067RPB	0.222	0.217	0.215	0.517	0.206	0.216	0.213	0.222	0.213	0.214	0.217	0.179
EF652095	0.218	0.213	0.208	0.510	0.204	0.213	0.214	0.223	0.214	0.216	0.219	0.174
JN121418	0.218	0.208	0.208	0.510	0.207	0.218	0.216	0.225	0.216	0.218	0.219	0.177

	PBC-062RPB	PBC-063RPB	PBC-064RPB	PBC-065RPB	EF669657	PBC-066RPB	EF669660	LC000577	PBC-067RPB	EF652095	JN121418
PBC-054RPB	0.208	0.208	0.003	0.220	0.218	0.221	0.230	0.218	0.222	0.218	0.218
EF669651	0.203	0.204	0.069	0.213	0.197	0.209	0.209	0.200	0.217	0.213	0.208
JN121535	0.199	0.199	0.073	0.214	0.197	0.211	0.210	0.205	0.215	0.208	0.208
PBC-055RPB	0.544	0.544	0.483	0.513	0.529	0.511	0.489	0.499	0.517	0.510	0.510
EF669785	0.170	0.170	0.224	0.195	0.208	0.197	0.203	0.209	0.206	0.204	0.207
EU982099	0.153	0.158	0.222	0.202	0.220	0.204	0.215	0.219	0.216	0.213	0.218
PBC-057RPB	0.207	0.213	0.232	0.218	0.225	0.217	0.227	0.221	0.213	0.214	0.216
PBC-058RPB	0.207	0.213	0.230	0.221	0.237	0.221	0.235	0.227	0.222	0.223	0.225
PBC-059RPB	0.208	0.213	0.232	0.218	0.226	0.216	0.227	0.221	0.213	0.214	0.216
PBC-100RPB	0.210	0.213	0.232	0.220	0.230	0.222	0.231	0.225	0.214	0.216	0.218
PBC-101RPB	0.212	0.214	0.232	0.222	0.231	0.224	0.234	0.227	0.217	0.219	0.219
PBC-061RPB	0.051	0.050	0.191	0.183	0.185	0.183	0.191	0.194	0.179	0.174	0.177
PBC-062RPB		0.000	0.197	0.188	0.191	0.188	0.203	0.201	0.176	0.172	0.177
PBC-063RPB	0.000		0.197	0.190	0.188	0.191	0.202	0.204	0.182	0.178	0.181
PBC-064RPB	0.197	0.197		0.209	0.211	0.209	0.219	0.207	0.209	0.207	0.207
PBC-065RPB	0.188	0.190	0.209		0.089	0.000	0.065	0.074	0.197	0.195	0.196
EF669657	0.191	0.188	0.211	0.089		0.088	0.072	0.089	0.196	0.194	0.189
PBC-066RPB	0.188	0.191	0.209	0.000	0.088		0.064	0.073	0.196	0.193	0.194
EF669660	0.203	0.202	0.219	0.065	0.072	0.064		0.026	0.194	0.188	0.185
LC000577	0.201	0.204	0.207	0.074	0.089	0.073	0.026		0.209	0.199	0.196
PBC-067RPB	0.176	0.182	0.209	0.197	0.196	0.196	0.194	0.209		0.006	0.006
EF652095	0.172	0.178	0.207	0.195	0.194	0.193	0.188	0.199	0.006		0.000
JN121418	0.177	0.181	0.207	0.196	0.189	0.194	0.185	0.196	0.006	0.000	

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

REGIÃO ITS DE *Penicillium* spp.

	PBC-076 TS	PBC-077 TS	PBC-078 TS	PBC-079 TS	PBC-080 TS	PBC-082 TS	PBC-083 TS	AF033450	KP329605	KP329705	PBC-085 TS	PBC-086 TS	PBC-087 TS	PBC-088 TS	PBC-089 TS
PBC-076 TS		0.000	0.004	0.000	0.000	0.056	0.273	0.082	0.082	0.082	0.144	0.144	0.143	0.150	0.143
PBC-077 TS	0.000		0.004	0.000	0.000	0.056	0.272	0.082	0.082	0.082	0.143	0.143	0.143	0.150	0.143
PBC-078 TS	0.004	0.004		0.004	0.004	0.058	0.280	0.087	0.087	0.087	0.145	0.145	0.145	0.152	0.145
PBC-079 TS	0.000	0.000	0.004		0.000	0.055	0.263	0.081	0.081	0.081	0.142	0.143	0.140	0.149	0.141
PBC-080 TS	0.000	0.000	0.004	0.000		0.056	0.267	0.082	0.082	0.082	0.142	0.143	0.143	0.149	0.142
PBC-082 TS	0.056	0.056	0.058	0.055	0.056		0.235	0.058	0.058	0.058	0.145	0.146	0.145	0.151	0.144
PBC-083 TS	0.273	0.272	0.280	0.263	0.267	0.235		0.274	0.277	0.274	0.293	0.294	0.285	0.293	0.294
AF033450	0.082	0.082	0.087	0.081	0.082	0.058	0.274		0.002	0.000	0.147	0.147	0.147	0.153	0.146
KP329605	0.082	0.082	0.087	0.081	0.082	0.058	0.277	0.002		0.002	0.147	0.147	0.147	0.153	0.146
KP329705	0.082	0.082	0.087	0.081	0.082	0.058	0.274	0.000	0.002		0.147	0.147	0.147	0.153	0.146
PBC-085 TS	0.144	0.143	0.145	0.142	0.142	0.145	0.293	0.147	0.147	0.147		0.000	0.002	0.000	0.000
PBC-086 TS	0.144	0.143	0.145	0.143	0.143	0.146	0.294	0.147	0.147	0.147	0.000		0.002	0.000	0.000
PBC-087 TS	0.143	0.143	0.145	0.140	0.143	0.145	0.285	0.147	0.147	0.147	0.002	0.002		0.002	0.002
PBC-088 TS	0.150	0.150	0.152	0.149	0.149	0.151	0.293	0.153	0.153	0.153	0.000	0.000	0.002		0.000
PBC-089 TS	0.143	0.143	0.145	0.141	0.142	0.144	0.294	0.146	0.146	0.146	0.000	0.000	0.002	0.000	
PBC-090 TS	0.079	0.078	0.081	0.078	0.078	0.058	0.255	0.044	0.044	0.044	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142
F.B04924	0.073	0.073	0.078	0.073	0.073	0.069	0.289	0.050	0.052	0.050	0.153	0.153	0.153	0.159	0.152
J.N887323	0.070	0.070	0.072	0.073	0.070	0.064	0.294	0.046	0.048	0.046	0.152	0.153	0.156	0.158	0.151
PBC-091 TS	0.177	0.177	0.179	0.177	0.177	0.146	0.318	0.165	0.162	0.165	0.153	0.153	0.156	0.153	0.156
AF455543	0.143	0.143	0.145	0.142	0.142	0.144	0.278	0.152	0.150	0.152	0.129	0.130	0.127	0.138	0.133
F.B72071	0.170	0.170	0.173	0.170	0.170	0.194	0.351	0.191	0.188	0.191	0.176	0.180	0.180	0.185	0.191
J.N899318	0.148	0.148	0.150	0.146	0.147	0.138	0.287	0.127	0.132	0.134	0.136	0.136	0.136	0.144	0.137
PBC-092 TS	0.148	0.147	0.150	0.145	0.147	0.128	0.278	0.147	0.143	0.147	0.142	0.143	0.139	0.142	0.149
PBC-093 TS	0.148	0.147	0.150	0.146	0.147	0.129	0.283	0.147	0.143	0.147	0.142	0.142	0.142	0.142	0.143
PBC-094 TS	0.150	0.149	0.151	0.145	0.148	0.128	0.277	0.147	0.142	0.147	0.143	0.143	0.141	0.143	0.144
PBC-095 TS	0.148	0.147	0.150	0.147	0.147	0.129	0.283	0.148	0.144	0.148	0.143	0.143	0.141	0.143	0.144
PBC-096 TS	0.148	0.148	0.150	0.145	0.147	0.128	0.281	0.147	0.142	0.147	0.142	0.143	0.141	0.150	0.143
PBC-099 TS	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.058	0.250	0.086	0.086	0.086	0.159	0.160	0.160	0.166	0.158
KP152490	0.070	0.070	0.074	0.068	0.070	0.055	0.246	0.050	0.048	0.048	0.142	0.142	0.139	0.148	0.141
KR012430	0.071	0.071	0.076	0.071	0.071	0.051	0.257	0.044	0.044	0.044	0.142	0.143	0.143	0.148	0.141

	PBC-090 TS	F.B04924	J.N887323	PBC-091 TS	AF455543	F.B72071	J.N899318	PBC-092 TS	PBC-093 TS	PBC-094 TS	PBC-095 TS	PBC-096 TS	PBC-099 TS	KP152490	KR012430
PBC-076 TS	0.079	0.073	0.070	0.177	0.143	0.170	0.148	0.148	0.148	0.150	0.148	0.148	0.000	0.070	0.071
PBC-077 TS	0.078	0.073	0.070	0.177	0.143	0.170	0.148	0.147	0.147	0.149	0.147	0.148	0.000	0.070	0.071
PBC-078 TS	0.081	0.078	0.072	0.179	0.145	0.173	0.150	0.150	0.150	0.151	0.150	0.150	0.004	0.074	0.076
PBC-079 TS	0.078	0.073	0.073	0.177	0.142	0.170	0.146	0.145	0.146	0.145	0.147	0.145	0.000	0.068	0.071
PBC-080 TS	0.078	0.073	0.070	0.177	0.142	0.170	0.147	0.147	0.147	0.148	0.147	0.147	0.000	0.070	0.071
PBC-082 TS	0.058	0.069	0.064	0.146	0.144	0.194	0.138	0.128	0.129	0.128	0.129	0.128	0.058	0.055	0.051
PBC-083 TS	0.255	0.289	0.294	0.318	0.278	0.351	0.287	0.278	0.283	0.277	0.283	0.281	0.250	0.246	0.257
AF033450	0.044	0.050	0.046	0.165	0.152	0.191	0.127	0.147	0.147	0.147	0.148	0.147	0.086	0.050	0.044
KP329605	0.044	0.052	0.048	0.162	0.150	0.188	0.132	0.143	0.143	0.142	0.144	0.142	0.086	0.048	0.044
KP329705	0.044	0.050	0.046	0.165	0.152	0.191	0.134	0.147	0.147	0.147	0.148	0.147	0.086	0.048	0.044
PBC-085 TS	0.142	0.153	0.152	0.153	0.129	0.176	0.136	0.142	0.142	0.143	0.143	0.142	0.159	0.142	0.142
PBC-086 TS	0.142	0.153	0.153	0.153	0.130	0.180	0.136	0.143	0.142	0.143	0.143	0.143	0.160	0.142	0.143
PBC-087 TS	0.142	0.153	0.156	0.156	0.127	0.180	0.136	0.139	0.142	0.141	0.141	0.141	0.160	0.139	0.143
PBC-088 TS	0.142	0.159	0.158	0.153	0.138	0.185	0.144	0.142	0.142	0.143	0.143	0.150	0.166	0.148	0.148
PBC-089 TS	0.142	0.152	0.151	0.156	0.133	0.191	0.137	0.149	0.143	0.144	0.144	0.143	0.158	0.141	0.141
PBC-090 TS		0.050	0.045	0.157	0.151	0.201	0.158	0.155	0.148	0.150	0.148	0.149	0.085	0.051	0.052
F.B04924	0.050		0.003	0.157	0.148	0.188	0.148	0.154	0.154	0.154	0.156	0.154	0.077	0.058	0.052
J.N887323	0.045	0.003		0.157	0.147	0.192	0.143	0.147	0.148	0.150	0.148	0.147	0.075	0.056	0.049
PBC-091 TS	0.157	0.157	0.157		0.034	0.042	0.004	0.053	0.046	0.046	0.046	0.053	0.176	0.155	0.152
AF455543	0.151	0.148	0.147	0.034		0.014	0.036	0.050	0.049	0.050	0.049	0.050	0.159	0.142	0.147
F.B72071	0.201	0.188	0.192	0.042	0.014		0.044	0.069	0.067	0.058	0.067	0.067	0.178	0.182	0.179
J.N899318	0.158	0.148	0.143	0.004	0.036	0.044		0.036	0.036	0.036	0.037	0.036	0.167	0.133	0.146
PBC-092 TS	0.155	0.154	0.147	0.053	0.050	0.069	0.036		0.005	0.000	0.005	0.000	0.163	0.143	0.146
PBC-093 TS	0.148	0.154	0.148	0.046	0.049	0.067	0.036	0.005		0.000	0.000	0.000	0.164	0.144	0.147
PBC-094 TS	0.150	0.154	0.150	0.046	0.050	0.058	0.036	0.000	0.000		0.000	0.000	0.164	0.141	0.146
PBC-095 TS	0.148	0.156	0.148	0.046	0.049	0.067	0.037	0.005	0.000	0.000		0.000	0.165	0.144	0.148
PBC-096 TS	0.149	0.154	0.147	0.053	0.050	0.067	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000		0.163	0.143	0.146
PBC-099 TS	0.085	0.077	0.075	0.176	0.159	0.178	0.167	0.163	0.164	0.164	0.165	0.163		0.079	0.079
KP152490	0.051	0.058	0.056	0.155	0.142	0.182	0.133	0.143	0.144	0.141	0.144	0.143	0.079		0.002
KR012430	0.052	0.052	0.049	0.152	0.147	0.179	0.146	0.146	0.147	0.146	0.148	0.146	0.079	0.002	

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

REGIÃO RPB2 DE *Penicillium* spp.

	PBC-076RFB	PBC-077RFB	PBC-078RFB	PBC-079RFB	PBC-080RFB	PBC-082RFB	PBC-083RFB	FJ004460	JN406569	PBC-085RFB	PBC-086RFB	PBC-087RFB	PBC-088RFB	PBC-089RFB
PBC-076RFB		0.003	0.002	0.003	0.000	0.146	0.199	0.326	0.241	0.289	0.288	0.297	0.292	0.290
PBC-077RFB	0.003		0.005	0.006	0.003	0.148	0.201	0.323	0.243	0.306	0.306	0.311	0.306	0.307
PBC-078RFB	0.002	0.005		0.000	0.003	0.150	0.202	0.324	0.238	0.288	0.287	0.297	0.290	0.288
PBC-079RFB	0.003	0.006	0.000		0.003	0.150	0.200	0.319	0.240	0.305	0.305	0.305	0.305	0.305
PBC-080RFB	0.000	0.003	0.003	0.003		0.146	0.200	0.323	0.244	0.304	0.304	0.309	0.304	0.305
PBC-082RFB	0.146	0.148	0.150	0.150	0.146		0.198	0.305	0.213	0.313	0.313	0.313	0.313	0.313
PBC-083RFB	0.199	0.201	0.202	0.200	0.200	0.198		0.359	0.236	0.297	0.296	0.299	0.300	0.296
FJ004460	0.326	0.323	0.324	0.319	0.323	0.305	0.359		0.280	0.426	0.426	0.430	0.428	0.429
JN406569	0.241	0.243	0.238	0.240	0.244	0.213	0.236	0.280		0.307	0.306	0.309	0.305	0.306
PBC-085RFB	0.289	0.306	0.288	0.305	0.304	0.313	0.297	0.426	0.307		0.000	0.000	0.000	0.002
PBC-086RFB	0.288	0.306	0.287	0.305	0.304	0.313	0.296	0.426	0.306	0.000		0.000	0.000	0.000
PBC-087RFB	0.297	0.311	0.297	0.305	0.309	0.313	0.299	0.430	0.309	0.000	0.000		0.000	0.000
PBC-088RFB	0.292	0.306	0.290	0.305	0.304	0.313	0.300	0.428	0.305	0.000	0.000	0.000		0.000
PBC-089RFB	0.290	0.307	0.288	0.305	0.305	0.313	0.296	0.429	0.306	0.002	0.000	0.000	0.000	
PBC-090RFB	0.221	0.227	0.220	0.221	0.224	0.179	0.212	0.339	0.207	0.252	0.253	0.254	0.253	0.253
FJ004470	0.207	0.210	0.205	0.207	0.209	0.181	0.188	0.316	0.212	0.305	0.305	0.314	0.306	0.304
GU372898	0.214	0.220	0.218	0.214	0.217	0.190	0.191	0.316	0.211	0.298	0.298	0.303	0.296	0.297
PBC-091RFB	0.296	0.297	0.294	0.294	0.296	0.326	0.303	0.435	0.301	0.241	0.241	0.241	0.241	0.242
KF196969	0.303	0.304	0.299	0.294	0.300	0.326	0.298	0.433	0.287	0.234	0.235	0.233	0.234	0.234
KF985015	0.302	0.300	0.297	0.290	0.294	0.325	0.300	0.426	0.287	0.227	0.229	0.226	0.227	0.228
JN121495	0.305	0.304	0.301	0.294	0.300	0.326	0.302	0.438	0.290	0.237	0.239	0.237	0.238	0.238
PBC-092RFB	0.315	0.323	0.313	0.311	0.317	0.338	0.309	0.458	0.323	0.257	0.257	0.255	0.257	0.258
PBC-093RFB	0.435	0.449	0.432	0.445	0.455	0.477	0.429	0.573	0.450	0.478	0.483	0.503	0.480	0.481
PBC-094RFB	0.309	0.322	0.308	0.312	0.318	0.332	0.297	0.458	0.320	0.253	0.253	0.254	0.252	0.254
PBC-095RFB	0.313	0.322	0.311	0.314	0.318	0.336	0.301	0.461	0.324	0.257	0.257	0.257	0.257	0.258
PBC-096RFB	0.316	0.326	0.314	0.313	0.318	0.340	0.308	0.459	0.328	0.258	0.258	0.257	0.258	0.259
PBC-099RFB	0.000	0.003	0.003	0.003	0.000	0.146	0.201	0.319	0.243	0.303	0.301	0.305	0.302	0.303
JN606589	0.219	0.218	0.218	0.203	0.212	0.224	0.251	0.347	0.236	0.321	0.317	0.312	0.316	0.318

	PBC-090RFB	FJ004470	GU372898	PBC-091RFB	KF196969	KF985015	JN121495	PBC-092RFB	PBC-093RFB	PBC-094RFB	PBC-095RFB	PBC-096RFB	PBC-099RFB	JN606589
PBC-076RFB	0.221	0.207	0.214	0.296	0.303	0.302	0.305	0.315	0.435	0.309	0.313	0.316	0.000	0.219
PBC-077RFB	0.227	0.210	0.220	0.297	0.304	0.300	0.304	0.323	0.449	0.322	0.322	0.326	0.003	0.218
PBC-078RFB	0.220	0.205	0.218	0.294	0.299	0.297	0.301	0.313	0.432	0.308	0.311	0.314	0.003	0.218
PBC-079RFB	0.221	0.207	0.214	0.294	0.294	0.290	0.294	0.311	0.445	0.312	0.314	0.313	0.003	0.203
PBC-080RFB	0.224	0.209	0.217	0.296	0.300	0.294	0.300	0.317	0.455	0.318	0.318	0.318	0.000	0.212
PBC-082RFB	0.179	0.181	0.190	0.326	0.326	0.325	0.326	0.338	0.477	0.332	0.336	0.340	0.146	0.224
PBC-083RFB	0.212	0.188	0.191	0.303	0.298	0.300	0.302	0.309	0.429	0.297	0.301	0.308	0.201	0.251
FJ004460	0.339	0.316	0.316	0.435	0.433	0.426	0.438	0.458	0.573	0.458	0.461	0.459	0.319	0.347
JN406569	0.207	0.212	0.211	0.301	0.287	0.287	0.290	0.323	0.450	0.320	0.324	0.328	0.243	0.236
PBC-085RFB	0.252	0.305	0.298	0.241	0.234	0.227	0.237	0.257	0.478	0.253	0.257	0.258	0.303	0.321
PBC-086RFB	0.253	0.305	0.298	0.241	0.235	0.229	0.239	0.257	0.483	0.253	0.257	0.258	0.301	0.317
PBC-087RFB	0.254	0.314	0.303	0.241	0.233	0.226	0.237	0.255	0.503	0.254	0.257	0.257	0.305	0.312
PBC-088RFB	0.253	0.306	0.296	0.241	0.234	0.227	0.238	0.257	0.480	0.252	0.257	0.258	0.302	0.316
PBC-089RFB	0.253	0.304	0.297	0.242	0.234	0.228	0.238	0.258	0.481	0.254	0.258	0.259	0.303	0.318
PBC-090RFB		0.177	0.168	0.296	0.290	0.289	0.298	0.317	0.436	0.302	0.313	0.316	0.220	0.248
FJ004470	0.177		0.011	0.293	0.286	0.289	0.290	0.298	0.442	0.296	0.298	0.301	0.207	0.235
GU372898	0.168	0.011		0.295	0.284	0.281	0.280	0.295	0.417	0.295	0.297	0.298	0.215	0.232
PBC-091RFB	0.296	0.293	0.295		0.000	0.000	0.000	0.089	0.488	0.087	0.086	0.089	0.296	0.320
KF196969	0.290	0.286	0.284	0.000		0.000	0.000	0.091	0.466	0.093	0.089	0.091	0.304	0.312
KF985015	0.289	0.289	0.281	0.000	0.000		0.000	0.090	0.449	0.093	0.087	0.090	0.300	0.310
JN121495	0.298	0.290	0.280	0.000	0.000	0.000		0.091	0.467	0.094	0.089	0.091	0.304	0.312
PBC-092RFB	0.317	0.298	0.295	0.089	0.091	0.090	0.091		0.477	0.003	0.001	0.000	0.315	0.328
PBC-093RFB	0.436	0.442	0.417	0.488	0.466	0.449	0.467	0.477		0.460	0.489	0.482	0.433	0.441
PBC-094RFB	0.302	0.296	0.295	0.087	0.093	0.093	0.094	0.003	0.460		0.000	0.001	0.320	0.334
PBC-095RFB	0.313	0.298	0.297	0.086	0.089	0.087	0.089	0.001	0.489	0.000		0.001	0.316	0.334
PBC-096RFB	0.316	0.301	0.298	0.089	0.091	0.090	0.091	0.000	0.482	0.001	0.001		0.316	0.325
PBC-099RFB	0.220	0.207	0.215	0.296	0.304	0.300	0.304	0.315	0.433	0.320	0.316	0.316		0.219
JN606589	0.248	0.235	0.232	0.320	0.312	0.310	0.312	0.328	0.441	0.334	0.334	0.325	0.219	

Fonte: Daniela Peralva-Lima, 2015.

9 ANEXOS

ANEXO I – ÁRVORE FILOGENÉTICA DA RELAÇÃO DE ESPÉCIES DE TRICHOCOMACEAE, SEGUNDO PETERSON (2008, p. 209), CONSIDERANDO AS REGIÕES 5.8S rDNA, 28S rDNA E RPB2

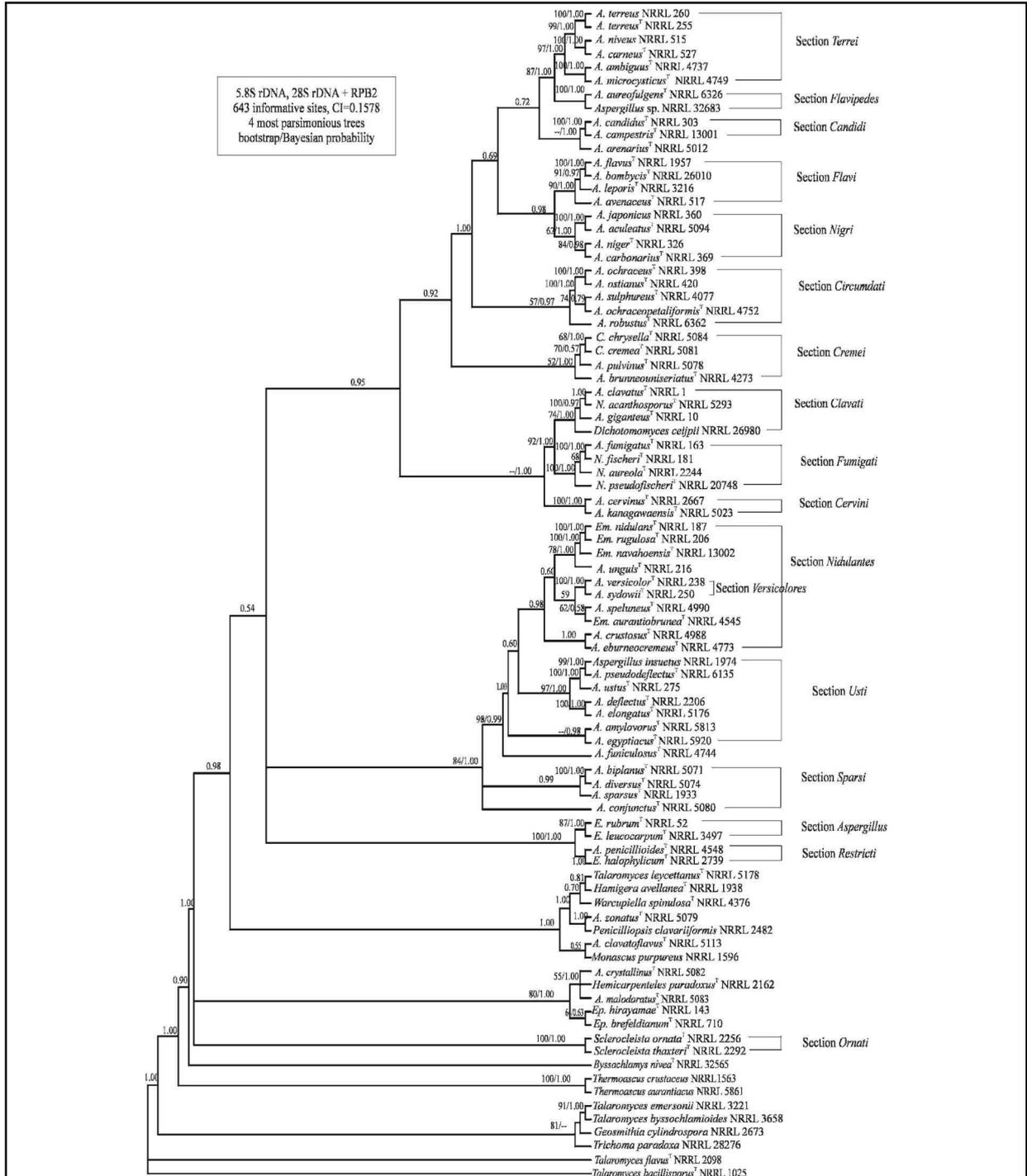


FIG. 2. Bayesian consensus tree depicting the relationship of species from the Trichocomaceae. Tree based on RPB2, 5.8 S and partial 28S rDNA sequences. Numbers at the nodes are the bootstrap value/Bayesian posterior probabilities, type isolates designated by a superscript T, nodes supported at 90% bs and 0.90 pp are double thick. Talaromyces species are present in several distinct basal clades. All Aspergillus species along with Hamigera, Monascus and Eupenicillium species and a single Talaromyces species occur as a monophyletic group with 1.00 posterior probability.

10 REFERÊNCIAS

AGEITEC. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. [Online].; 2013 [cited 2013 setembro 04. Available from: "<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONT000fdyq37cx02wx5a900e1ge5b1sjh62.html>".

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. *Introductory Mycology*. 4th ed. NY: John Wiley & Sons; 1996.

Ali N, Sardjono , Yamashita A, Yoshizawa T. Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumisinins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. *Food additives and contaminants*. 1998: p. 377-384.

Armstrong KF, Ball SL. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2005: p. 1813-1823.

Ashiq S, Hussain M, Ahmad B. Natural occurrence of mycotoxins in medical plants: A review. *Fungal Genetics and Biology*. 2014 may: p. 1-10.

Azevedo JL, Araújo WL, Inácio CA. *Taxonomia: Microbiana, de Procariontes, de Fungos, de Protozoários e de Vírus*. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência, Tecnologia e Inovação; 2005.

Barnes JM. Aflatoxin as a Health Hazard. *Journal of Applied Bacteriology*. 1970; 33: p. 285-298.

Barnett HL, Hunter BB. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3rd ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company; 1972.

Battilani P, Leggieri MC. Predictive modelling of aflatoxin contamination to support maize chain management. *World Mycotoxin Journal*. 2015: p. 161-170.

Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010: p. 99-108.

Bennett JW. An Overview of the Genus *Aspergillus*. [Online].; 2010 [cited 2015 maio 26. Available from: "<http://www.open-access-biology.com/Aspergillus/Aspergillus1.pdf>".

Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003; 16(3): p. 497-516.

Berthiller F, Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*. 2007: p. 33-37.

Beuchat LR, Cousin MA. Yeasts and molds. In Downes PF, Ito K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington DC: APHA; 2001.

Bhatnagar D, Yu J, Ehrlich KC. Toxins of filamentous fungi. *Chemical Immunology*. 2002: p. 167-206.

Bilai VI. The Fusaria (Biology and Systematics). *Publ. Acad. Sci. USSR*. 1955.

_____. Principles of systematics and structure of pathogenic species of the genus *Fusarium*. *Mikrobiologicheskii Zhurnal*. 1978: p. 148-156.

Blandino M, Scarpino V, Vanara F, Sulyok M, Krska R, Reyneri A. Role of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) on contamination of maize with 13 *Fusarium* mycotoxins. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2014.

Boddy L, Coleman M. *From Another Kingdom: The Amazing World of Fungi* Edinburgh: RBG Edinburgh; 2010.

Booth C. *The Genus Fusarium United Kingdom: Commonwealth Mycological Institute*; 1971.

Brandt ME, Kauffman CA, Pappas PG, Iqbal N, Arthington-Skaggs BA, Lee-Yang W, et al. Fungemia caused by *Zygoascus hellenicus* in an Allogenic Stem Cell Transplant Recipient. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004: p. 3363-3365.

BRASIL. Resolução RDC nº7, de 18 de fevereiro de 2011. [Online].

Br-BOL. Brazilian Barcode of Life. [Online]. [cited 2015 abril 8. Available from: "<http://brbol.org/pt-br>".

Bruns T, White T, Taylor J. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 1991: p. 525-564.

Carvalho ECQ. Micotoxinas em alimentos: implicações na saúde humana e animal. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 1995; 2: p. 27-31.

Castellani A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1939: p. 225-226.

CBol Plant Working Group. A DNA barcode of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009: p. 12794-12797.

Cho Y, Qui Y, Kuhlman P, Palmer JD. Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1998: p. 14244-14249.

CiMilho. Centro de Inteligência do Milho. [Online]. [cited 2015 junho 10. Available from: "<http://cimilho.cnpms.embrapa.br/processamento/processamento.php>".

Clare EL, Lim BK, Fenton MB, Hebert PDN. Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. PLoS ONE. 2011: p. e22648.

CoL. Catalogue of Life - Annual checklist. [Online].; 2015 [cited 2015 julho 15. Available from: <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2015/info/totals>.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Importações e Exportações de Arroz, algodão e Milho. [Online].; 2013 [cited 2013 agosto 27. Available from: "<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=546&t=2>" .

_____. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2014/2015 - Terceiro Levantamento - Dezembro 2014. Brasil.; 2014.

Costion C, Ford A, Cross H, Crayn D, Harrington M, Lowe A. Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras. PLoS ONE. 2011: p. e26841.

Covarelli L, Beccari G, Salvi S. Infection by mycotoxigenic fungal species and mycotoxin contamination of maize grain in Umbria, central Italy. Food and Chemical Toxicology. 2011; 49: p. 2365-2369.

Cubero OF, Crespo A, Fatehi J, Bridge PD. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. Plant Systematics and Evolution. 1999: p. 243-249.

Deguilloux MF, Pemonge MH, Petit RJ. Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. Proceedings of The Royal Society of London Series B. 2002: p. 1039-1046.

Dentinger BTM, Didukh MY, Moncalvo JM. Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina). PLoS ONE. 2011: p. e25081.

Desjardins A, Maragos C, Norred W, Pestka J, Phillips T, Vardon P, et al. Mycotoxins: risks in plant, animal, and humans systems Ames, Iowa, USA: CAST; 2003.

Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 1990: p. 13-15.

Eaton MJ, Meyers GL, Kolokotronis SO, Leslie MS, Martin AP, Amato G. Barcoding bushmeat molecular identification os Central African and South American harvested vertebrates. Conservation Genetics. 2010: p. 1389-1404.

EMBRAPA. Doenças na Cultura do Milho. Circular Técnica 83. Sete Lagoas: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; 2006.

_____. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. [Online].; 2012a [cited 2015 janeiro. Available from: "https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemaasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-3&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=3821&p_r_p_-996514994_topicold=3"

_____. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. [Online].; 2012b [cited 2015 maio 14. Available from: "https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemaasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=3821&p_r_p_-996514994_topicold=1".

FIB. Food Ingredients Brasil. [Online].; 2009 N.07 [cited 2015 maio 14. Available from: "<http://www.revista-fi.com/materias/90.pdf>".

Fitzpatrick DA. Horizontal gene transfer in fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 2012: p. 1-8.

Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*. 1929: p. 226-236.

Footitt RG, Maw HEL, Von Dohlen CD, Hebert PDN. Species identification of aphids (Insecte: Heniptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*. 2008: p. 1189-1202.

Frackman S, Kobs G, Simpson D, Storts D. Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. *Promega Notes*. 1998; 65.

Friesen TL, Stukenbrock EH, Liu Z, Meinhardt S, Ling H, Faris JD, et al. Emergence of a new disease as a result of interespecific virulence gene transfer. *Nature Genetics*. 2006: p. 953-956.

Frisvad JC, Samsom RA. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* - a guide to identification of food and air-borne terverticillate penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology*. 2004: p. 1-173.

Gallo A, Bertuzzi T, Giuberti G, Moschini M, Bruschi S, Cerioli C, et al. New assessment based on the use of principal factor analysis to investigate corn silage quality from nutritional traits, fermentation end products and mycotoxins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015.

Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samsom RA. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 2007: p. 1-10.

Gene Link. PCR Additives & Enhancers V5.1. Certificate of Analysis & Product Manual. [Online]. [cited 2015 julho 15. Available from: <http://www.genelink.com/geneprodsite/category.asp?c=176>.

GENEIOUS. Version 6.1 created by Biomatters. [Online]. [version 6.1]. Available from: "<http://www.geneious.com>".

Gerlach W, Nirenberg H. The genus *Fusarium* - A pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesansalt*. 1982: p. 1-405.

Gil LA. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science and Technology*. 2007: p. 558-566.

Gilmore SR, Gräfenhan T, Loui-Seize G, Seifert KA. Multiple copies of cytochrome oxidase I in species of the fungal genus *Fusarium*. *Molecular Ecology Research*. 2009: p. 90-98.

Giraud F, Giraud T, Aguilera G, Fournier E, Samson R, Cruaud C, et al. Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. *International Journal of Food Microbiology*. 2010: p. 204-213.

Goldschmied RA, Friedman AJ, Block CS. *Fusarium* spp. isolated from non-ocular sites: a 10 year experience at an Israeli general hospital. *Journal of Mycologie Medicale*. 1993: p. 99-102.

Gomes EA, Kasuya MCM, Barros E G, Borges AC. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetic Molecular Biology*. 2002: p. 477-483.

González HHL, Martínez EJ, Pacin AM, Resnik SL, Sydenham EW. Natural co-occurrence of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins in field trial corn in Argentina. *Food Additives and Contaminants*. 1999: p. 565-569.

Groenewald JZ. Update on fungal DNA barcoding campaigns. *Persoonia*. 2009

Guarro J, Gene J, Stchigel AM. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999: p. 454-500.

Hara S, Kitamoto K, Gomi K. New developments in fermented beverages and foods with *Aspergillus*. In Bennett JW, Klich MA, editors. *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*. Boston; 1992. p. 133-153.

Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2005: p. 968-971.

Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*. 2007.

Han Z, Tangni EK, Huybrechts B, Munaut F, Scauflaire J, Wu A, et al. Screening survey of co-production of fusaric acid, fusarin C, and fumonisins B1, B2 and B3 by *Fusarium* strains grown in maize grains. *Mycotoxin Research*. 2014: p. 231-240.

Hawksworth DL. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in Mycology*. 2004: p. 9-18.

Hawksworth DL, Rossman AY. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology*. 1997: p. 888-891.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*. 2003a: p. 313-321.

Hebert PDN, deWaard JR, Landry JF. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology Letters*. 2010: p. 359-362.

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcode reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004a: p. 14812-14817.

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcode animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 2003b: p. S96-S99

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS ONE*. 2004b: p. e312.

Hiruma M, Cho O, Hiruma M, Kurakado S, Suqita T, Ikeda S. Genotype analyses of human commensal scalp fungi, *Malassezia globosa*, and *Malassezia restricta* on the scalps of patients with dandruff and healthy subjects. *Mycopathologia*. 2014: p. 263-269.

Hofreiter M, Poinar HR, Spaulding WG, Bauer K, Martin PS, Possnert G, et al. A molecular analysis of ground sloth diet through the last glaciation. *Molecular Ecology*. 2000: p. 1975-1984.

Hollingsworth PM. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Research*. 2009: p. 439-457.

Hussain Z, Martin A, Youngberg GA. *Blastomyces dermatitidis* with large yeast forms. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2001: p. 663-664.

Hussein S, Brasel JM. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 2001;: p. 101-134.

IARC. Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Vol. 82 Lyon: World Health Organization; 2002.

_____. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Vol. 56: World Health Organization; 1993.

Index Mundi. Agricultural commodities. [Online].; 2014 [cited 2015 maio 14. Available from: "<http://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=corn&graph=production>".

INSPQ. Institut National de Santé Publique. [Online]. [cited 2015 jul 8. Available from: "<https://www.inspq.qc.ca>".

International Mycological Association. Mycobank Database. [Online].; 2015 [cited 2015 maio 15. Available from: "www.mycobank.org" .

Ioakimidou A, Vyzantiadis TA, Tragiannidis A, Arabatzis M, Papageorgiu T, Velegraki A, et al. *Candida hellenica* var. *hellenica* as a possible cause of respiratory infection in a child with acute myeloid leukemia. *Medical Mycology*. 2011: p. 771-774.

James T Y, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using six-gene phylogeny. *Nature*. 2006: p. 818-822.

Jarman SN, Elliot NG. DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciation in the Anaspididae, 'living fossils' from the Triassic. *Journal of Evolutionary Biology*. 2000: p. 624-633.

JICA. Mycotoxin inspection in food Hyogo International Centre: Japan International Cooperation Agency; 1993.

Jobim CC, Gonçalves GD, Santos GT. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas "versus" desempenho animal e qualidade de seus produtos. *Anais do Simpósio sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas*. 2001;: p. 242-261.

Joffe AZ. *Fusarium species: Their Biology and Toxicology* New York: John Wiley and Sons; 1986.

Kendrick B. *Fungi: Importance and Impact on Humans*. eLS. John Wiley & Sons Ltd. 2011.

Kistler HC. Evolution of host specific in *Fusarium oxysporum*. In Bryden WL, Burgess LW, editors. *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. Minnesota; 2001. p. 70-96.

Klich MA. *Identification of common Aspergillus species* Wageningen: Centralbureau voor Schimmelcultures; 2002.

Knowlton N. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1993: p. 189-216.

Kozakiewicz Z. *Aspergillus species on stored products*. *Mycological Papers*. 1989: p. 1-188.

Kress WJ, Erickson DL. A two-locus global DNA barcode for land plant: the coding *rbcl* gene complements the non coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*. 2007: p. e508.

Kuiper-Goodman T. *Mycotoxins: risk assessment and legislation*. *Toxicology Letters*. 1995;: p. 853-859.

Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998: p. 331-371.

Lange L, Bech L, Busk PK, Grell MN, Huang Y, Lange M, et al. The importance of fungi and mycology for a global development of the bioeconomy. *IMA Fungus*. 2012 Jun: p. 87-92.

Lázzari FA. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. 2nd ed. Curitiba: Ed. do Autor; 1997.

Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium Laboratory Manual*: Wiley-Blackwell; 2006.

Leslie JF, Zeller K, Lamprecht S, Rheeder JP, Marasas WFO. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation in five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology*. 2005: p. 275-283.

Levin NA. *Beyond Spaghetti and Meatballs: Skin Diseases Associated With the Malassezia Yeasts*. *Dermatology Nursing*. 2009.

Lewis CT, Bilkhu S, Robert V, Eberhardt U, Szoke S, Seifert KA, et al. Identification of Fungal DNA barcode targets and PCR primers based on Pfam protein families and taxonomic hierarchy. *The open Applied Informatics Journal*. 2011: p. 30-44.

Lewis L, Onsongo M, Njapau H, Schurz-Rogers H, Lubber G, Kieszak S, et al. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspectives*. 2005: p. 1763-1767.

Link HF. *Observations in Ordines plantarum naturales*. *Dissertatio 1ma*. *Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin*. 1809: p. 3-42.

Lorini I, Bacaltchuk B. A qualidade desejada na armazenagem de grãos no país. *A lavoura*. 2009 fev.: p. 30-31.

Lowe AJ, Cross HB. The application of DNA to Timber Tracking and Origin Verification. *International Association of Wood Anatomists*. 2011: p. 251-262.

Ludemann V, Greco M, Rodríguez MP, Basílico JC, Pardo AG. Conidial production by *Penicillium nalgiovense* for use as starter cultures in dry fermented sausages by solid state fermentation. *LWT - Food Science and Technology*. 2010: p. 315-318.

Machinski JR, Valente-Soares LM, Sawasaki E, Bolonhesi D, Castro JL, Bortoletto N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. *Journal of the science of food and agriculture*. 2001: p. 1001-1007.

Mahé S, Duhamel M, Calvez TL, Guillot L, Sarbu L, Bretaudeau A, et al. PHYMYCO-DB: A Curated Database of Analyses of Fungal Diversity and Evolution. *PLoS ONE*. 2012: p. e43117.

Mallmann AO, Marchioro A, Oliveira MS, Rauber RH, Dilkin P, Mallmann CA. Comparison of the efficiency between two sampling plans for aflatoxins analysis in maize. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014: p. 35-42.

Mansfield MA, Jones AD, Kuldau GA. Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins. *Postharvest Pathology and Mycotoxins*. 2008: p. 330-336.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. [Online].; 2015 [cited 2015 maio 12]. Available from: "<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>" .

Márcia BA, Lázari FA. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 1998 Out: p. 363-367.

Martin KJ. Introduction to molecular analysis of ectomycorrhizal communities. *Soil Science Society of America Journal*. 2007: p. 601-610.

Matuo T. Taxonomic studies of phytopathogenic fungi in Japan. *Review of Plant Protection Research*. 1972: p. 34-45.

Maziero MT, Bersot LS. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 2010: p. 89-99.

McLaughlin DJ, Hibbett DS, Lutzoni F, Spatafora JW, Vilgalys R. The search for the fungal tree of life. *Trends Microbiology*. 2009: p. 488-497.

Medina A, Rodriguez A, Magan N. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Frontiers in Microbiology*. 2014: p. 1-7.

Messiaen CM, Cassini R. Recherches sur la fusarioses IV La systématique des *Fusarium*. *Annals Epiphyt*. 1968: p. 387-454.

Micheli PA. *Nova Plantarum genera* Florence, Italy; 1729.

Michielse CB, Rep M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*. 2009: p. 311-324.

Miller SE. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007: p. 4775-4776.

Miller JD. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *Journal of Stored Products research*. 1995: p. 1-16.

Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissue. *Nucleic Acids Research*. 1992: p. 6115-6116.

Moraes AML, Paes RA, Holanda VL. Micologia. In Instituto Oswaldo Cruz. *Conceitos e Métodos para a formação de Profissionais em Laboratório de Saúde: Volume 4*. Rio de Janeiro: EPSJV/IOC; 2010. p. 399-496.

Nagy ZT, Sone G, Glaw F, Vences M. First Large-Scale DNA Barcoding Assessment of Reptiles in the Biodiversity Hotspot of Madagascar, based on newly designed COI primers. PLoS ONE. 2012: p. e34506.

Nahum LA. Evolução dos Genomas. In Matioli SR, Fernandes FMCF. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos; 2012. p. 91-104.

Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. *Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification* Pennsylvania: Pennsylvania State University Press; 1983.

O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1997: p. 103-116.

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998: p. 2044-2049.

O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetic distinct species. *Mycoscience*. 2000: p. 61-78.

O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCornick SP, Ward TJ, et al. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology*. 2013: p. 20-31.

O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J Clin Microbiol*. 2008 Aug: p. 2477-2490.

O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Magnon KC, Cox PA, Revankar SG, et al. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: Evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal [..]. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004: p. 5109-5120.

O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Sarver BAJ, Balajee SA, Schroers HJ, et al. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010: p. 3708-3718.

Paes MCD. *Aspectos físicos, Químicos e tecnológicos do Grão de Milho*. Sete Lagoas, MG; 2006.

Palmer JD, Herbon LA. Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. *Journal of Molecular Evolution*. 1988: p. 87-97.

Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JC, et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*. 2007: p. 53-66.

Peske ST. Seed News. [Online].; 2014 [cited 2015 maio 14. Available from: "http://www.seednews.inf.br/_html/site/content/reportagem_capa/index.php?edicao=92".

Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*. 2008: p. 205-226.

Pitt JI. A Laboratory Guide to common *Penicillium* species New South Wales: North Ryde; 2000.

Pitt JI, Hocking AD. *Aspergillus and Related Teleomorphs*. 3rd ed.: Springer US; 2009.

_____. *Fungi and Food Spoilage*. 2nd ed. Maryland: Aspen; 1999.

Pitt JI, Leistner L. Toxigenic *Penicillium* species. In Smith JE, Henderson RS, editors. *Mycotoxins and animal foods*. Londres: CRC Press, 1991 p. 82-99.

Prado G. Contaminação de alimentos por micotoxinas no Brasil e no mundo. *Revista de Saúde Pública do SUS/MG*. 2014: p. 11-24.

Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G. ABGD, Automatic Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*. 2012: p. 1864-1877.

Raillo A. *Fungi of the genus Fusarium* Moscow: Pub. State Agr. Lit.; 1950.

_____. Systematics and methods for the determination of the species of the genus *Fusarium*. *Acta Bot. Inst. Acad. Sciences USSR Series 2*. 1936: p. 803-857.

Raper KB, Thom C. *A manual of the penicillia* Baltimore: The Williams & Wilkins Company; 1949.

Raper KB, Fennel DI. *The Genus Aspergillus* Baltimore: Williams & Wilkins; 1965.

Ratnasingham S, Hebert PDN. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE*. 2013: p. e66213.

Resanovic RD, Vucicevic MZ, Nedeljkovic JB, Maslic-Strizak DN, Jacevic VM. Mycotoxins and their effect on human health. *Journal of Natural Science*. 2013;: p. 315-324.

Resnik SL. *Prevencion y control de las micotoxinas durante la cadena de postcosecha*. Buenos Aires; 1993.

Rocha MEB, Freire FCO, Maia FEF, Guedes MIF, Rondina D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*. 2014: p. 159-165.

Rodriguez-Amaya DB, Sabino M. Mycotoxyn research in Brazil: the last decade in review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2002: p. 1-11.

Ryan KJ, Ray CG. *Sherris medical microbiology* New York: McGraw-Hill; 2004.

Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC. *Introduction to Food-and Airborne Fungi*. 7th ed. The Netherlands: CBS; 2004.

Samsom RA, Varga J. What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology*. 2009: p. 13-20.

Sangeetha J, Thangadurai D. Staining Techniques and Biochemical Methods for the Identification of Fungi. In Gupta VK, Tuohy MG, Ayyachamy M, Turner KM, O'Donovan A, editors. *Laboratory Protocols in Fungal Biology - Current Methods in Fungal Biology*.: Springer New York; 2013. p. 237-257.

Schoch C, Seifert K, Crous P. Progress on DNA BARcoding of Fungi. *IMA Fungus - Reports*. 2011: p. 5-6.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012: p. 6241-6246.

Scudamore KA, Patel S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumisinins in maize imported into the United Kingdom. *Food Additives and Contaminants*. 2000: p. 407-416.

Seifert KA, Samsom RA, deWaard JR, Houbraken J, Lévesque CA, Moncalvo JM, et al. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2007: p. 3901-3906.

Shephard GS. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Additives and Contaminants: Part A*. 2008 February: p. 146-151.

Skouboe P, Frisvad JC, Taylor JW, Lauritsen D, Boysen M, Rossen L. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycological Research*. 1999: p. 873-881.

Smith MA, Poyarkov NAJ, Hebert PDN. DNA BARCODING: CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Molecular Ecology Resources*. 2008: p. 235-246.

Smith MA, Wood DM, Jansen DH, Hallwachs W, Hebert PDN. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *Proceedings of The National Academy of Sciences*. 2007: p. 4967-4972.

Snyder WC, Hansen HN. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*. 1940: p. 64-67.

_____. The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *American Journal of Botany*. 1945: p. 657-666.

_____. The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*. *American Journal of Botany*. 1941: p. 738-742.

_____. Variations and speciation in the genus *Fusarium*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1954: p. 16-23.

Stajich JE, Berbee ML, Blackwell M, Hibbett DS, James TY, Spatafora JW, et al. The Fungi. *Current Biology*. 2009: p. R840-5.

Stevens AJ, Saunders CN, Spence JB. Investigations into "disease" of turkey poult. *The Veterinary Record*. 1960; 72(31): p. 627-628.

Summerell BA, Salleh B, Leslie JF. An utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant disease*. 2003: p. 117-128.

Terrasan CR, Temer B, Duarte MC, Carmona EC. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. *Bioresource Technology*. 2012: p. 4139-4143.

Terzi V. Reducing the incidence of cereal head infection and mycotoxins in small grain cereal species. *Journal of Cereal Science*. 2014: p. 284-293.

Thom C, Church MB. *The Aspergilli*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1926.
Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 8th ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.

Tsui CKM, Woodhall J, Chen W, Lévesque A, Lau A, Schoen CD, et al. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. *IMA Fungus*. 2011: p. 177-189.

USDA. Production, Supply and Distribution. [Online].; 2015 [cited 2015 maio 13]. Available from: "<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>" .

Van der Westhuizen L, Shephard GS, Scussel VM, Costa LLF, Vismer HF, Rheeder JP, et al. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003: p. 5574-5578.

Van der Wiel CCM, Van der Schoot J, Van Valkenburg JLCH, Duistermaat H, Smulders JM. DNA barcoding discriminates the noxious invasive plant species, floating pennywort (*Hydrocotyle ranunculoides* L.f.), from non-invasive relatives. *Molecular Ecology Resources*. 2009: p. 1086-1091.

Varga J, Juhász A, Kevei F, Kozakiewicz Z. Molecular diversity of agricultural important *Aspergillus* species. *European Journal of Plant Pathology*. 2004: p. 627-640.

Visagie CM, Hirooka Y, Tanney JB, Whitfield E, Mwange K, Meijer M, et al. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from in house dust samples collected around the world. *Studies in Mycology*. 2014a: p. 63-139.

- Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, Klaassen CHW, Perrone G, et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*. 2014b: p. 343-371.
- Von Arx JA. *The Genera of Fungi Sporulating in pure culture*. 2nd ed. Vaduz: J. Cramer; 1974.
- Wang XC, Liu C, Huang L, Bengtsson-Palme J, Chen H, Zhang JH, et al. ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Molecular Ecology Resources*. 2015: p. 573-586.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions Royal Society B*. 2005: p. 1847-1857.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-322.
- Wollenweber HW, Reinking OA. *Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung* Berlin: Verlag Paul Parey; 1935.
- Wong EHK, Hanner RH. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International*. 2008: p. 828-837.
- Woods GL, Walker DH. Detection of infection or infectious agents by use of cytologic and histologic stains. *Clinical Microbiology reviews*. 1996: p. 382-404.
- Xie J, Fu Y, Jiang D, Li G, Huang J, Li B, et al. Intergeneric Transfer of ribosomal genes between two fungi. *BMC Evolutionary Biology*. 2008.
- Yang ZB, Wan XL, Yang WR, Jiang SZ, Zhang GG, Johnston SL, et al. Effects of naturally mycotoxins-contaminated corn on nutrient and energy utilization of ducks fed diets with or without Calibrin-A. *Metabolism and Nutrition*. 2014: p. 2199-2209.
- Yoo HH, Eah JY, Kim JS, Kim YJ, Min MS, Paek WK, et al. DNA Barcoding Korean Birds. *Molecules and Cells*. 2006: p. 323-327.
- Yu KF, van Deynze A, Paulus KP. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In Glick BR, editor. *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. Boca Raton: CRC Press; 1993. p. 287-301.
- Zain ME. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2011 april: p. 129-144.
- Zhao P, Luo J, Zhuang W, Liu X, Wu B. DNA barcoding of the fungal genus *Neonectria* and the discovery of two new species. *Science China Life Science*. 2011: p. 664-674.
- Zhu ZX, Zeng ZQ, Zhuang WY. Selection of a supplementary DNA barcode for the genus *Trichoderma* (Hypocreales, Ascomycota). *Mycosystema*. 2014: p. 1253-1262.