



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO DA VARIABILIDADE DE *Aspergillus flavus*
Link. ASSOCIADO A AMÊNDOAS DA CASTANHEIRA
DO BRASIL (*Bertholletia excelsa* BONPL.) DA REGIÃO
AMAZÔNICA**

MANAUS-AM

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

ESTUDO DA VARIABILIDADE DE *Aspergillus flavus*
Link. ASSOCIADO A AMÊNDOAS DA CASTANHEIRA
DO BRASIL (*Bertholletia excelsa* BONPL.) DA REGIÃO
AMAZÔNICA

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia/Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Agroflorestal.

Orientador: Rogério Eiji Hanada

Co-Orientador: Daniela Bittencourt

Renata Maria Leite Castellões Mesquita

Manaus

2012

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Mesquita, Renata Maria Leite Castellões

M582e Estudo da variabilidade de *Aspergillus flavus* Link. associado a amêndoas da castanheira do brasil (*Bertholletia excelsa* BONPL.) da região amazônica / Renata Maria Leite Castellões Mesquita. - Manaus: UFAM, 2012.

62 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientador: Rogério Eiji Hanada

Co-orientadora: Daniela Bittencourt

1. Castanha-do-brasil 2. Marcadores microssatélites 3. *Aspergillus flavus* I. Hanada, Rogério Eiji (Orient.) II. Bittencourt, Daniela (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 597.554.1(043.3)



63ª. ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

No dia 28 de setembro de 2012 às 14h, no Auditório da Biotecnologia, Bloco "M" Setor Sul - UFAM. Renata Maria Leite Castellões Mesquita defendeu sua Dissertação de Mestrado intitulada "Estudo da Variabilidade de *Aspergillus flavus* link. Associado a Amêndoas da Castanheira do Brasil (*Bertholletia excelsa* BONPL) da Região Amazônica".

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dr. Rogério Eiji Hanada - INPA	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dr. Gilvan Ferreira da Silva - EMBRAPA	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dra. Rozana de Medeiros Sousa Galvão - UFAM	Aprovado (X) Reprovado ()	

Manaus, 28 de Setembro de 2012.

Resultado Final: Aprovado (X)
Reprovado ()

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

Prof. Dr. Edmar Vas de Andrade
Coordenador

Coordenador do PPGBIOTEC

Obs: A Banca sugere que a aluna refaça a redação de sua dissertação no prazo de 30 dias.

À Vera e Frederico pelo amor incondicional

Dedico.

Agradecimentos

Aos meus pais, Vera e Frederico que acreditaram e não deixaram desistir;

Às minhas irmãs Simone e Priscilla por me apoiarem mesmo de longe;

Aos meus tios Rosilene Andrade Leite Tucci (Tia Rose) e Carlos Alberto Franco Tucci pela paciência e por serem como meus pais;

Ao meu orientador Dr. Rogério Eiji Hanada pela paciência e por acreditar que conseguiria realizar o trabalho;

À Dra. Daniela Bittencourt pela orientação, apoio e financiamento da estadia em Brasília;

Ao Peter Inglis pela orientação e paciência;

À Dra. Vânia Renoó pelas orientações e disponibilizar o laboratório para desenvolver parte de meu trabalho;

Ao Dr. Robert Miller pelas orientações, sugestões e paciência;

Glaúcia pelas orientações e por tornar minha estadia em Brasília, mais que um trabalho;

À Embrapa Amazônia Ocidental e Embrapa Recursos Genéticos (Brasília), Universidade de Brasília e Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas;

À todos do Laboratório de Genética Vegetal (Cenargen), Laboratório de Fitopatologia do INPA;

Ao programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas por todo conhecimento adquirido;

Agradeço aos amigos Manauaras que conquistei nesta longa etapa da minha vida.

À CAPES pela bolsa de estudo, meu muito obrigada!

Resumo

A Castanha-do-brasil é um importante produto comercial da região norte do Brasil, entretanto esta vem sofrendo embargos na exportação devido aos altos níveis de aflatoxinas presente em lotes comercializados. A espécie de fungo considerada mais importante na produção destas micotoxinas é o *Aspergillus flavus*. No intuito de fornecer subsídios para o desenvolvimento de uma estratégia eficiente para a detecção de *A. flavus* aflatoxigênicos, que irá contribuir extremamente para o controle da qualidade da Castanha-do-brasil, pretendeu-se neste trabalho estudar a diversidade genética de fungos *A. flavus* isolados de amêndoas provenientes de diferentes municípios do estado do Amazonas e Acre. Para isso foram utilizados marcadores moleculares microsatélites (SSR), os quais tem se mostrado eficientes no estudo de variabilidade genética entre indivíduos e entre populações. Foram selecionados 100 isolados do gênero *Aspergillus*, e para identificação da espécie foi realizado o sequenciamento e análise da região ITS do rDNA. Ao total foram identificados 32 *Aspergillus nomius*, 49 *Aspergillus flavus*, 16 *Aspergillus tamarii* e 1 *Aspergillus fumigatus*. No estudo da variabilidade genética foram utilizados 12 marcadores SSR selecionados da literatura desenvolvidos especificamente para a espécie de *A. flavus*. Dois grupos de isolados de *A. flavus* foram formados de acordo com a origem da castanha (Humaitá/AM e Acre), e um terceiro grupo previamente isolado de castanhas adquiridas em feiras na cidade de Belém/PA também foram incluídos no estudo, totalizando 86 indivíduos. Dez dos doze marcadores utilizados foram eficientes na amplificação da PCR. Com o resultado verificou-se que todos os 10 *locus* analisados foram polimórficos, e a partir dos 86 indivíduos analisados foram identificados 118 alelos com amplicons variando entre 110 a 390 pares de base. O número de alelos variou de 8-16 por *locus*, com a média de 11,7. Ao realizar a análise estatística o valor médio da diferenciação gênica (GST) foi de 0,099, representando uma baixa variação genética entre os grupos analisados. Já a diversidade gênica dentro dos grupos foi responsável por 85,9% da diversidade genética total, indicando maior variabilidade dentro dos grupos. O coeficiente de similaridade utilizado para calcular a distância genética entre os 86 isolados variou de 0,7 a 1,0 com uma média de 0,96. A distância genética também foi calculada entre as populações e variaram de 0,562 a 0,7287. Assim conclui-se que os isolados apresentaram grande polimorfismo entre eles, sendo que a maior variabilidade ocorreu dentro do grupo (85,5%), enquanto que a diversidade entre os grupos estudados foi de 14,5%. De acordo com os resultados obtidos os agrupamentos formados pela análise da variabilidade genética de *A. flavus* utilizando marcadores SSRs, não apresentou correlação com a origem dos isolados.

Palavras-chave: Castanha-do-brasil; marcadores microsatélites; *Aspergillus flavus*.

Abstract

Brazil nuts are an important commercial product of northern Brazil, however this product has been rejected by the international market due to high levels of aflatoxin contamination. The fungus considered more important in the production of these mycotoxins is *Aspergillus flavus*. In order to provide data for the development of an efficient strategy for the detection of aflatoxigenic *A. flavus*, which will contribute greatly to the quality control of the Brazil nuts, this main scope of this work was to study the genetic diversity of the fungi *A. flavus* isolated from almonds produced by different regions of Amazon. For this we have used microsatellite markers (SSR) which have proven to be effective for the study of genetic diversity between individuals and populations. We have selected 100 isolates of *Aspergillus* sp., and species identification was performed by sequencing the rDNA ITS region. It was identified 32 *Aspergillus nomius*, 49 *Aspergillus flavus*, 16 *Aspergillus tamaritii* and 1 *Aspergillus fumigatus*. In the study of genetic diversity was used 12 SSR markers developed specifically for the species *A. flavus* and selected from the literature. Two groups of isolates of *A. flavus* were formed according to the origin of Brazil nuts (Humaitá / AM and Acre), and a third group isolated from nuts previously acquired in trade fairs in Belém / PA were also included in the study, totaling 86 individuals. Ten of the twelve markers used were efficient in PCR amplification. According to the result all the 10 loci studied were polymorphic, and from the 86 individuals analyzed 118 alleles were identified ranging from 110-390 base pairs. The number of alleles per locus ranged from 8-16 with a mean of 11.7. The statistical mean value for genetic differentiation (G_{st}) was 0.099, which represents a low genetic variation between the groups. However, the genetic diversity within groups accounted for 85.9% of the total genetic diversity, indicating a greater variability within groups. The coefficient of similarity was used to estimate the genetic distance between the 86 *A. flavus*, it ranged from 0.7 to 1.0 with an average of 0.96. The genetic distance was also calculated between populations and ranged from 0.562 to 0.7287. Thus it is concluded that the isolates showed high polymorphism among them, however a greater variability was found within the groups (85.5%), while diversity among the groups was only 14.5%. And according to the groups formed by genetic diversity analysis of *A. flavus* using SSRs markers, there was no correlation with the origin of the isolates.

Key words: Brazil nut; microsatellites markers; *Aspergillus flavus*.

Listas de Figuras

Figura 1 <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl.	15
Figura 2 Fruto da castanheira aberto.	16
Figura 3 Produção de castanha-do-brasil em toneladas nos anos 2008, 2009, 2010, dados IBGE.	17
Figura 4 Quantidade de castanha-do-brasil exportada com e sem casca pela Bolívia e Brasil no período de 1990-2009 (Adaptado dados FAO, 2012).	19
Figura 5 Colônia de <i>A. flavus</i> com 18 dias de crescimento.	26
Figura 6 Região ITS ribossomal, apresentando os primers mais utilizados para o sequenciamento.	27
Figura 7 Câmara úmida montada com cinco castanhas.	32
Figura 8 Imagem microscópica (40x) de três isolados identificados. 1 - <i>A. flavus</i> ; 2 - <i>A. nomius</i> ; 3 - <i>A. tamarii</i>	42
Figura 9 Gel de agarose mostrando a amplificação realizada com os primers ITS5 e ITS4. Os números seguidos de letras acima dos poços representam os isolados de Humaitá e a letra M o marcador utilizado (M = 1kb DNA ladder). .	43
Figura 10 Cladograma mostrando as relações filogenéticas entre as sequências da região ITS dos isolados de <i>Aspergillus</i> através da análise de Inferência Filogenética Bayesiana. Os valores da probabilidade posterior são indicados nos ramos e barra da escala indica o número de substituições esperadas por site.	46
Figura 11 Perfil do marcador microssatélite para isolados de <i>Aspergillus flavus</i> F1 ao F34, gerados com o primer AF-31. Os números acima dos poços do gel indicam o isolado. A letra M indica o marcador 1Kb plus DNA ladder.	48
Figura 12 Dendograma construído a partir da matriz de distância genética (Cavalli-Sforza, 1994), com base no método UPGMA (Sokal e Michener, 1958). A reconstrução filogenética foi realizada com Dambe 5.0.86 (Xia, 2001; Xia e Xie, 2001).	55
Figura 13 Dendograma construído a partir da distância genética dos grupos de isolados de <i>A. flavus</i> de acordo com a origem da castanha (F = feira, H = Humaitá, AC = Acre).	56

Lista de Tabelas

- Tabela 1** Sequências dos iniciadores da região ITS do rDNA. 36
- Tabela 2** Iniciadores SSR utilizados para o estudo da variabilidade genética de *A. flavus*..... 39
- Tabela 3** Identificação molecular da espécie e origem de 98 isolados estudados. As letras acompanhadas dos números foram utilizadas para separar os isolados por origem das castanhas (AC - Acre, H – Humaitá(AM), M – Manicoré(AM), I – Itacoatiara(AM), C – Caroebe(RR)..... 45
- Tabela 4** Número de alelos amostrados por grupos, onde Feira foram amostras isoladas de castanhas originárias de Belém, (Pará) feira, H castanhas coletadas em Humaitá (AM) e AC provenientes do Acre. 48
- Tabela 5** Número de alelos (N) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) estimado para locus microssatélites, obtidos de informações genéticas de 86 amostras de *A. flavus*..... 49
- Tabela 6** Análise estatística G (Nei,1987), para cada locus analisado. 52

Sumário

INTRODUÇÃO	11
1 REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1 Castanha-do-brasil.....	14
1.2 <i>Aspergillus flavus</i>	19
1.3 Micotoxinas	21
1.4 Aflatoxinas.....	23
1.5 Métodos de Identificação de <i>A. flavus</i>	25
1.5.1 Marcadores morfológicos	25
1.5.2 DNA ribossomal nuclear (rDNA).....	26
1.6 Marcadores moleculares Microssatélites.....	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos específicos	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Coleta das castanhas	31
3.2 Isolamento dos fungos	31
3.3 Identificação macroscópica e microscópica dos fungos isolados ..	33
3.4 Extração de DNA	35
3.5 Identificação molecular da espécie	36
3.5.1. Sequenciamento e análise da região ITS.....	37
3.6 Amplificação do DNA utilizando Marcadores Microssatélites (SSR)	38
3.7 Genotipagem	40
3.7.1 Análise dos dados da genotipagem	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	42

4.1 Identificação morfológica dos isolados.....	42
4.2 Identificação Molecular do <i>A. flavus</i>	43
4.3 Estudo da diversidade genética de <i>A. flavus</i> com marcadores microsatélites	47
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

INTRODUÇÃO

A Amazônia Brasileira é o maior repositório de espécies frutíferas do Brasil, na região são encontradas aproximadamente 220 espécies de plantas produtoras de frutos comestíveis, o que representa 44% da diversidade de frutas nativas do Brasil (Freitas-Silva e Venâncio, 2010). Dentre estas espécies podemos citar a castanheira (*Bertholletia excelsa* BONPL.), uma árvore amazônica que chega a uma altura de 60 metros presente quase sempre em locais de difícil acesso, com dispersão natural abrangendo desde o alto Orinoco até o alto Beni, onde estão inclusos a Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia e Guianas (Filocreão, 2008). Tem frutificação no período de janeiro a abril, sendo os frutos recolhidos após a queda natural. O fruto da castanheira, denominado pixídio ou ouriço, possui casca espessa, lenhosa e dura, com peso variável. Contém de 12 a 25 sementes que após a remoção da casca é denominada castanha ou amêndoa, também conhecida como castanha-do-brasil ou castanha do Pará (Oishi, 2007).

Após a decadência da extração da borracha, a castanha-do-brasil passou a constituir o principal produto extrativista para a exportação da região norte do Brasil, na categoria de produtos básicos. Por ser um produto extrativista é considerada orgânica e sua extração ambientalmente correta, já que não são utilizados defensivos químicos para o controle de pragas, plantas daninhas ou adubação, reduzindo assim os perigos químicos comuns aos produtos cultivados (Souza, 2004; Pimentel et al., 2010). De acordo com dados do IBGE o Brasil produziu no ano de 2010 40.357 toneladas de castanha-do-brasil mantendo a tendência de crescimento dos últimos três anos. O principal

produtor foi o estado do Amazonas com uma produção de 16.039 toneladas, seguido pelos estados do Acre (12.362 toneladas) e Pará (8.128 toneladas).

Embora a castanha-do-brasil seja um produto extrativista que emprega cerca de quatro mil famílias, as práticas de manejo desta espécie são precárias, com os ouriços sendo abertos na floresta favorecendo a contaminação das amêndoas por fungos e coliformes. Ainda no local da coleta, as castanhas são selecionadas por imersão em água, o que pode aumentar a incidência de infecção fúngica nas mesmas devido ao aumento da sua umidade. Os problemas se agravam com os manejos subsequentes, como armazenamento, transporte, entre outros (Okida, 2009). Devido ao baixo nível tecnológico de sua cadeia produtiva, os níveis de contaminação das castanhas-do-brasil por micotoxinas aumentaram nas últimas décadas. Produzidas principalmente pelo fungo *Aspergillus flavus* Link., e denominadas aflatoxinas (B1, B2, G1, G2), estas são hepato-tóxicas e podem causar o desenvolvimento de tumor se consumidas em pequenas quantidades por um longo período (Pacheco e Scussel, 2006).

Até a década de 90, o mercado mundial da castanha-do-brasil era dominado pelo Brasil. Entre os anos de 1986 a 1990, o Brasil era responsável por uma média de 74% da exportação, seguido pela Bolívia (13%), Peru (9%) e por outros países que em conjunto cobriam apenas 4% do mercado internacional (Filocreão, 2008). Entretanto, a partir da metade da década de 1990, a Bolívia assumiu a liderança no mercado mundial de castanha-do-brasil. Os principais fatores que levaram a essa situação foram as oportunidades criadas pelas dificuldades que a indústria Brasileira encontrou para atender as exigências dos mercados europeu e americano, que criaram normas exigindo

maior qualidade na castanha importada, reduzindo a tolerância de aflatoxinas presente nos lotes comercializados (Filocreão, 2008). Além de afetar a economia do país, as castanhas rejeitadas pelo mercado externo são comercializadas no mercado nacional, aumentando o risco de contaminação da população brasileira pelas aflatoxinas.

Para a melhoria da qualidade da castanha-do-brasil, seja para a exportação ou consumo interno, se faz necessário a certificação das mesmas quanto à ausência de micotoxinas. Conhecer a etiologia das espécies produtoras de toxinas pode auxiliar no manejo adequado visando à preservação e aproveitamento econômico racional da castanha-do-brasil. Assim, pode-se concluir que o primeiro passo no desenvolvimento de uma estratégia eficiente de certificação consiste no levantamento, identificação e estudo da variabilidade e toxicidade dos organismos produtores de micotoxinas nestes frutos no Brasil. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética de *A. flavus* isolados da castanha-do-brasil provenientes de castanhais dos estados do Acre, Pará e Amazonas, utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSR - single sequence repeats).

É importante ressaltar, que este trabalho foi parte integrante do projeto de pesquisa “INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS PARA O CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO DA CASTANHA DO BRASIL POR AFLATOXINAS (MICOCAST)” desenvolvido pela Embrapa, com parceria de diversas instituições de pesquisa e ensino do Brasil, com o objetivo de gerar tecnologias e informações científicas que auxiliem no diagnóstico e controle de aflatoxinas na cadeia produtiva da castanha-do-brasil.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Castanha-do-brasil

A castanheira (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), pertencente à família Lecythidaceae, é uma espécie típica da Amazônia onde suas maiores concentrações se localizam na porção brasileira (Müller et al, 2006). É uma árvore de grande porte que ocupa o dossel superior da floresta sendo facilmente destacada na paisagem (Figura 1). Um indivíduo adulto chega a atingir mais de cinquenta metros de altura tendo em sua base um diâmetro médio de dois metros (Souza et al., 2004). No Brasil, as castanheiras podem ser encontradas nos estados do Acre, Amazonas, Pará, Roraima e Rondônia, bem como em boa parte do Maranhão, Tocantins e do Mato Grosso (Loureiro et al., 1979). Apesar de sua ampla área de dispersão, podem-se observar dois padrões de distribuição das castanheiras na floresta: uma forma dispersa (uma árvore ou menos por hectare) e, outra, considerada como forma concentrada formando os castanhais com 15 a 20 árvores por hectare (Clement, 1993).



Figura 1 *Bertholletia excelsa* Bonpl.

Fonte: Jornal de Humaitá. (<http://www.jornaldehumaita.com.br>)

O fruto da castanheira, comumente chamado de ouriço, possui uma casca lenhosa e dura, e pode conter de 15 a 25 sementes, cujo tamanho varia entre quatro e sete centímetros de comprimento (Figura 2). Estas sementes também têm casca dura e rugosa e contêm uma amêndoa muito apreciada não só pelo seu sabor, mas também pela sua qualidade nutricional (Freitas et al., 2007). De acordo com Moodley et al. (2007), na composição nutricional da castanha-do-brasil os componentes mais abundantes são os lipídios, seguidos pelas proteínas, carboidratos e fibras, de forma que o valor energético é bastante elevado. Além de selênio (Se), antioxidante que é referido na prevenção contra o câncer, também estão presentes na castanha valores elevados de ferro (Fe), magnésio (Mg) e manganês (Mn) que são interessantes

no ponto de vista nutricional, principalmente no enriquecimento de dietas (Chunhieng et al., 2004). Em relação ao teor vitamínico, destacam-se as vitaminas do grupo B, principalmente B1 e B3, a provitamina A e vitamina E (Rogez, 1995).



Figura 2 Fruto da castanheira aberto.

Fonte: Arte dos aromas cosméticos (<http://www.artedosaromas.com.br/2011/produtosv.php?&p=88>).

Devido à suas características, a castanha-do-brasil é um produto de elevada importância para a economia dos Estados da Amazônia brasileira, sendo em alguns destes o principal produto extrativista comercializado, e um dos principais produtos de exportação da Amazônia (Fernandes e Alencar, 1993). Durante o período de 1996 a 2001, os estados do Acre, Amazonas e Pará exportaram 54.000 toneladas de castanha *in natura* (com casca) e 15.000 toneladas de castanha beneficiada (Souza et al., 2004). De acordo com dados do IBGE, no ano de 2010, a produção de castanha-do-brasil apresentou um aumento de 7,7%, mantendo a tendência de crescimento verificado nos últimos três anos (Figura 3). Além da amêndoa, o ouriço da castanheira também

apresenta várias aplicações, pode ser utilizado como combustível, e confecção de pisos e artesanatos (Freitas-Silva e Venâncio, 2010).



Figura 3 Produção de castanha-do-brasil em toneladas nos anos 2008, 2009, 2010, dados IBGE.

A castanha-do-brasil é produzida, predominantemente, em sistemas de base extrativista, existindo apenas um número reduzido de castanhais de cultivo localizado nos Estados do Amazonas e Pará. O sistema de produção tradicional é baseado na unidade familiar, sem maiores investimentos tecnológicos, consistindo basicamente em técnicas de coleta, “amontoa” e quebra de ouriços, além do armazenamento na mata e transporte para usina de beneficiamento (Souza et al., 2004). O baixo nível tecnológico característico da cadeia produtiva, associado a condições climáticas no período de colheita tem favorecido a contaminação das amêndoas em casca, principalmente por fungos produtores de aflatoxinas. Estes problemas constituem um forte entrave na comercialização do produto, principalmente no mercado externo, devido ao

rigoroso controle de qualidade imposto pelos países europeus e Estados Unidos (Souza, 2004). É urgente a necessidade de melhoria do manejo, coleta, beneficiamento, empacotamento e armazenamento das castanhas, ressaltando que a manutenção do baixo nível de teor de umidade em todas as fases é fundamental para um produto de melhor qualidade, principalmente por se tratar de um produto de exportação (Pinheiro, 2004; Okida, 2009).

Atualmente a Bolívia domina o mercado da castanha-do-brasil não só em quantidade exportada, mas também em tecnologia, níveis sanitários e principalmente em valor agregado. Controla 71% do mercado de castanha processada. Já o Brasil é responsável por apenas 18% (Coslovsky, 2005). A Figura 4 mostra o aumento significativo das exportações de castanha-do-brasil sem casca pela Bolívia, o que demonstra o efetivo investimento em tecnologias de beneficiamento. De acordo com Tonini (2007), incentivos fiscais e investimentos em tecnologia foram os responsáveis por tornarem este país líder na comercialização de castanhas no mercado internacional. Desta forma, é necessário que o Brasil invista mais em tecnologias de coleta, armazenamento e produção da castanha-do-brasil, para que assim possa novamente concorrer de forma igualitária com a Bolívia na comercialização internacional deste produto.

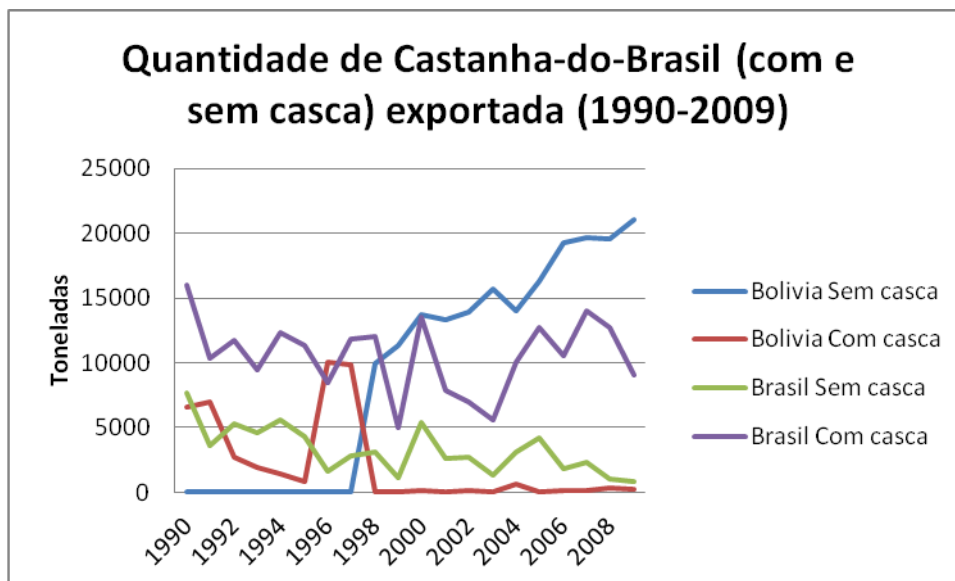


Figura 4 Quantidade de castanha-do-brasil exportada com e sem casca pela Bolívia e Brasil no período de 1990-2009 (Adaptado dados FAO, 2012).

1.2 *Aspergillus flavus*

Um dos mais velhos gêneros do reino Fungi, *Aspergillus* foi nomeado por Micheli em 1729. Seu nome foi dado devido ao formato de suas estruturas produtoras de esporos, visualizados em microscópio, lembrarem um dispositivo usado pelo clero católico romano para aspergir água benta durante a liturgia, chamado de asperges (Bennett, 2010).

O gênero *Aspergillus*, é um grupo de fungos filamentosos que tem mais de 200 milhões de anos de evolução e apresenta uma reduzida necessidade nutricional, podendo ser isolado do solo, água, vegetação, material em decomposição e ar. Com mais de cem espécies identificadas, os microrganismos deste gênero estão distribuídos mundialmente e são considerados fungos filamentosos anemófilos. Podem ser reconhecidos através das suas estruturas de reprodução e métodos de produção de conídios, por

sua cor, forma e tamanho, bem como pelos tipos de hifas e pela caracterização dos aspectos macroscópicos de suas colônias (Ferraz et al., 2008). Embora a identificação das espécies de fungos por taxonomia clássica baseia-se principalmente no uso de marcadores morfológicos como os citados acima, o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para diferenciação das espécies resultou em avanços significativos na taxonomia, devido à sua sensibilidade e especificidade (Magnani, 2005). As espécies deste gênero são de grande importância econômica graças às suas propriedades bioquímicas de produzir enzimas que são utilizadas nas indústrias de panificação e cervejaria, em antibióticos e ácidos orgânicos, e há séculos são empregados na produção de alimentos fermentados. Entretanto algumas espécies podem produzir metabólitos tóxicos (micotoxinas) que são altamente nocivos para a saúde humana e animal (Chalfoun e Batista, 2003).

Dentre as espécies nocivas a saúde pode-se citar o *A. flavus*. Patogênico de várias espécies de plantas e animais, este pode infectar sementes de milho, amendoim, árvores de castanhas, animais domésticos e até humanos. Dependendo do hospedeiro, a contaminação por *A. flavus* pode ser em forma de micélio ou como esclerócitos, que germinam para produzir hifas adicionais ou conídios, podendo ser dispersos no solo e ar (Center for Integrated Fungal Research, 2012). Fatores climáticos e geográficos são determinantes na prevalência e local da infecção por *A. flavus*. Em climas secos como em países áridos e semiáridos é considerado o principal agente etiológico da doença aspergilose invasiva (Hadrich et al., 2011). Entretanto, devido a sua presença em commodities agrícolas, este fungo é mais bem conhecido como a causa primária de contaminações por aflatoxinas B1, que

são metabólitos secundários produzidos por *A. flavus* capazes de causarem danos ao DNA e conseqüente desenvolvimento de câncer em humanos e animais, além de prejudicar o desenvolvimento infantil (Chang e Ehrlich, 2010).

A. flavus se reproduzem clonalmente por mitosporos e sua população tem alta diversidade de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG – *Vegetative Compatibility Groups*). Embora seja uma espécie importante para a saúde pública, a genética da população de *A. flavus* em grande parte ainda não é descrita, devido à dificuldade de desenvolver marcadores moleculares polimórficos presentes dentro e entre os VCGs intimamente relacionados (Grubisha e Cotty, 2008).

1.3 Micotoxinas

Micotoxinas é um termo utilizado que tem origem grega (“mykes”) para designar as toxinas produzidas por fungos filamentosos, estas são caracterizadas pelo seu baixo peso molecular e toxicidade em baixas concentrações (Bennett et al, 2007).

A produção das micotoxinas depende de uma série de fatores que incluem a suscetibilidade do substrato à colonização do fungo produtor, fatores físicos como temperatura do ambiente, umidade do substrato e umidade relativa do ar durante o armazenamento deste, aeração, danos mecânicos, fatores biológicos como capacidade genética do fungo em produzir micotoxinas, quantidade de esporos viáveis, interação de diferentes fungos existentes no mesmo substrato, interação de micotoxinas e presença de insetos (Ciegler, 1978).

As micotoxinas são produzidas, ainda que não exclusivamente, à medida que o fungo atinge a maturidade. São moléculas um tanto quanto diferentes, com estruturas que variam de simples anéis heterocíclicos apresentando peso molecular de até 50 Da, a grupos de 6 a 8 anéis heterocíclicos irregularmente dispostos, com peso molecular total maior que 500 Da e que não apresentam imunogenicidade. Podem variar em grau de severidade, podendo alguns fungos produzir toxinas letais e outros que produzem toxinas que não apresentam tanto impacto na saúde humana e animal. Geralmente, elas aparecem na cadeia alimentar do homem tendo início na contaminação do alimento pelo fungo produtor da toxina na lavoura, onde as micotoxinas permanecem resistentes à decomposição do alimento no sistema digestivo dos animais (Okida, 2009).

Mais de 350 micotoxinas já foram isoladas, das quais mais de 20 são comumente encontradas em diversos alimentos e comprovadamente causam toxicidade à saúde humana (Geisen, 1998). Das diferentes toxinas produzidas por fungos, como fumonisina, tricotecenos, zearalenona, ocratoxina e patulia, a aflatoxina B1 produzida por fungos do gênero *Aspergillus* é a mais tóxica, sendo associada ao câncer de fígado. Embora as micotoxinas sejam extremamente estáveis, resistindo a altas temperaturas de cozimento, epidemias causadas por micotoxinas são raras, mas seu efeito carcinogênico devido à longa exposição a pequenas quantidades constitui um alto risco para a saúde humana (Pinheiro, 2004).

1.4 Aflatoxinas

As aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de três espécies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, que proliferam em diversos substratos e acarretam quase sempre, graves danos à saúde do homem e dos animais (Machinski Junior et al., 2008). A produção de aflatoxinas por estes fungos é normalmente afetada pelo tipo e quantidade de carbono, nitrogênio e traços de metais existentes no ambiente. Em meios de cultura com açúcares simples como glicose, sacarose e maltose, os fungos produzem maior quantidade de aflatoxina que em meios com fontes de carbono mais complexas como o amido e peptona (Yu et al., 2000). Aparentemente as aflatoxinas não são essenciais para o crescimento dos fungos, porém, existem algumas propostas para a função das mesmas, a saber: proverem uma maneira de remover o excesso de carbono, agir como sinal químico entre as espécies, estarem envolvidas em processos de desenvolvimento e, finalmente, atuarem na proteção do fungo contra a microbiota do solo e da competição por insetos (Reis, 2009).

Embora ainda não se conheça a função exata das aflatoxinas para seus fungos produtores, estas são metabólitos extremamente tóxicos para os humanos e animais. Em virtude da capacidade de se ligarem ao DNA das células, as aflatoxinas afetam a síntese proteica, além de contribuírem para a ocorrência da aplasia tímica (ausência congênita do timo e das paratireoides, com conseqüente deficiência da imunidade celular). Têm propriedades oncogênicas e imunossupressivas, induzindo infecções em pessoas

contaminadas com essas substâncias. No Brasil, estas toxinas têm sido encontradas em amendoins e seus derivados, em alimentos destinados a bovinos e em leite líquido, em amêndoas da castanheira e do cajueiro (Freire et al., 2007). Dentre as características das aflatoxinas, podemos citar o baixo peso molecular, baixa solubilidade em água e alta solubilidade em solventes moderadamente polares. São sensíveis à luz, principalmente, ultravioleta e, quando secas são estáveis em temperaturas muito elevadas (*World Health Organization*, 1979). Existem duas formas de aflatoxinas conforme sua fluorescência, B (*blue*) e G (*green*), por apresentarem fluorescência azulada e esverdeada, respectivamente, quando observada sob luz ultravioleta em 365 nm. Os isolados de *A. flavus* produzem somente aflatoxinas de grupo B e menos de 50% dos mesmos são toxigênicos, ao passo que isolados de *A. parasiticus* produzem aflatoxinas do grupo B e G e são invariavelmente toxigênicos (Klich e Pitt, 1998).

A. flavus e *A. parasiticus* têm particular afinidade por castanhas como a castanha-do-brasil, e sementes oleaginosas. Amendoim, milho e semente de algodão são os três mais importantes substratos destes fungos além do trigo, girassol, sorgo e pimenta preta. Embora os fungos possam infectar as culturas ainda no campo, as contaminações geralmente ocorrem primariamente em função de triagens e secagens inadequadas e/ou armazenamento impróprio, pois normalmente técnicas culturais adequadas evitam a ocorrência de fungos antes da colheita (Pinheiro, 2004). A presença de aflatoxinas em alimentos pode ser detectada através de métodos analíticos, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Gasosa (CG) e ELISA (Machinski

Junior et al., 2008). Embora as aflatoxinas possam ser controladas com métodos de secagem e conservação adequados dos grãos, pois o *A. flavus* necessita de uma atividade de água mínima de 0,78 para se desenvolver e produzir micotoxinas, concentrações em pequenas quantidades podem ser facilmente detectadas em alimentos produzidos em países de clima quente e úmido, em regiões tropicais e subtropicais do mundo. (Bhat et al., 1996).

De acordo com Pinheiro (2004), no período de 1998 a 2003, o Laboratório de Controle e Qualidade e Segurança Alimentar LACQSA do Laboratório Vegetal (LAV) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA realizou análise para a detecção de aflatoxinas em 491 amostras de castanha-do-brasil, das quais 236 (48,10%) estavam contaminadas com teores que variavam de 0,30 a 5.000 µg/Kg. No mesmo período foram analisadas 134 amostras de amendoim, constatando contaminação em 88 (65,70%), com teores de 0,30 a 1.460 µg/Kg. Altas concentrações de aflatoxinas também foram encontradas em milho e em menor proporção em feijão. A partir desses dados, pode-se concluir que a população corre sérios riscos de contrair câncer de fígado devido à ingestão frequente de aflatoxinas, ou ainda, consumir alimentos que contenha dosagem letal destas micotoxinas.

1.5 Métodos de Identificação de *A. flavus*

1.5.1 Marcadores morfológicos

A morfologia do *A. flavus* apresenta colônias com diâmetro entre 4,0 – 5,0 cm, crescimento rápido, possuindo as colônias uma coloração amarelo-

verde e tornando-se verde à medida que esta vai envelhecendo (Figura 5). A cabeça é radial, transformando-se com o tempo colunar, e a vesícula é oval possuindo toda a superfície fértil. As hastes são longas e rugosas, e as métulas quando presentes são pequenas. As fiálides também são pequenas e ampuliformes, os conídios são globosos a subglobosos e normalmente áspero e amarelo-verde (Pitt e Hocking, 2009).



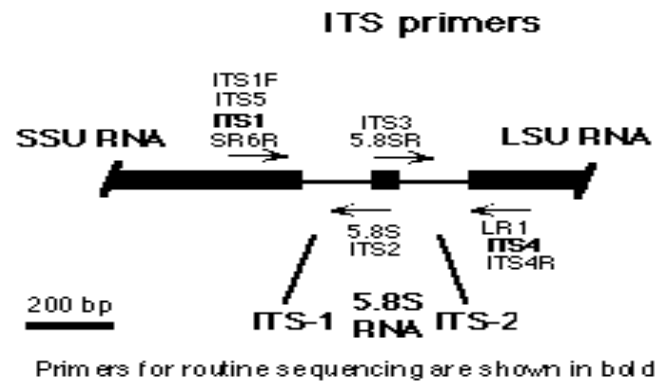
Figura 5 Colônia de *A. flavus* com 18 dias de crescimento.

1.5.2 DNA ribossomal nuclear (rDNA)

A técnica de PCR pode ser aplicada na determinação da posição taxonômica de fungos. Amplificações e sequenciamento direto do DNA ribossomal (rDNA) foi uma das primeiras aplicações da PCR dentro da micologia (Pinheiro, 2004). No núcleo da célula eucariótica, o rDNA é transcrito para rRNA, onde moléculas como o 18S, 5,8S, 28S e 5S tornam-se componentes estruturais do ribossomo (Okida, 2009).

De acordo com Nilsson (2008) o locus mais popular para estudos de base de DNA micológico, para a identificação ao nível de subgênero e, portanto para espécies é o espaçador interno transcrito (ITS) da região ribossomal

nuclear (Figura 6). Essa região tem mostrado variabilidade suficiente para discriminar indivíduos em nível específico e intraespecífico como, por exemplo, raças geográficas (White et al., 1990).



Fonte: (<http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>).

Figura 6 Região ITS ribossomal, apresentando os primers mais utilizados para o sequenciamento.

1.6 Marcadores moleculares Microssatélites

Marcadores genéticos são marcas que diferenciam genótipos e são herdados de acordo com as leis de herança Mendeliana. Os marcadores genéticos podem ser morfológicos, bioquímicos ou moleculares. Sendo que os dois primeiros tipos foram de grande importância nos estudos genéticos, mas caíram em desuso com o passar do tempo e foram substituídos pelos marcadores moleculares (Scholötterer, 2004).

Os marcadores moleculares são basicamente um conjunto de métodos de detecção de variações nas sequências de DNA, sendo estas formas de explorar os polimorfismos naturais existentes entre os indivíduos (Hanai, 2008).

Diversas técnicas da biologia molecular estão disponíveis para a detecção de

variabilidade genética a nível de sequência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Após a invenção do PCR no início da década de 1990, a capacidade de visualização de *locus* genômicos, sem a necessidade de marcação e hibridização possibilitou o desenvolvimento de uma série de marcadores moleculares sendo os mais importantes o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), e os microssatélites ou SSR (“simple sequence repeats”).

Atualmente, o uso de microssatélites é a técnica mais preconizada na análise de polimorfismo (Lins, 2008). Os marcadores SRR são sequências de 1 a 6 nucleotídeos que se repetem lado a lado na fita de DNA no genoma de eucariotos (Tautz et al., 1984), embora também estejam presentes em menor número no genoma de procariotos. São regiões genômicas em que cada par de bases ou número de pares de bases do DNA é repetido várias vezes (Yu et al., 1999). Diferentes isolados podem ser distinguidos baseados nos diferentes números de repetições (Hadrich et al., 2011).

Os marcadores microssatélites surgiram a partir da sugestão de Jeffreys e colaboradores (1998) de combinar a especificidade e a rapidez da PCR com a informatividade dos marcadores VNTR (*Variable Numbers Tandem Repeat* - Repetição em Tandem de Número Variável) em humanos. Por serem regiões conservadas no genoma, estas podem ser amplificadas por PCR (reação em Cadeia da Polimerase), utilizando oligos iniciadores (*primers*) específicos complementares a sequências conservadas que flanqueiam o

microssatélite. Essa técnica revela polimorfismo em um loco, devido a diferenças no número de vezes que o microssatélite se repete naquele determinado loco amplificado (Tautz et al., 1989), e é utilizada como ferramenta inerente nos estudos de diversidade genética. Diversos trabalhos têm comprovado que o loco microssatélite amplificado é um marcador que possui alto polimorfismo, uma vez que tem expressão codominante e multialelismo. Marcadores microssatélites específicos para o *A. flavus* foram desenvolvidos por Grubisha e Cotty (2009), estes também se mostraram altamente polimórficos quando estudados em indivíduos pertencentes a três VCGs distintos. De acordo com Grupta et al. (1996), há uma relação linear entre o número de alelos detectado para um dado loco e o comprimento do microssatélite. Quanto maior o número de *motifs* repetidos, maior o número de alelos detectados (Lins, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a variabilidade genética de *A. flavus* isolados de amêndoas da castanheira provenientes de diferentes estados amazônicos utilizando marcadores moleculares microssatélites (SSR- *single sequence repeats*), no intuito de gerar informações que auxiliem no diagnóstico e controle deste fungo e suas micotoxinas na cadeia produtiva da castanha-do-brasil.

2.2 Objetivos específicos

1. Isolar e identificar morfológicamente e molecularmente fungos do gênero *Aspergillus* presentes nas castanhas-do-brasil coletadas em locais distintos da região norte.
2. Analisar a variabilidade genética do *A. flavus* por meio de marcadores SSR (microssatélites).
3. Formar e manter uma coleção de fungos isolados da castanha-do-brasil.
4. Validar os marcadores microssatélites em *A. flavus* associados às amêndoas da castanheira do Brasil.
5. Correlacionar características genéticas com a localização geográfica dos isolados de *A. flavus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das castanhas

Os ouriços contendo as castanhas foram coletados em três estados da região norte do Brasil (Amazonas, Acre, Roraima). Os isolados do Acre foram cedidos pelo Dr. Rivaldave Coelho do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Acre. As castanhas de origem do estado do Amazonas foram coletadas em reservas extrativistas (RESEX) nos municípios de Humaitá e Manicoré. As de Itacoatiara foram cedidas pela indústria beneficiadora IBSABBA. Foram também utilizadas castanhas do município de Caroebe (RESEX) em Roraima para o isolamento dos fungos. Em cada município foram coletados aproximadamente 15 ouriços de onde foram selecionadas aproximadamente 200 castanhas para o isolamento dos *Aspergillus*.

3.2 Isolamento dos fungos

As castanhas foram retiradas dos ouriços e descascadas com auxílio de uma faca. Para a desinfecção das amêndoas foi utilizado etanol 70% e hipoclorito de sódio 1%. Cada uma delas foi mergulhada no etanol por dois minutos e em seguida no hipoclorito de sódio por três minutos. Foram lavadas em água estéril e transferidas para caixas gerbox transparentes devidamente preparadas com papel toalha umedecido com água destilada e estéril, formando uma câmara úmida. Todo esse procedimento foi realizado em uma câmara de fluxo laminar. Em cada gerbox foram colocadas cinco castanhas

que lá permaneceram por um período de sete dias, em uma temperatura de 25 °C (Figura 7).



Figura 7 Câmara úmida montada com cinco castanhas.

De cada colônia desenvolvida nas castanhas foram retirados fragmentos, com auxílio de uma alça estéril e um microscópio estereoscópico (lupa), e logo em seguida transferido para placas de Petri contendo meio BDA (ágar 2%, dextrose 1% e caldo de batata 2%) e antibiótico (cloranfenicol 250 mg/mL). As placas foram passadas na chama e vedadas com filme de PVC (Polyvinyl chloride). O crescimento ocorreu nas mesmas condições descritas anteriormente.

Após o crescimento da colônia, já com esporos sendo produzidos foi acrescentado água destilada estéril para fazer a suspensão dos esporos. Com auxílio de uma espátula esterilizada foram feitas estrias em uma nova placa contendo meio constituído de ágar água (ágar 2% e água destilada estéril). Posteriormente com ajuda de um microscópio com a lente de menor aumento

(20 X) foi localizado esporos mais isolados e marcados para serem transferidos para um tubo de ensaio contendo meio BDA.

O desenvolvimento da colônia sobre o meio BDA foi acompanhado diariamente. Ao surgimento de estruturas miceliais, as mesmas foram repicadas para novas placas de Petri contendo meio de BDA. Das colônias formadas foram retirados com auxílio de um bisturi esterilizado, quadrados de aproximadamente 3 mm para preservação dos isolados pelo método Castellani (Alfenas e Mafia, 2007). Em cada microtubo de 3 mL contendo água estéril foram armazenados 10 discos de cada isolado.

Ao total foram isolados 600 fungos do gênero *Aspergillus* dos diferentes pontos de coleta. De cada localidade foram escolhidas 40 isolados aleatoriamente para a identificação morfológica e molecular.

3.3 Identificação macroscópica e microscópica dos fungos isolados

A identificação das colônias de *Aspergillus* spp. foi realizada através da observação macromorfológica em microscópio estereoscópico. Foi observada também a coloração da colônia e o seu crescimento.

Para a identificação microscópica das espécies de *Aspergillus* spp., isolados das castanhas-do-Brasil, foi realizado a microcultura sobre lâminas.

Os isolados armazenados foram utilizados para a confecção das lâminas. Foi retirado de cada microtubo um único disco contendo fragmentos das colônias. Em placas de Petri contendo meio BDA foi depositado um disco e em seguida foram mantidas por aproximadamente quatro dias em temperatura de 25 °C para a obtenção da colônia e preparação do microcultivo.

Em uma placa de Petri foi colocado um disco de papel filtro, uma lâmina, um bastão de vidro em “V” para suporte, e duas lamínulas que foram esterilizados antes do microcultivo. A montagem da lâmina foi realizada em uma câmara de fluxo laminar.

Pequenos quadrados de meio BDA foram depositados sobre a lâmina. Nas laterais de cada recorte, com a ajuda de uma haste de metal esterilizada foram depositados esporos e com auxílio de uma pinça foram colocadas as lamínulas sobre estes. Para que se tenha um ambiente favorável ao desenvolvimento da colônia o papel filtro foi umedecido com água destilada estéril.

As placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas a temperatura ideal para o crescimento (27°C), durante aproximadamente quatro dias. A reposição da água foi realizada quando se mostrou necessária.

Após este período houve crescimento de micélio entre a lâmina e lamínula. Então com auxílio de uma pinça as lamínulas foram retiradas cuidadosamente e depositadas em uma lâmina limpa com uma gota de Lactofenol azul de algodão para a coloração das estruturas. As lamínulas foram vedadas com esmalte incolor.

Cada lâmina foi observada em microscópio de luz com uma régua milimetrada acoplada à lente, onde foram identificados e mensurados os conídios, as fiálides e os conidióforos. Em cada lâmina a medição foi feita em aproximadamente trinta estruturas para que com auxílio da chave taxonômica do gênero *Aspergillus* (Klich e Pitt, 1988) identificasse a espécie.

3.4 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de micélios do fungo pelo método fenol-clorofórmio (Reader e Broda, 1985). Os micélios de cada isolado de *A. flavus* foram crescidos em frasco *erlenmeyer* de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura líquido CYA, e incubados a 25 °C à 120 rpm, durante três dias. Os micélios foram recuperados por filtração à vácuo e lavado com água destilada esterilizada, para a remoção de resíduo do meio de cultura. Cada micélio foi acondicionado em microtubos de 1,5 mL contendo esferas de porcelana e então macerado.

A maceração do micélio foi realizada em FastPrep® já contendo em cada microtubo 500 µL de tampão de extração (Tris HCl 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA mM e SDS 0,5% pH 7). Em seguida, foram adicionados 350 µL de fenol, misturando gentilmente o conteúdo. Posteriormente, 150 µL de clorofórmio foi adicionado, misturando o conteúdo por inversão até a uma aparência leitosa. A suspensão foi centrifugada a 13.000 rpm por 30 minutos, em centrífuga refrigerada à temperatura de 4° C. Da fase aquosa superior foi transferido no máximo 750 µL para novo microtubo de 1,5 mL acrescentando 10 µL de RNase (1 U/ µL), incubando-os à 37°C por 10 minutos para a quebra do RNA. Para a eliminação de proteínas residuais, foi acrescentado igual volume de clorofórmio misturando o conteúdo gentilmente por inversão, seguido de centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm. Em seguida transferiu-se a fase aquosa superior para novos microtubos onde o DNA foi precipitado com isopropanol à -20°C na proporção de 54% do volume da solução. Efetuou-se nova centrifugação por 10 a 20 segundos a 5.000 rpm e descartou-se o

sobrenadante. Para a remoção de sais, o precipitado foi lavado com 200 μL de etanol 70% a 4°C, centrifugado por um minuto onde novamente o sobrenadante foi descartado. A secagem do DNA foi realizada no *speed-vacuum* (Eppendorf Concentrator Plus) por 10 minutos e em seguida, ressuspendido em 50 μL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 1 mM EDTA). O DNA purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (5 V/cm) na presença de brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e quantificado visualmente por comparação com marcador padrão *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Para finalizar, as amostras foram diluídas em água Milli-Q estéril para uma concentração final de 5 ng/ μL .

3.5 Identificação molecular da espécie

Para a distinção entre espécies do gênero *Aspergillus* foram utilizados iniciadores (*primer*) específicos desenhados a partir de sequências conservadas do rDNA ITS (Zao, 2001; Surgita, 2004). Os *primers* utilizados foram ITS 4 e ITS 5 (Tabela 1), flanqueando a região 5.8S (Figura 6).

Tabela 1

Sequências dos iniciadores da região ITS do rDNA utilizados na amplificação.

Primer	Sequência 5'>3'	Referência
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al, 1990
ITS 5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al, 1990

Foram utilizados 0,4 μM de cada primer, 200 μM de dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase (Phoentria-pht) com tampão de reação enriquecido de MgCl_2 fornecido juntamente com a enzima, 20 ng de DNA e água Milli-Q suficiente para completar o volume da reação para 20 μL . Para a verificação da correta amplificação do fragmento, 1 μL da reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, na presença de brometo de etídio.

3.5.1. Sequenciamento e análise da região ITS

Para o sequenciamento cada reação foi submetida ao tratamento com a enzima Exonuclease I e SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*). Após reação da ExoSAP uma placa de 96 poços foi montada com BigDye® Terminator v3.1 (*Applied Biosystems*) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

O sequenciamento dos produtos da PCR foi realizado no Laboratório de Genética de Plantas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen, Brasília/DF), utilizando o sequenciador automático de DNA (ABI 3730) de acordo com Sanger et al. (1977). Os eletroferogramas resultantes do sequenciamento automático foram analisados e as sequências contíguas foram montadas com auxílio do ChromasPro v1.5 (Technelysium Pty Ltd). O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa Muscle v3.5 (Edgar, 2004) e em seguida editadas manualmente no programa BioEdit v7.0.9 (Hall, 1999).

Para determinar o modelo de substituição nucleotídica mais apropriado do alinhamento das sequências ITS foi utilizado o programa

Modeltest v6.06 (Posada e Crandall, 1998). Este programa compara 56 modelos de evolução alternativos utilizando para adoção do modelo de informação Akaike (*Akaike Information Content*) e também a informação Bayesiana (*Bayesian Information Content*). Após esta análise o modelo “*General Time Reverseble + invgamma*” (GTR+IG) foi selecionado.

As relações filogenéticas entre os isolados de *Aspergillus* foi realizada através da construção de um cladograma pelo método de Inferência filogenética Bayesiana, usando o programa MrBayes v3.2 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001). O algoritmo Monte Carlo via cadeia de Markov (MCMC) foi iniciado a partir de uma árvore aleatória e seis Cadeias de Markov foram processadas para 2.000.000 de gerações, com amostras de árvores coletadas a cada 100 gerações, sendo descartadas 25% das amostras iniciais, o restante foi utilizado para determinar as distribuições dos valores de probabilidade.

3.6 Amplificação do DNA utilizando Marcadores Microssatélites (SSR)

Para o estudo da variabilidade genética usando marcadores microssatélites foram utilizados somente os indivíduos identificados como *A. flavus*. No total foram 86 indivíduos da espécie de *A. flavus*, sendo 27 isolados das castanhas provenientes do Acre (Grupo AC), 29 do município de Humaitá (Grupo H) e 30 *A. flavus* isolados de castanha-do-brasil coletadas em feiras de Belém (Grupo F). Estes últimos foram cedidos pelo Dr. Robert Miller (Universidade de Basília/UNB), os quais já haviam sido identificados anteriormente a este trabalho. A escolha dos *primers* utilizados foi realizada com base no resultado do trabalho de Grubisha e Cotty (2009) que

desenvolveram vinte e quatro iniciadores SSR para a análise da diversidade de *A. flavus* isolados do Arizona e Texas (Estados Unidos). Os iniciadores selecionados foram aqueles que apresentaram maior polimorfismo genético no estudo de Grubisha e Cotty (2009) (Tabela 2).

A amplificação do DNA extraído foi realizada usando iniciadores marcados com fluoróforos listados na Tabela 2. O volume final da reação foi de 10 μL , sendo 1 μL de tampão (10X, PHT), 1 μL de dNTPs (2,5 mM), 1,5 μL de cada iniciador (*forward e reverse*), 0,3 μL MgCl_2 (50 mM), 0,2 μL Taq polimerase (5 U μL^{-1}), 1 μL de DNA (5 ng μL^{-1}) e água MILLI-Q para completar o volume.

Tabela 2

Iniciadores SSR utilizados para o estudo da variabilidade genética de *A. flavus*.

Nome loci	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Motivo	Tamanho (pb)
Af08	F: <i>HEX</i> -GGCTTGCAAGTCTAATCTGC R: TGTGTCTTTGGGATGTATTTTCG	(AAG) ₁₆	178
AF10	F: 6 <i>FAM</i> -CGTGCCATCGTAGAACTTCC R: GGGACATTGGTAGTACCTTGG	(TAC) ₁₀	274
AF11	F: <i>NED</i> -GACGGCGGTGTACAGTGATAGT R: GCAGTAACGCGATTATGCAAGT	(AAG) ₁₂	142
AF13	F: <i>HEX</i> -CGTGTTCCAAGTCAAGTCCA R: TCTCCTTTGCTCCCGTTAGA	(CTT) ₉	136
AF17	F: <i>HEX</i> -CTATAGAGGTGGCGCAGAGG R: GGTTCCTCGTCTCGTCCTTG	(AGA) ₄ (AGG) ₁₀	366
AF28	F: 6 <i>FAM</i> -CCTCCATTCACTCACT R: TTCCTGGGAAGTGAAGAACG	(TTG) ₁₁	161
AF31	F: <i>NED</i> -GGGTTGCTTTGAGGTGTGAG R: GGAGTGGCTAGATCGCATGT	(TTC) ₃₁	377
AF34	F: <i>HEX</i> -CAGTCAACCTTGGCATCGTA R: ACCAAACCCAAACCCTAACC	(GTC) ₄ (GGT) ₈	306
AF42	F: 6 <i>FAM</i> -TCTGATGCGAAGCTGTAAC R: TCTGCCAAGCAAGAGGAAGT	(TTC) ₈	168
AF43	F: <i>NED</i> -GTGAGAGCAATTGGGAAACC R: TGACCAATATGCTGGAGGTG	(GAG) ₁₃	392
AF48	F: 6 <i>FAM</i> -CCACGTTCCACTGTCTCCT R: GCAAGTCCTCCACTGATGGT	(AAG) ₁₂	352
AF64	F: <i>NED</i> -GCCTAAGGACGAGTCGATTG R: GAGGACCGAAGGATGTG	(AC) ₁₆	177

A reação foi colocada em um termociclador (*Veriti 96-Well Thermal Cycler – Applied Biosystems*), programado para conduzir 40 ciclos, após a desnaturação de 2 minutos a 95 °C, sendo que em cada um dos 10 primeiros ciclos, ocorreu com uma temperatura de 94 °C por 30', 54 °C por 30' e 72 °C durante 1 minuto. Nos 30 ciclos finais somente a temperatura de anelamento foi modificada para 52 °C. Para a extensão final foi utilizada a temperatura de 72 °C por dez minutos e depois sendo reduzida para 4 °C e mantida nesta temperatura. O volume de 1 µL dos produtos da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio 1 µg/mL para a verificação da banda amplificada.

3.7 Genotipagem

O produto da amplificação com os marcadores específicos para *A. flavus* foram genotipados no sequenciador automático de DNA ABI 3730, localizado no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Cenargen (Brasília/DF).

Com as amostras foi preparado um Mix contendo 1 µL da reação dos marcadores microssatélites, 1 µL de ROX 500 GeneScan e 8 µL formamida a 94%. Este foi desnaturado a 95 °C por 5 minutos e submetido à eletroforese de capilar no sequenciador automático. O tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases foi estimado usando o software GeneMapper® versão 4.1. Os tamanhos dos fragmentos em pares de bases foram padronizados utilizando-se o software “Allelobin” (Idury e Cardon, 1997). Essa ferramenta utiliza um procedimento de categorização de alelos em classes,

definidos com base em quadrados mínimos, para eliminar o problema de padronização com uso de critérios pessoais.

3.7.1 Análise dos dados da genotipagem

Os tamanhos dos alelos foram organizados em matrizes de dados utilizando programas computacionais que permitiram a determinação da variabilidade genética intra e intergrupos. Para calcular a frequência alélica dos genótipos observados foi utilizado o programa Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001). Com auxílio deste programa também foram calculados o conteúdo de informação polimórfica (PIC) e a matriz de distância genética entre pares de amostras de acordo com Cavalli-Sforza (1994).

A partir da genotipagem, por meio dos marcadores SSRs, foi estimada uma matriz de dissimilaridade genética e, para permitir uma melhor visualização, foi construída uma árvore filogenética baseada no método hierárquico algomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA, Sokal e Michener, 1958), com DAMBE 5.0.86 (Xia, 2001; Xia e Xie, 2001).

A heterozigosidade estimada foi calculada segundo Nei (1978), utilizando o programa FSTAT (Goudet, 1995). O mesmo programa foi utilizado para calcular o índice F_{st} segundo Weir e Cockerham (1984) e o índice R_{st} , que é análogo ao F_{st} segundo Slatkin (1995).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Identificação morfológica dos isolados

A identificação morfológica da espécie foi realizada em 80 isolados de *Aspergillus* spp. provenientes dos municípios de Caroebe (Roraima), Manicoré, Itacoatiara e Humaitá do estado do Amazonas. Todos eles foram identificados como *A. flavus*. Devido a alta semelhança entre as espécies (Figura 8), após o sequenciamento da região ITS de alguns destes isolados, foi verificado que a maioria identificada morfológicamente não correspondia à espécie esperada.



Figura 8 Imagem microscópica (40x) de três isolados identificados. 1 - *A. flavus*; 2 - *A. nomius*; 3 - *A. tamarii*.

A maioria dos isolados identificados morfológicamente como *A. flavus* e confirmados após o sequenciamento, foi de origem do município de Humaitá então os isolados deste município foram utilizados no estudo da variabilidade genética de *A. flavus*.

A identificação morfológica dos isolados do estado do Acre foi conduzida no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Acre, e enviados para Embrapa Amazônia Ocidental para as demais análises.

4.2 Identificação Molecular do *A. flavus*

A amplificação da região ribossomal ITS (5.8S) de 98 isolados resultou em um produto de amplificação de aproximadamente 650 pares de base (pb) (Figura 9).

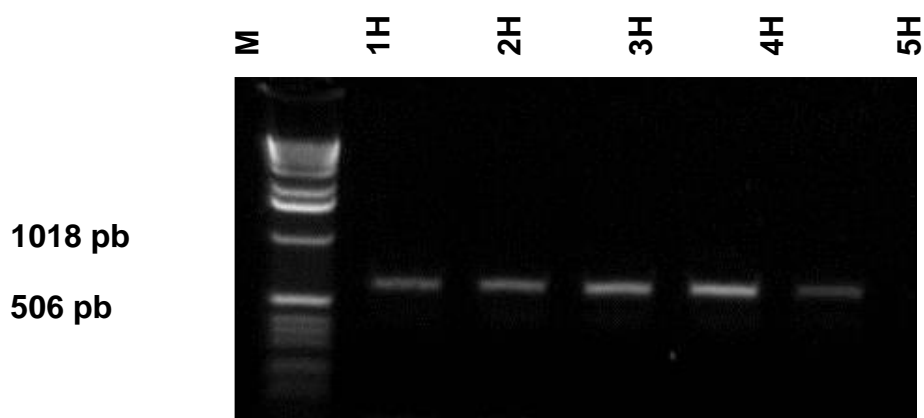


Figura 9 Gel de agarose mostrando a amplificação realizada com os primers ITS5 e ITS4. Os números seguidos de letras acima dos poços representam os isolados de Humaitá e a letra M o marcador utilizado (M = 1kb DNA ladder).

Foram obtidas sequencias consenso da região ITS do rDNA para todos os isolados. Conforme observado em outros trabalhos, o gene 5.8S apresentou-se altamente conservado em todos isolados analisados (Haynes *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 2000; Zao *et al.*, 2001; Pinheiro, 2004). As sequencias também foram comparadas com as sequencias contidas na base de dados do Blastn da região ITS do rDNA de fungos do gênero *Aspergillus*, e como esperado, também mostraram alto grau de identidade. Ao total foram

identificados 32 *A. nomius*, 49 *A. flavus*, 16 *A. tamaritii*, 1 *A. fumigatus*. A relação dos isolados, identificação e origem estão mostradas na Tabela 3.

Através da análise filogenética do gene 5.8S dos isolados de *Aspergillus* juntamente com outras sequências previamente depositadas em banco de dados públicos para fungos deste gênero, foi montado um cladograma (Figura 10) onde pode-se observar que o agrupamento dos indivíduos ocorreu de acordo com a espécie. Foram formados três grandes clados de *Aspergillus*, sendo eles de *A. flavus*, *A. tamaritii* e *A. nomius*, confirmando a identificação prévia das espécies.

Tabela 3

Identificação molecular da espécie e origem de 98 isolados estudados. As letras acompanhadas dos números foram utilizadas para separar os isolados por origem das castanhas: AC - Acre, H – Humaitá (AM), M – Manicoré (AM), I – Itacoatiara (AM), C – Caroebe (RR).

Identificação dos isolados	Origem	Espécie	Identificação dos isolados	Origem	Espécie
1AC	Acre	<i>A. flavus</i>	155H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>
2AC	Acre	<i>A. flavus</i>	161H	Humaitá/AM	<i>A. tamaritii</i>
3AC	Acre	<i>A. flavus</i>	163H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>
5AC	Acre	<i>A. flavus</i>	166H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>
6AC	Acre	<i>A. flavus</i>	171H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>
8AC	Acre	<i>A. flavus</i>	173H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>
9AC	Acre	<i>A. flavus</i>	179H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>
10AC	Acre	<i>A. flavus</i>	195H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>
11AC	Acre	<i>A. flavus</i>	1M	Manicoré/AM	<i>A. tamaritii</i>
12AC	Acre	<i>A. flavus</i>	2M	Manicoré/AM	<i>A. tamaritii</i>
13AC	Acre	<i>A. flavus</i>	7M	Manicoré/AM	<i>A. tamaritii</i>
18AC	Acre	<i>A. flavus</i>	14M	Manicoré/AM	<i>A. tamaritii</i>
19AC	Acre	<i>A. flavus</i>	29M	Manicoré/AM	<i>A. tamaritii</i>
20AC	Acre	<i>A. flavus</i>	17M	Manicoré/AM	<i>A. nomius</i>
21AC	Acre	<i>A. flavus</i>	18M	Manicoré/AM	<i>A. tamaritii</i>
22AC	Acre	<i>A. flavus</i>	21M	Manicoré/AM	<i>A. tamaritii</i>
25AC	Acre	<i>A. flavus</i>	22M	Manicoré/AM	<i>A. tamaritii</i>
29AC	Acre	<i>A. flavus</i>	24M	Manicoré/AM	<i>A. tamaritii</i>
30AC	Acre	<i>A. flavus</i>	25M	Manicoré/AM	<i>A. tamaritii</i>
4H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	26M	Manicoré/AM	<i>A. tamaritii</i>
6H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	27M	Manicoré/AM	<i>A. nomius</i>
14H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	28M	Manicoré/AM	<i>A. tamaritii</i>
15H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	30M	Manicoré/AM	<i>A. nomius</i>
19H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	31M	Manicoré/AM	<i>A. nomius</i>
22H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	32M	Manicoré/AM	<i>A. nomius</i>
25H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	41M	Manicoré/AM	<i>A. tamaritii</i>
29H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	44M	Manicoré/AM	<i>A. nomius</i>
38H	Humaitá/AM	<i>A. fumigatus</i>	3I	Itacoatiara/AM	<i>A. tamaritii</i>
41H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	4I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
45H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	6I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
46H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	7I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
50H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	8I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
57H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	10I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
59H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	25I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
63H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	27I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
66H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	28I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
67H	Humaitá/AM	<i>A. nomius</i>	29I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
76H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	32I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
85H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	34I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
90H	Humaitá/AM	<i>A. nomius</i>	56I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
93H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	59I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
108H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	60I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
116H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	75I	Itacoatiara/AM	<i>A. nomius</i>
117H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	16C	Carobe/RR	<i>A. nomius</i>
119H	Humaitá/AM	<i>A. nomius</i>	25C	Carobe/RR	<i>A. nomius</i>
121H	Humaitá/AM	<i>A. nomius</i>	44C	Carobe/RR	<i>A. nomius</i>
126H	Humaitá/AM	<i>A. flavus</i>	88C	Carobe/RR	<i>A. nomius</i>
127H	Humaitá/AM	<i>A. nomius</i>	100C	Carobe/RR	<i>A. tamaritii</i>
142H	Humaitá/AM	<i>A. nomius</i>	219C	Carobe/RR	<i>A. nomius</i>

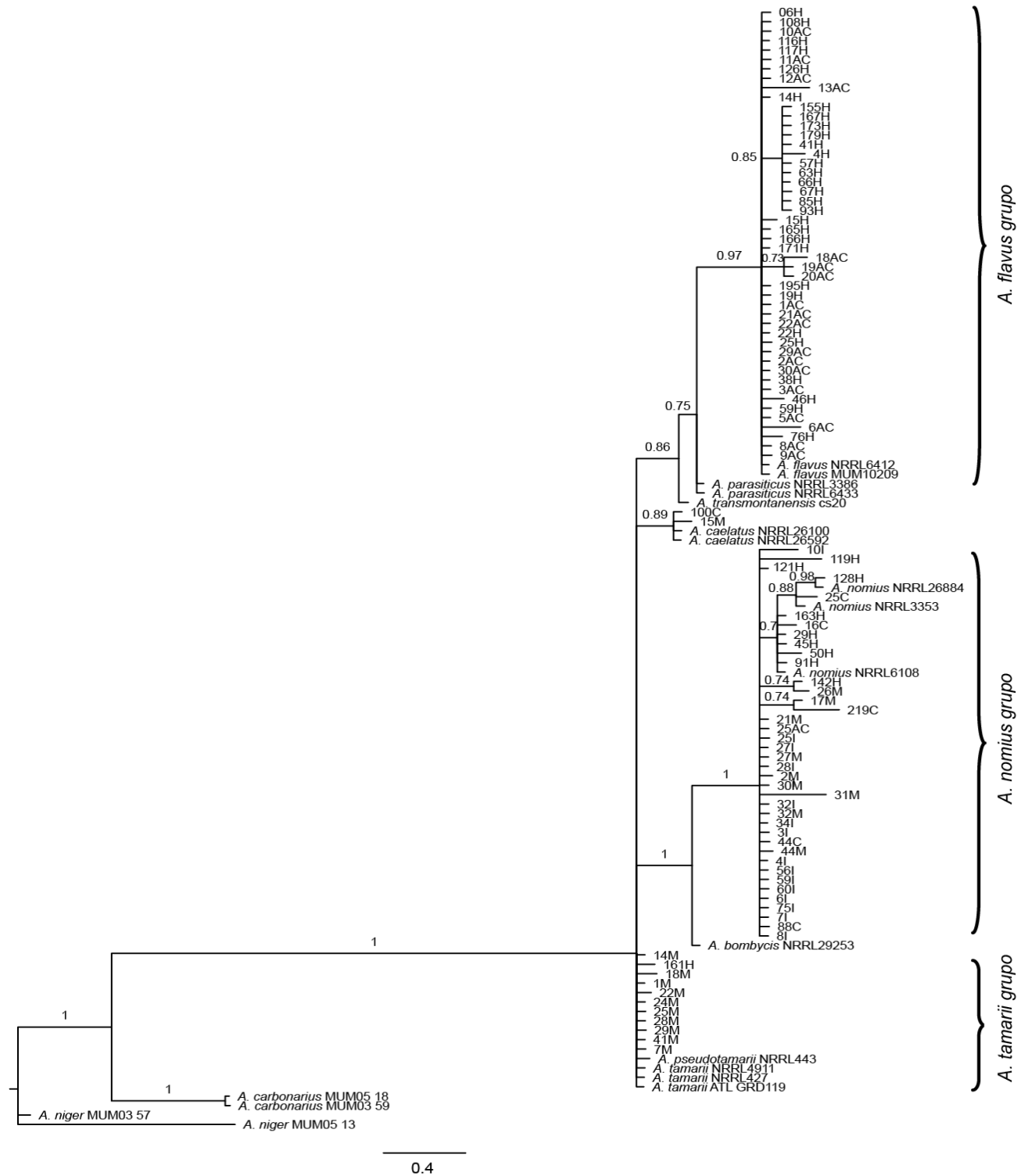


Figura 10 Cladograma mostrando as relações filogenéticas entre as sequências da região ITS dos isolados de *Aspergillus* através da análise de Inferência Filogenética Bayesiana. Os valores da probabilidade posterior são indicados nos ramos e barra da escala indica o número de substituições esperadas por site.

4.3 Estudo da diversidade genética de *A. flavus* com marcadores microssatélites

A utilização dos marcadores microssatélites neste trabalho foi empregada para detectar a variabilidade genética intraespecífica de isolados de *A. flavus* por origem geográfica. Este é o primeiro trabalho que utiliza marcadores SSR para analisar a variabilidade de *A. flavus* isolados da região amazônica utilizando a genotipagem em sequenciador automático. De acordo com Nei (1973), através da utilização de marcadores moleculares a diversidade genética de uma população pode ser mensurada pela frequência de genótipos e alelos, pela proporção de *locus* polimórficos e pela heterozigose esperada e observada.

Para análise da variabilidade genética de 86 isolados de *A. flavus* foram utilizados 12 iniciadores SSR (Grubisha e Cotty, 2009). Entretanto os resultados gerados por dois destes iniciadores (AF31 e AF43) foram descartados, pois o *primer* AF43 não foi eficiente na amplificação do DNA dos isolados, e mesmo com bandas sendo observadas na amplificação do iniciador AF31 (Figura 11), não foi possível obter a leitura no sequenciador no momento da genotipagem. Os demais *loci* analisados mostraram-se eficientes na amplificação e na genotipagem do DNA dos isolados de *A. flavus*, o que gerou um total de 118 alelos, com amplicons variando de 110 a 390 pares de base. Para a genotipagem nove amostras de DNA selecionadas aleatoriamente foram analisadas em duplicatas. Os resultados obtidos foram semelhantes demonstrando a precisão e reprodutibilidade do método utilizado neste trabalho.

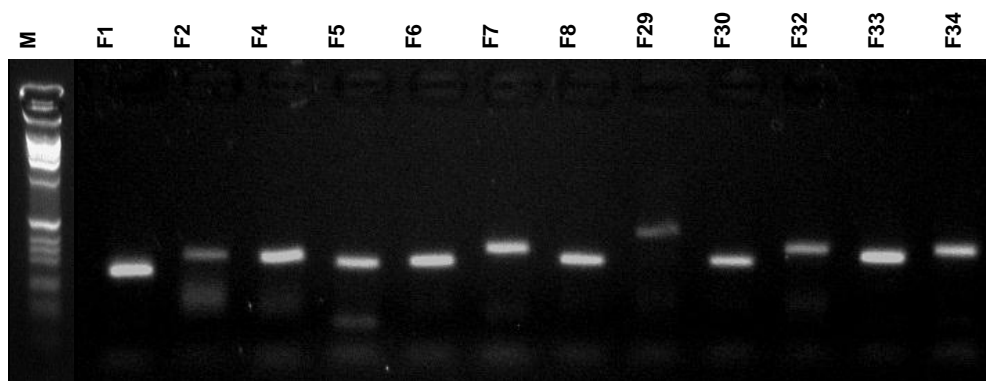


Figura 11 Perfil do marcador microssatélite para isolados de *Aspergillus flavus* F1 ao F34, gerados com o primer AF-31. Os números acima dos poços do gel indicam o isolado. A letra M indica o marcador 1Kb plus DNA ladder.

A partir dos produtos da genotipagem verificou-se que todos os 10 *locus* foram polimórficos, assim como os resultados obtidos por Grubisha e Cotty (2009), sendo que no presente trabalho foi identificado um maior número de alelos por *locus* (Tabela 4) do que aqueles encontrados no trabalho de desenvolvimento dos iniciadores.

Tabela 4

Número de alelos amostrados por grupos, onde o grupo F representado por isolados de castanha originárias de feiras em Belém (PA), o Grupo H de isolados de castanha coletadas em Humaitá (AM) e o Grupo AC de isolados de castanhas provenientes do Acre.

Grupos				
Locus	F	H	A	Total
AF08	3	7	5	8
AF10	7	9	5	15
AF11	7	4	6	12
AF13	10	6	8	13
AF17	3	5	5	6
AF28	3	5	4	7
AF34	5	10	9	12
AF42	9	7	7	13
AF48	7	10	8	16
AF64	6	9	8	15

O número de alelos de um *locus* de microsatélite pode variar muito, podendo ir de um (monomórfico) até vários (polimórfico). Pode-se considerar um *locus* polimórfico quando um alelo mais comum tem frequência inferior a 0,95 (Fontequ, 2011). Dos 118 alelos observados para os 10 *loci* analisados, estes variaram de 8 e 16 por *locus*, com uma média de 11,7 alelos, e a maior frequência alélica encontrada foi de 0,82 para o *locus* amplificado pelo iniciador AF28. Os valores de PIC também foram calculados, e estes variaram de 0,308 (AF28) a 0,903 (AF10), com uma média de 0,768. Segundo a classificação de Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 mediantemente informativos, e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos. Os valores encontrados de PIC para os marcadores SSR utilizados neste estudo são relativamente elevados, mostrando que estes foram polimorficamente informativos. Na tabela 5 pode-se observar as frequências alélicas, o número de alelos e os valores de PIC encontrados para cada *locus* analisado.

Tabela 5

Número de alelos (N) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) estimado para locus microsatélites, obtidos de informações genéticas de 86 amostras de *A. flavus*.

Marcador	N	PIC	Marcador	N	PIC
AF08	8	0,734	AF28	7	0,308
AF10	15	0,903	AF34	12	0,865
AF11	12	0,77	AF42	13	0,853
AF13	13	0,84	AF48	16	0,864
AF17	6	0,703	AF64	15	0,873

O alto polimorfismo dos *loci* analisados neste estudo também pode ser evidenciado quando se compara os dados dos mesmos *loci* no trabalho realizado no desenvolvimento dos iniciadores (Grubisha e Cotty, 2009). Os autores deste trabalho encontraram 3-10 alelos para o *locus* AF08, 8-19 alelos para AF10, 4-11 alelos para AF11, 1-7 alelos para AF13, 2-5 alelos para AF17, 2-4 alelos para AF28, 1-5 alelos para AF34, 5-11 alelos para AF42, 4-11 alelos para AF48 e 2-14 alelos para AF64, nos VCGs (Grupos de Compatibilidade Vegetativa) com menor e maior número de alelos respectivamente. Na população da Amazônia avaliada um número máximo de 16 alelos foi detectado para o marcador AF48. Uma variação deste nível pode significar que este *locus* se encontra em uma região de elevada taxa de mutação. O *loci* AF17 foi o que apresentou o menor polimorfismo, com somente 6 alelos. Embora Grubisha e Cotty (2009), tenham analisado um número maior de isolados (221) que o presente trabalho, a variabilidade genética encontrada para os isolados da região amazônica foi maior que a dos isolados americanos estudados. Este resultado pode estar relacionado à localização geográfica, onde fatores ambientais encontrados na floresta, como umidade e temperatura, são propícios para o desenvolvimento do fungo e consequente aumento da diversidade populacional.

Tran-Dihn e colaboradores (2009) também encontraram um elevado grau de diversidade genética entre estirpes de *A. flavus* isolados do milho, amendoim e solo no Vietnã analisadas por microssatélites, região também com umidade e temperatura similares aos encontrados na Amazônia. Entretanto, de acordo com os mesmo autores, a alta diversidade genética pode ser indicativa

de uma população que está presente em uma região a tempo suficiente para adquirir variação evolutiva, pode ser devido a uma única introdução de estirpes altamente diversas ou múltiplas introduções independentes.

A alta diversidade pode também estar relacionada com a recombinação sexual. *A. flavus* era considerado um organismo assexual, mas a análise genética de populações encontrou evidências de recombinação entre isolados desta espécie (Geiser et al., 1998). Realmente, Horn e colaboradores (2009) demonstraram que a reprodução sexual ocorre entre cepas de *A. flavus* sexualmente compatíveis e pertencentes a diferentes VCGs. Olarte et al. (2012) fizeram uma importante contribuição e apresentaram a primeira evidência genética que a recombinação sexual está ocorrendo em *A. flavus* através dos processos de meiose (crossing over). Além disso, foi demonstrado neste estudo que a capacidade de produzir aflatoxinas (AF) por *A. flavus* é altamente hereditária e estirpes AF- pode-se tornar AF+ caso ocorra crossing over durante a meiose. Também foi descoberto um ciclo sexual de *A. fumigatus* (O’Gorman et al., 2008), e mais recentemente em *A. nomius* (Horn et al., 2011), e é provável que ocorra a reprodução sexual em outras espécies de *Aspergillus* spp. Estes resultados indicam que a recombinação sexual é responsável pela elevada variabilidade genética encontrada em populações de *A. flavus*.

A Tabela 6 apresenta os resultados das estatísticas de G (Nei, 1987) para o estudo da diversidade dos grupos subdivididos de *A. flavus* analisados. Observa-se que o valor médio da diversidade gênica total (H_T), que é essencialmente a heterozigotidade esperada entre os *loci* analisados, foi de 0,798 e o coeficiente de diferenciação gênica (G_{ST}) foi de 0,099, o que representa baixa proporção relativa da variação genética entre os grupos

estudados. Isso pode ser devido ao grupo F ser proveniente de castanhas originárias de feira, tendo possibilidade de ser de mesma origem dos outros grupos. Por sua vez a diversidade gênica dentro das populações ($H_S = 0,719$) foi responsável por 85,9% da diversidade gênica total, indicando a existência de uma maior variabilidade dentro das populações que entre as mesmas.

Tabela 6

Análise estatística G (Nei,1987), para cada *locus* analisado.

<i>Locus</i>	Heterozigosidade estimada de Nei						
	H_S	H_T	D_{ST}	D_{ST}'	H_T'	G_{ST}	G_{ST}'
AF08	0.663	0.776	0.114	0.171	0.833	0.147	0.205
AF10	0.828	0.921	0.093	0.139	0.967	0.101	0.144
AF11	0.682	0.779	0.098	0.146	0.828	0.125	0.177
AF13	0.824	0.879	0.055	0.083	0.907	0.063	0.092
AF17	0.662	0.750	0.088	0.132	0.794	0.117	0.166
AF28	0.322	0.326	0.003	0.005	0.328	0.010	0.015
AF34	0.827	0.891	0.063	0.095	0.922	0.071	0.103
AF42	0.793	0.875	0.083	0.124	0.917	0.094	0.135
Af48	0.825	0.887	0.062	0.092	0.918	0.069	0.101
Af64	0.764	0.892	0.129	0.193	0.957	0.144	0.202
Média	0.719	0.798	0.079	0.118	0.837	0.099	0.141

H_S = diversidade gênica dentro das amostras; H_T = diversidade gênica total; D_{ST} = diversidade gênica entre as amostras, dependente do número de amostras; D_{ST}' – diversidade gênica entre as amostras, independente do número de amostras; H_T' = diversidade gênica total, independente do número de amostras; G_{ST} = estimador do parâmetro de F_{ST} , sendo G_{ST}' o estimador equivalente, independente do número de amostras.

Para a análise do grau de diferenciação genética entre as populações, foi calculado o índice F_{ST} definido por Wright e elaborado por Nei (1987), este é estimado a partir do coeficiente G_{ST} utilizando as frequências alélicas encontradas para cada *locus* estudado. O índice R_{ST} de Slatkin (1995) também é uma das medidas usadas para análise genética com o uso de marcadores moleculares microssatélites. Ele utiliza a variância dos números das repetições e é análogo ao F_{ST} , que como dito anteriormente é baseado na

variância das frequências alélicas. De acordo com Wright (1978) R_{ST} estimado inferior a 0,05 indica pouca diferenciação genética, entre 0,05 e 0,15 a diferenciação é moderada e entre 0,15 e 0,25 a diferenciação é considerada grande, enquanto um valor superior a 0,25 a diferenciação genética é muito grande. No entanto, é importante ressaltar que, mesmo baixa a estimativa de R_{ST} pode refletir uma importante diferenciação genética entre os grupos (Matsumoto e Hilsdorf 2009). O valor de R_{ST} estimado foi de 0,145 e o de F_{ST} igual a 0,141. Estas estimativas foram congruentes e significativamente diferentes de zero. O índice de divergência genética entre os grupos, baseado no valor de R_{ST} demonstra que ocorreu uma variação da ordem de 14,5% entre os grupos e de 85,5% dentro dos grupos. A distância de Nei (1987) foi calculada para os indivíduos dos três grupos. Os resultados da matriz de similaridade genética e dendograma podem ser visto na Figura 9. O coeficiente de similaridade usado para calcular a distância genética entre os 86 isolados avaliados a partir dos *locus* SSR variou de 0,7 a 1,0 com uma média de 0,96.

É possível visualizar dois grupos maiores, com indivíduos divergindo de 1 a 0,7. O maior grupo está constituído de 67 indivíduos pertencentes aos três grupos de isolados. Vários deles foram agrupados com a mesma distância genética. Como por exemplo, podemos citar F1, F5, H12, H25 e AC23 agruparam com uma distância de 0,94. O indivíduo identificado como F14 que tem como origem de castanhas-do-brasil coletadas em feira apresentou a menor distância, 0,79. Entretanto, de acordo com resultados por Tran-Dinh et al. (2009), os agrupamentos formados pela análise da variabilidade genética utilizando marcadores moleculares SSRs, não apresentou correlação com a origem geográfica dos isolados.

Também foi calculada as distâncias genéticas de Nei (1987) entre as populações que variaram de 0,5622 a 0,7287. O respectivo dendograma está apresentado na Figura 10. Pela estruturação visualizada no dendograma, evidencia-se a formação de dois grupos distintos, sendo um grupo composto por AC (Acre) com a distância aproximada de 0,24 e H (Humaitá) com 0,36. O outro grupo formado por F (feira) possui distância dos outros na ordem de 0. Podendo assim observar que o grupo F (feira) tem isolados da mesma origem que dos outros dois grupos e, como dito anteriormente, muito provavelmente devido à origem das castanhas utilizadas para o isolamento dos fungos.

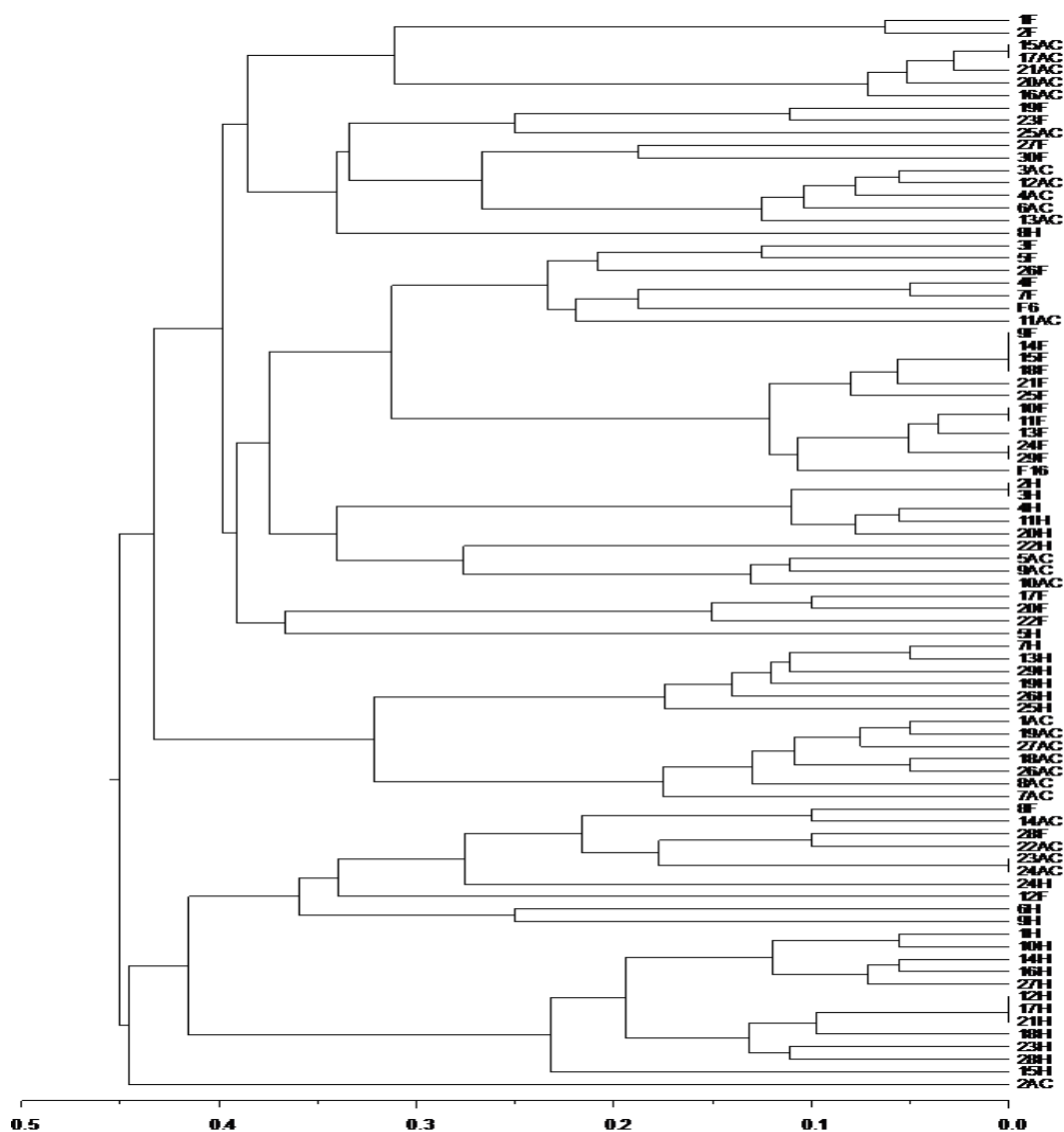


Figura 12 Dendrograma construído a partir da matriz de distância genética (Cavalli-Sforza, 1994), com base no método UPGMA (Sokal e Michener, 1958). A reconstrução filogenética foi realizada com Dambe 5.0.86 (Xia, 2001; Xia e Xie, 2001).

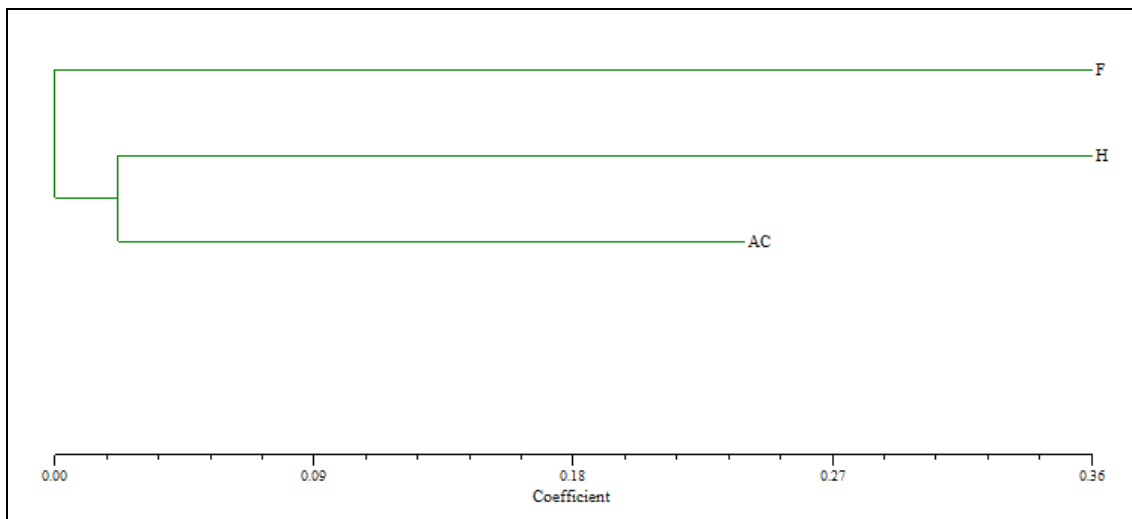


Figura 13 Dendrograma construído a partir da distância genética dos grupos de isolados de *A. flavus* de acordo com a origem da castanha (F = feira, H = Humaitá, AC = Acre).

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que os marcadores moleculares SSRs utilizados no presente trabalho mostraram ser uma ferramenta eficaz no estudo da variabilidade genética de *A. flavus*.

Os isolados analisados apresentaram grande polimorfismo entre eles. A maior variabilidade genética ocorreu dentro do grupo de isolados (85,5%), enquanto que a diversidade entre os grupos estudados foi de 14,5%, sendo considerada uma divergência moderada. Tal diferença se deve ao fato dos indivíduos do grupo F serem provenientes de castanhas-do-Brasil coletadas em feiras, existindo então a possibilidade de serem indivíduos da mesma região. Desta forma, no intuito de garantir um resultado real que represente a população de uma determinada região, recomenda-se que para o estudo da variabilidade genética de populações de fungos isolados de alimentos, as amostras devem ser preferencialmente coletadas em áreas de produção e não em armazéns ou feiras.

Entretanto, de acordo com os resultados encontrados os agrupamentos formados pela análise da variabilidade genética de *A. flavus* utilizando marcadores moleculares SSRs, não apresentou correlação com a origem geográfica dos isolados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allfenas, A. C.; Mafia, R. G. 2007. Métodos em Fitopatologia. Viçosa. Ed. UFV. 382p.

Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z. Miler, W. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17):3389-402.

Bennett J.W. 2010. An overview of the genus *Aspergillus*. In: Machida M, Gomi K, editors. *Aspergillus: molecular biology and genomics*. Norfolk: Caister Academic Press, p. 1-17.

Bhat, R.V.; Vasanthi, S.; Rao, B.S.; Nagaraj, K.V.; Bai, R.G.; Prasad, C.A.; Vanchinathan, S.; Roy, R.; Mukherjee, A.; Ghosh, P.K.; Torteja, G.S.; Saxena, B.N. 1996. Aflatoxin B1 contamination in groundnut samples collected from different geographical regions of India: a multicentre study. *Food Addit. Contam.*, 13(3):325-331.

Botstein, D.; White, R.L.; Skolmick, H. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, v.32, p.314-331, 1980.

Bowcock A.M. ; Ruiz-Linares A. ; Tomfohrde J.; Minch E.; Kidd J. R.; Cavalli-Sforza L. L. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368:455-457.

Cavalli-Sforza L.L., Menozzi P., Piazza A. 1994 *The history and geography of human genes*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Center For Integrated Fungal Research. Disponível em: <<http://www.aspergillus.org>>. Acesso em 2012.

Chalfoun, S. M.; Batista, L. R. 2003. Fungos associados a frutos e grãos do café: *Aspergillus* e *Penicilium*. *Embrapa Informação Tecnológica*. p. 69.

Chang, K.P.; Ehrlich. K. C. 2010. What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*? *International Journal of Food Microbiology*. 138:189-199.

Ciegler, A. 1978. Fungi that produce mycotoxins: conditions and occurrence. *Mycopathology*, 65:5-11.

Clement, C.R. 1993. Brasil nut. In: Clay, J.; Clement, C.R. Select species and strategies to enhance income generation from Amazonian forests. Rome, Italy: FAO, Serie Working Paper, Document Repository, p.260. Disponível em: <www.fao.org/docrep/v0784e0k.htm>. Acesso em 2012.

Coslovsky, S. V. 2005. Determinantes de sucesso na indústria da castanha – como a Bolívia desenvolveu uma indústria competitiva enquanto o Brasil ficou para trás. Rio de Janeiro, *Ebape*, 21p.

Fernandes, N.P.; Alencar, J.C. 1993. Desenvolvimento de árvores nativas em ensaios de espécies. 4. Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K), dez anos após o plantio. *Acta Amazonica*, 23(2-3):191-198.

Ferraz, R.E.; Lima, P.M.; Pereira, D.S.; Freitas, C.C.O.; Feijo, F.M.C. 2008. Microbiota fúngica de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). *Neotropical Entomology*. 37(3):345-346.

Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: *EMBRAPA*, 220 p.

Filocreão, S. M. 2008. A castanha do Pará no desenvolvimento da Amazônia. *Universidade Federal do Pará*.

Foneteque, G.V. 2011. Investigação da variabilidade genética de quinze *loci* de microssatélites em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. Lages-SC, Dissertação de mestrado. *UDESC*, p.51.

Freire, F.C.O.; Vieira, I.G.P.; Guedes, M.I.F.; Mendes, F.N.P. 2007. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: *Embrapa Agroindústria Tropical*. 48 p.

Freitas, S. P.; Freitas-Silva, O.; Miranda, I. C.; Coelho, M. A. Z. 2007. Extração e fracionamento do óleo de Castanha-do-brasil com etanol. *Ciência e tecnologia de Alimentos*. 27:14 -17.

Freitas-Silva, O.; Venâncio, A. 2010. Fungos e micotoxinas em Castanha-do-brasil. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. 18:145-178.

Geisen, R. 1998. PCR Methods for the Detection of Mycotoxins-producing Fungi. 243-267. In: Bridge, P.D.; Arora, D.K.; Reddy, C.A.; Elander, R.P. 1998. Applications of PCR in Mycology. *CAB International*, p.347.

Geiser, D. M.; Pitt, J. I.; Taylor, J. W. 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 388-393.

Grubisha, L. C.; Cotty, P. J. 2009. Twenty-four microsatellite markers for the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. *Molecular Ecology Resources*, 9:264-267.

Hanal, L. R. 2008. Desenvolvimento de marcadores SSR-EST e construção de mapas genéticos em feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Tese de doutorado. Piracicaba

Haynes, K. A.; Westerneng, T.J.; Fell, J. W.; Moens, W. 1995. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *J. Med. Vet. Mycol.* 33: 319-325.

Horn, B.W.; Moore, C.G.; Carbone, I. 2011. Sexual reproduction in aflatoxin-producing *Aspergillus nomius*. *Mycologia*, 103(1):174-183.

Horn, B.W.; Moore, G.C.; Carbone, I. 2009. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 101(3):423-429.

Idury, R. M.; Cardon, L.R. 1997. A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. *Genome Research*, 7:1104-1109.

Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Neumann, R.; Keyte, J. 1988. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Research*, 16(23): 1095-1097,

Klich, M.A.; Pitt, J.L. 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde, NSW, Australia: *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*.

LaFleur, J.R. 1993. O Mercado da castanha do Pará no Brasil. Recife: *Ecotec*, p,72.

Luo, Z.C.; Wang, D.L.; Li, R.Y.; Kong, F.R.; Li, D.M. 2000. Cloning and sequencing of the rDNA of *Aspergillus fumigatus*. *Mycosystemia* 19:336-341.

Machinski Junior, M. Moran, E.F; Siqueira, C.A.C. 2008. Aflatoxinas: Análise em amendoim por cromatografia em camada delgada In: *Toxicologia Analítica*. (Cap. 21). p. 194-199.

Magnani, M.; Fernandes, T.; Prete, C.E.C.; Homechim, M.; Ono, E.Y.S.; Vilas-Boas, L.A.; Sartori, D.; Furleneto, M.C.; Fungaro, M.H.P. 2005. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Scientia Agricola*, 62:45-49.

Matsumoto, C. K.; Hiilsdorf, A. W. S. 2009. Microsatellite variation and population genetic structure of neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. *Neotropical Ichthyology* Porto Alegre,7(3).

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Acad. Sci. U.S.A.* 70(12):3321-3323.

Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. *Columbia Univ. Press*, New York.

O'Gorman, C.M.; Fuller, H. T.; Dyer, P.S. 2009. Discovery of sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. 457:471-475.

Oishi, C.A. 2007. Resíduo da castanha da Amazônia (*Bertholletia excelsa*) como ingrediente em rações para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Manaus. Dissertação de Mestrado. *INPA/UFAM*, p.60.

Okida, G.E.M. 2009. Desenvolvimento de um método de PCR específico para a detecção de *Aspergillus flavus* aflatoxigênicos em grãos brasileiros. Brasília. Dissertação de Mestrado. *Universidade Católica de Brasília*, p.146.

Olarte, R.A.; Horn, B.W.; Dorner, J.W. 2012. Effect of sexual recombination on population diversity in aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and evidence for cryptic heterokaryosis. *Molecular Ecology*, 21: 1453-1476.

Pacheco, A. M.; Scussel, V. M. 2006. Castanha-do-brasil da floresta tropical ao consumidor. Florianópolis, SC: *Editograf*, 176p.

Park, S. D. E. 2001, Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection [Ph.D. thesis]. *University of Dublin*.

Pimentel, F. A.; Cardoso, M. G.; Batista, L. R.; Guimarães, L. G. L.; Silva, D. M. 2010. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium noctornum* (Barb. Rodr.) Bur e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*). *Acta Amazonica*. 40:213 – 220.

Pinheiro, M. R. R. 2004. Estudo da variabilidade genética de *Aspergillus flavus* como base para o desenvolvimento de PCR multiplex para a detecção de fungos produtores de aflatoxinas em Castanha-do-brasil e castanha de caju. Dissertação (Programa de pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - *Universidade Católica de Brasília*, Brasília,

Pitt, J. I.; Hocking, A. D. Fungi and food Spoilage. 2009, *Academy Press, Sydney. Springer*. 3rd ed.

Reis, M. G. Variabilidade genética de cepas de *Aspergillus flavus* isolados de amendoim. 2009. 113 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, *Universidade de São Paulo*, São Paulo.

Rohlf, F.J. 1992. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. 470p.

Saitou, N.; Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4:406-425.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Pro Natl USA*, 74(12): 5463-5467.

Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nature*, 5:63-69.

Slatkin, M. (1995) *Genetics* 139:457–462.

Sokal, R. R., and C. D. Michener. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Sci. Bull.* 28:1409-1438.

Souza, J. M. L. 2004. Manual de segurança e qualidade para a cultura da Castanha-do-brasil. *CampoPAS*, Brasília, Distrito Federal. p.60.

Sugita, C.; Makimura, K.; Uchida, K.; Yamaguchi, H.; Nagai, A. 2004. PCR identification system for the genus *aspergillus* and three major pathogenic species: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Medical Mycology*, 42(5):433-437.

Tautz, D.; Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 12:4127-4138.

Tonini, H. Castanheira-do-brasil: uma espécie chave na promoção do desenvolvimento com conservação. 2007. *Embrapa Roraima*.

Tran-Dinh, N.; Kennedy, L.; Bui, T.; Carter, D. 2009. Survey of Vietnamese Peanuts, Corn and Soil for the Presence of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, 168:257-268.

Weir, B.S.; Cockrham, C. 1984. Estimating F-statistic for analysis of population structure. *Evolution*, 36:1358-1370.

White, T.J.; Burns, T.; Lee, S.; Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelgard, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, p. 315-322.

World Health Organization. 1979. *Mycotoxins*. UNEP/WHO, Geneva.

Wright, S. 1978. Evolution and genetic population. v.4: Variability within and among natural populations. Chicago Ill: *University of Chicago Press*.

Xia, X. 2001. Data analysis in molecular biology and evolution. *Kluwer Academic Publishers*, Boston.

Xia, X., and Z. Xie. 2001. DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* 92:371-373.

Yu J, Mohawed S.M.; Bhatnagar D.; Cleveland T.E. 2003. Substrate-induced lipase gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* 95:1334-42.

Yu, K.; Park, S.J.; Poysa, V. 1999. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus vulgaris* and *Vigna*). *Genome*, 42:27-34.

Zhao, J., kong, F., Li, R., Wang, X., Wan, Z., Wang, D. 2001. Identification of *Aspergillus fumigatus* and Related Species by Nested PCR Targeting Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 2261-2266.