



## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA COLEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.

Janine Passos Lima da Silva<sup>1</sup>, Ludmila de Araújo Nunes Viana<sup>2</sup>, Erika Fraga de Souza<sup>1</sup>, Ivanilda Santos de Lima<sup>3</sup>, Marcelo Elias Fraga<sup>4</sup>, Edna Maria Morais Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pesquisadora Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Coleções de Microrganismos de Interesse da Indústria de Alimentos, [janine@ctaa.embrapa.br](mailto:janine@ctaa.embrapa.br) / [edna@ctaa.embrapa.br](mailto:edna@ctaa.embrapa.br) / [erika@ctaa.embrapa.br](mailto:erika@ctaa.embrapa.br)

<sup>2</sup> Estudante de Graduação UEZO - Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, [ludmila.anv@hotmail.com](mailto:ludmila.anv@hotmail.com)

<sup>3</sup> Bolsista CNPq/DTI-3 da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Diagnóstico Molecular e Micologia, [ivanildalima@gmail.com](mailto:ivanildalima@gmail.com)

<sup>4</sup> Prof. de Micologia do Núcleo de Pesquisa Micológica e Micotoxicológica da UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, [fraga@ufrj.br](mailto:fraga@ufrj.br)

**Resumo:** Linhagens selvagens de fungos filamentosos mantidos na Coleção de Micro-organismos de Interesse da Indústria de Alimentos da Embrapa foram, inicialmente, caracterizadas como boas produtoras das enzimas pectinases, inulinases, lipases, celulases ou tanases. Durante vinte e quatro anos, alguns desses fungos foram identificados apenas em nível de gênero, em sua maioria, *Aspergillus* e outros permaneceram sem identificação. No último ano deu-se início à (i) identificação em nível de espécie baseando-se na morfologia e nas estruturas micro e macroscópica em três meios diferentes (CYA, MEA, G25N), (ii) à genotipagem usando a técnica PCR-RAPD com primers da série OPW (Operon) e (iii) à avaliação do potencial aflatoxigênico dessas linhagens. As amostras foram identificadas como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. e *Penicillium* sp. Quanto ao potencial aflatoxigênico, nenhum dos fungos identificados apresentou potencial para produção de aflatoxina, indicando que o extrato enzimático produzido por esses fungos está livre dessa micotoxina.

**Palavras-chave:** identificação, genotipagem, potencial aflatoxigênico

### Introdução

No final da década de 80, com o objetivo de produzir enzimas para aplicação na agroindústria, fungos filamentosos, isolados de pimenta, começaram a ser guardados em solo e preservados em freezer a -20°C. Esse foi o início de um banco de micro-organismos que hoje, depois de criada a Rede



Microbiana da Plataforma Nacional de Recursos Genéticos da Embrapa, vem a ser chamar Coleção de Micro-organismos de Interesse da Indústria de Alimentos.

Inicialmente, muitos dos fungos dessa coleção eram apenas caracterizados como bons produtores de celulases, pectinases, inulinases, lipases, ou tanases e se mantiveram preservados sem identificação. Quando se deu o início ao processo de identificação morfológica, muitos desses fungos foram identificados apenas em nível de gênero. Hoje, com os recursos da biologia molecular é possível complementar o processo de identificação dos fungos da coleção.

As técnicas moleculares de RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*, RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*, vêm sendo aplicadas para a caracterização genômica (WELSH, MCCLELLAND, 1990). O diagnóstico de fungos filamentosos com potencial de produção de micotoxinas é alvo de desenvolvimento de métodos baseados em PCR - *Polymerase Chain Reaction* (NIESSEN, 2007). O objetivo deste trabalho é identificar as linhagens microbianas isoladas e avaliar o potencial das linhagens na produção de metabólitos tóxicos.

## Material e Métodos

### 1. Identificação dos fungos filamentosos

Os dez fungos estudados que tinham a nomenclatura própria da coleção de acordo com a sua caracterização (CP15, 7, 15 avicel, 20 avicel, W óleo, A' óleo, PII103°C, PIIME, T rosa do deserto2, R óleo) tiveram sua identificação baseada na taxonomia clássica, através do estudo morfológico (macroscópico e microscópico). Para o estudo macroscópico, foi observada a superfície e o reverso da colônia, quanto ao diâmetro, cor dos conídios e micélio, textura, presença de exudados e pigmentos solúveis. As estruturas microscópicas (conidióforos, células conidiogênicas e conídios) foram comparadas às apresentadas com critérios adotados por Raper & Fennell (1965), Klich & Pitt (1988), Pitt (2000), Klich (2002), Abarca et al. (2004) e Samson & Varga (2007).

### 2. Extração de DNA para sequenciamento e identificação molecular

A extração do DNA das linhagens de fungos filamentosos foi conduzida usando o kit DNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante. Em seguida, foi realizada a genotipagem usando a técnica PCR-RAPD com *primers* decaméricos da série W da Operon (OPW). Paralelamente, foi realizada a análise do potencial de produção de aflatoxinas através da condução de PCR com os *primers* para proteínas da via de biossíntese dessas micotoxinas (*aflR* e *ord-1*).

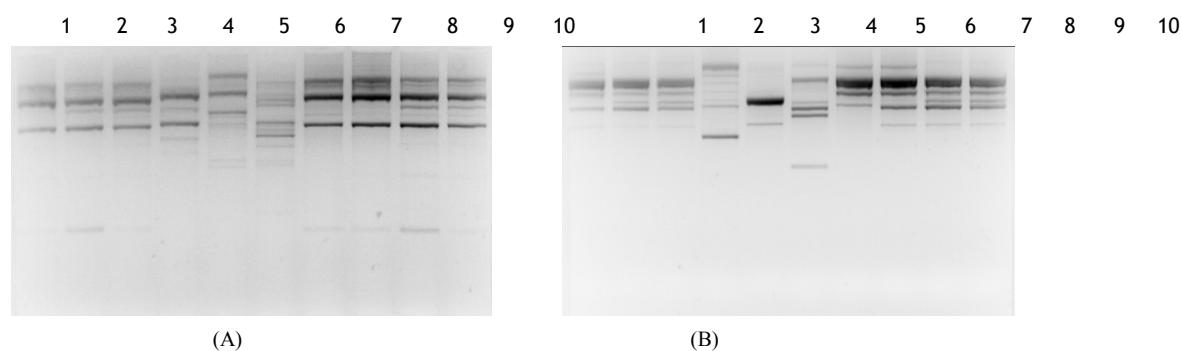
## Resultados e Discussão

De acordo com a taxonomia clássica foram identificados dois *Aspergillus* sp., quatro *Trichoderma* sp., dois *Aspergillus niger* e dois *Aspergillus flavus* de acordo com o quadro 1.

Nomenclatura	Identificação
CP 15	<i>Aspergillus</i> sp.
7	<i>Trichoderma</i> sp.
15 avicel	<i>Trichoderma</i> sp.
20 avicel	<i>Trichoderma</i> sp.
W óleo	<i>Aspergillus Níger</i>
A' óleo	<i>Aspergillus Níger</i>
PII103°C	<i>Aspergillus flavus</i>
PIIME	<i>Aspergillus</i> sp.
T rosa do deserto	<i>Trichoderma</i> sp.
R óleo	<i>Aspergillus flavus</i>

**Quadro 1:** Identificação dos fungos filamentosos.

O DNA genômico isolado das linhagens: CP 15 (29/06), 7 (06/07), 15 Avicel (29/06), 20 Avicel (06/07), T. Rosa do Deserto (06/07), R. óleo (05/07), W. óleo (05/07), A' óleo (05/07), PII 103°C (06/07), PIIME (05/07) foi usado como molde para a PCR-RAPD. As reações usando o OPW2 e OPW3 apresentaram perfis com maior número de bandas (figura 1). Posteriormente, será possível realizar uma análise de similaridade/filogenia usando os perfis de bandamento resultantes.

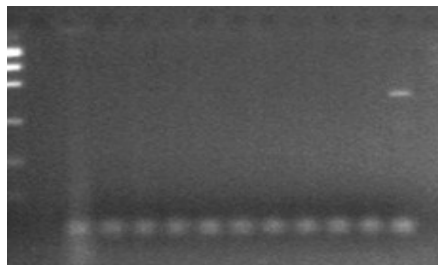


**Figura 1:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da PCR RAPD usando os primers OPW2(A) e OPW3 (B).

Na figura 2, ficou evidente que as linhagens analisadas não possuem potencial pra produção de aflatoxinas, pois somente o controle positivo (DNA de *Aspergillus flavus*) apresentou a banda característica.



P 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 CP



**Figura 2:** Eletroforese em gel agarose 1,7% dos produtos da PCR usando os *primers* para proteína da via de biossíntese de aflatoxinas (P- Padrão de Bases Low Mass; 1- CP 15 (29/06); 2- 7 (06/07); 3- 15 Avicel (29/06); 4- 20 Avicel (06/07); 5- W. óleo (05/07); 6. A' óleo (05/07); 7- PII 103°C (06/07); 8- PII ME (05/07); 9- T. Rosa do Deserto (06/07); 10- R. Gléo (05/07); CP- Controle Positivo).

### Conclusão

A genotipagem usando a técnica PCR-RAPD é uma ferramenta que complementa a identificação taxonômica clássica. Quanto ao potencial aflatoxigênico, nenhum dos fungos identificados apresentou potencial para produção de aflatoxina, indicando que o extrato enzimático produzido por esses fungos está livre dessa micotoxina.

### Agradecimentos

À Rede Microbiana de Recursos Genéticos da Embrapa.

### Referências Bibliográficas

- Abarca M.L., Accensi F., Cano J. & Cabanes F.J. Taxonomy and significance of black *aspergilli*. *Antonie van Leeuwenh.*, 86:33-49, 2004.
- Klich, M.A. *Identification of common Aspergillus species*. CBS, Utrecht, Netherlands, 2002. 116p.
- Klich M.A. & Pitt J.I. *A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs*. CSIRO, North Ryde, Australia, 1988. 116p.
- NIESSEN, L. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, v.119, p.38-46, 2007.
- Pitt J.I. *A laboratory guide to common Penicillium species*. Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC, Australia, 2000. 197p. Raper K.B. & Fennell D.I. *The genus Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1965. 686p.
- Samson R.A. & Varga J. *Aspergillus systematic in the genomic era*. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, *Studies in Mycology* 59, 2007. 207p.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research*, v. 18, p. 7212-7218, 1990.