

Uso de marcadores fenotípicos e bioquímicos para caracterização de isolados de *Aspergillus* seção *Flavi*

Couto F.A.^{1,2,3}, Santos C.⁴, Dias E.S.³, Lima N.², Batista L.R.^{3,5}

^{1,2,3}Instituto Federal Goiano, Ceres, GO, Brasil/ ²Centro de Engenharia Biológica, Micoteca da Universidade do Minho, Braga, Portugal, ³Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil, ⁴Departamento de Ciências Químicas e Recursos Naturais, BIOREN-UFRO, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, ⁵Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil.

Emails: fabiana.couto@ifgoiano.edu.br, nelson@ie.uminho.pt, esdias@dbi.ufla.br, cledir.santos@ufrontera.cl, luisrb@dca.ufla.br

Resumo

Os fungos do gênero *Aspergillus* seção *Flavi* representam uma das seções mais importantes do gênero e apresentam elevada variabilidade morfológica e bioquímica. Com o advento da abordagem polifásica, sua taxonomia tem sido constantemente revisada. O presente trabalho teve como objetivo utilizar diferentes metodologias para verificar o poder discriminatório dos métodos morfológico, bioquímico, molecular e de espectrometria de massas de isolados de *Aspergillus* seção *Flavi*. Trinta e um isolados foram analisados pelos métodos macro e micromorfológicos, potencial micotoxigênico, sequências parciais do gene da calmodulina e espectros de massas pela técnica de MALDI-TOF MS. Os dendrogramas foram gerados e os resultados foram comparados. Foi possível identificar pelo método morfológico 100% dos isolados dos quais 90,6% foram produtores de micotoxinas. Os resultados do MALDI-TOF MS apresentaram elevado poder discriminatório. Contudo, através da base de dados utilizada (SARAMIS™), não foi possível a identificação de todos os isolados por MALDI-TOF MS. Os dados da biologia molecular confirmaram todos os resultados obtidos pela caracterização morfológica. A integração dos diferentes métodos de identificação fúngica é fundamental para obter uma caracterização taxonômica eficiente, conduzindo a uma utilização segura desses fungos em processos biotecnológicos.

Palavras-chave: Identificação de fungos, MALDI-TOF, Morfologia de fungos.

Introdução

Aspergillus seção *Flavi* são fungos do subgênero *Circumdati* (Klich, 2002) considerados patógenos de humanos e animais, alérgenos e produtores de micotoxinas, sendo as principais dentro destas as aflatoxinas e o ácido ciclopiazônico (Rodrigues et al., 2009). Essas espécies representam risco à indústria de alimentos, pois provocam deterioração aos produtos agrícolas armazenados (Baquião et al., 2013).

Tradicionalmente, os fungos pertencentes à seção *Flavi* têm sido caracterizados pela técnica morfológica. Entretanto, a identificação clássica utiliza características morfológicas variáveis, por isso é considerada demorada e necessita de profissionais qualificados (Sirisomboon et al., 2013). Sendo assim, a biologia molecular tem sido uma ferramenta fundamental para complementar os dados morfológicos e permitir a correta identificação dos fungos (Simões et al., 2013). Contudo, as técnicas moleculares também apresentam limitações, pois observa-se com frequência que a similaridade genética entre as espécies da Seção *Flavi* tem dificultado a elaboração de marcadores moleculares eficientes (Rodrigues et al., 2009). Além de permitir a identificação das espécies de fungos, as técnicas moleculares também têm sido requeridas para distinguir as espécies toxigênicas das não toxigênicas, através da correlação da presença ou ausência de genes envolvidos na biossíntese das micotoxinas (Samson e Varga, 2012).

A identificação da seção *Flavi* é considerada complexa e assim como em outros grupos de fungos, está em constante evolução (Rodrigues et al., 2011). Sendo assim, é importante compreender que até ao momento nenhum método *per se*, seja ele morfológico, bioquímico ou molecular, é capaz de discriminar todas as espécies. Por esse motivo é que a abordagem polifásica tem sido fortemente apoiada pelos taxonomistas (Rodrigues et al., 2011; Simões et al., 2013). Adicionalmente, novas técnicas têm sido incluídas na abordagem polifásica para a identificação de fungos, como é o caso da técnica de MALDI-TOF MS (Rodrigues et al., 2011), que gera espectros de massa e funcionam como “impressões digitais” únicas para cada microrganismo.

O objetivo do presente estudo foi utilizar dados morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, molecular e de espectrometria de massas por MALDI-TOF MS para caracterizar 31 isolados de *Aspergillus* seção *Flavi*, oriundos da Coleção de Culturas do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA, Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras, MG, Brasil) e da Micoteca da Universidade do Minho (MUM, Braga, Portugal).

Material e métodos

Caracterização morfológica dos isolados

Vinte isolados de *Aspergillus* da seção *Flavi* foram obtidos da CCDCA (Tabela 1). Onze espécies representando linhagens tipo e de referência obtidas da MUM foram também utilizadas (*A. bertholletius*- MUM 12.11, *A. flavus*- MUM 10.232, *A. minisclerotigenes*- MUM 10.203, *A. mottae*- MUM 10.231, *A. novoparasiticus*- MUM 15.15, *A. oryzae*- MUM 10.242, *A. parasiticus*- MUM 10.201, *A. sergii*- MUM 10.219, *A. sojae*- MUM 10.241, *A. tamarisii*- MUM 00.10 e *A. transmontanensis*- MUM 10.214).

Os fungos foram crescidos em quatro meios de cultivos diferentes e padronizados: Czapeck Yeast Ágar – CYA, incubados às temperaturas de 25 e 37 °C por sete dias; Extrato de Malte- MEA a 25 °C por sete dias e Czapek – CZ a 25 °C por sete dias. Após o período de crescimento, foram observadas as características morfológicas (macro e microscópicas) descritas conforme Klich (2002). Os isolados foram cultivados no meio *A. flavus* e *A. parasiticus* Agar (AFPA; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), por cinco dias a 25 °C, no escuro.

Análise micotoxigênica

Os isolados foram cultivados em meio Yeast Extract Sucrose Agar - YES e incubados a 25 °C por sete dias. A extração das aflatoxinas foi realizada conforme Bragulat et al. (2001). As amostras foram analisadas utilizando um HPLC equipado com um detector de fluorescência Jasco FP-920. As separações cromatográficas foram realizados em uma coluna C18 (Waters Spherisorb ODS2, 4,6 mm x 250 mm, 5 mm), equipado com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária.

A produção de ácido ciclopiazônico também foi analisada. Todos os isolados foram cultivados no meio Czapeck Yeast Ágar – CYA e incubados a 25 °C por 14 dias e a extração da micotoxina seguiu o protocolo de Gqaleni et al. (1997). As amostras foram analisadas utilizando um HPLC equipado com um detector Varian 2050 UV (285 nm). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna EuroSpher 100 NH2 (Knauer, 4,6 mm x 250 mm, 5m), precedido de uma pré-coluna com a mesma fase estacionária.

Perfis proteômicos por MALDI-TOF MS

As culturas de *Aspergillus* foram cultivadas em meio de cultivo MEA e incubadas no escuro por cinco dias a 28 °C. A *Escherichia coli* DH5 α foi utilizada como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF MS. Após o período de incubação, *c.a.* de 1 μ g da mistura esporo/micélio jovem de cada microrganismo foi transferido diretamente da placa de cultura para o placa de aço inoxidável de MALDI-TOF MS. Imediatamente, 0,5 μ l de solução de matriz (75 mg/ml de ácido 2,5- diidroxibenzoico em água/etanol/acetonitrila (1:1:1) com 0,03% de ácido trifluoroacético) foram adicionados a cada poço da placa.

As análises foram realizadas em um sistema Axima LNR (Kratos Analytical, Shimadzu, UK) equipado com um laser de nitrogênio (337 nm). Após a obtenção dos espectros, as listas de picos foram exportadas para o programa SARAMIS™ (Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnostec, Germany, www.anagnostec.eu), onde se obteve a identificação microbiana, por meio de comparação das listas de picos das amostras individuais com as listas de picos disponíveis no banco de dados SARAMIS™.

Sequenciamento parcial do gene da calmodulina

Os vinte isolados de *Aspergillus* seção *Flavi* da CCDCA foram selecionados para esta análise. Após a extração do DNA, realizou-se a amplificação parcial do gene da calmodulina (primers CL1 5'-GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC-3' e CL2A 5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGAC-3'). Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel a 1% de agarose e corados com Syber Green. Os fragmentos de DNA foram visualizados e fotografados num transiluminador MiniBIS Pro, DNR. Os produtos da PCR foram sequenciados pela Macrogen Inc. (Seul, Coreia do Sul). As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados do GenBank, usando o algoritmo BLAST (National Center for Biotechnology Information, Maryland, USA). As árvores filogenéticas foram construídas pelo método de Neighbor-joining no programa MEGA5.

Resultados e discussão

Caracterização morfológica

Com base nas análises macroscópicas (CYA, CZ e MEA) e microscópicas, os 20 isolados da CCDCA distinguiram-se em três principais morfotipos: I - 13 isolados com coloração verde-claro, com conídios lisos a finamente rugosos e variação no morfotipo, sendo uni e biseriados (*A. flavus*), II - 4 isolados que apresentaram distinta cor marrom, presença de conídios globosos, com parede rugosa e predominantemente bisseriados (*A. tamarii*), e III - três isolados que apresentaram coloração verde-escuro, esporos esféricos com parede rugosa e morfotipos predominantemente uniseriados (*A. parasiticus*) (Tabela 1). Rodrigues *et al.* (2011) analisaram isolados de *Aspergillus* da seção *Flavi* e, com base nas análises morfológicas, também obtiveram três morfotipos, sendo eles *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. tamarii*. Dentre os isolados analisados neste estudo, um se destacou dos demais (CCDCA 42), pois apresentou no reverso do meio CYA 37 °C, uma coloração mais escura do que os outros isolados de *A. tamarii*. A espécie da Seção *Flavi*, *A. bertholletius* também mostrou característica diferenciada nesse meio de cultivo, com um crescimento lento (Taniwaki *et al.*, 2012). Portanto, outras análises foram necessárias para confirmar sua identificação morfológica.

Perfil micotoxigênico

As micotoxinas produzidas em vários substratos pelos fungos filamentosos também têm sido utilizadas para auxiliar o estudo taxonômico. Entre os fungos da CCDCA e da MUM, 70,96% (22/31) foram produtores de aflatoxinas, sendo 70,96% (22/31) de isolados produtores de aflatoxina do tipo B e 25,8% (8/31) do tipo G (Tabela 1). Diversos autores também têm utilizado o perfil micotoxigênico para complementar os dados taxonômicos (Silva *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2012; Taniwaki *et al.*, 2012). Para as estirpes de *A. flavus*, observaram-se diferentes padrões de síntese de aflatoxinas, de acordo com o substrato utilizado. Quarenta por cento dos isolados (6/15) de *A. flavus* sintetizaram AFLA B1 e CPA, 46,6% (7/15) produziram BI, B2 e CPA e em apenas 13,33% (2/15) dos isolados não foi detectada a síntese de micotoxinas, de acordo com a metodologia utilizada (HPLC). Os isolados de *A. tamarii* também apresentaram elevado perfil toxigênico pois 100% (4/4) dos isolados não produziram aflatoxinas, mas sintetizaram ácido ciclopiazônico. Observou-se que o perfil micotoxigênico de *A. parasiticus* foi bem consistente, pois sintetizou AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 e não produziu CPA (Tab 1).

Tabela 1 Marcadores morfológicos e bioquímicos utilizados na identificação dos isolados *Aspergillus* seção *Flavi*

Código da Coleção	Origem dos isolados			Perfil químico						
	Classificação fenotípica	Origem	Diâmetro dos conídios (µm)	Textura	Seriação	AFLA B1	AFLA B2	AFLA G1	AFLA G2	CPA
MUM 12.11	<i>A. bertholletius</i>	Castanha do Brasil	6.0	f/e	u	-	-	-	-	+
CCDCA 044	<i>A. flavus</i>	Pimenta	4.5	l	b	+	-	-	-	-
CCDCA 046	<i>A. flavus</i>	Uva	4.5	l	b	+	+	-	-	+
CCDCA 047	<i>A. flavus</i>	Ração Humana	3.8	l	b	+	-	-	-	+
CCDCA 048	<i>A. flavus</i>	Café	3.5	l	u/b	+	-	-	-	+
CCDCA 049	<i>A. flavus</i>	Café	4.0	l	b	+	+	-	-	+
CCDCA 050	<i>A. flavus</i>	Uva	4.0	l	b	+	-	-	-	+
CCDCA 051	<i>A. flavus</i>	Uva	4.5	f/r	u/b	+	+	-	-	+
CCDCA 052	<i>A. flavus</i>	Ração Humana	4.5	f/r	u/b	+	-	-	-	+
CCDCA 053	<i>A. flavus</i>	Pimenta	4.5	l	u/b	n/d	n/d	-	-	+
CCDCA 054	<i>A. flavus</i>	Ração Humana	3.8	f/r	b	+	+	-	-	+
CCDCA 055	<i>A. flavus</i>	Ração Humana	3.8	l	u/b	+	-	-	-	+
CCDCA 056	<i>A. flavus</i>	Uva	4.3	l	u/b	+	+	-	-	+
CCDCA 057	<i>A. flavus</i>	Café	4.5	f/r	u/b	n/d	n/d	-	-	-
CCDCA 058	<i>A. flavus</i>	Ração Humana	4.5	f/r	u/b	+	+	-	-	+
MUM 10.232	<i>A. flavus</i>	Milho	4.8	l	b	+	+	-	-	+
MUM 10.203	<i>A. minisclerotigenes</i>	Fruto de Prunus dulcis	3.5	l	b	+	+	-	-	+
MUM 10.231	<i>A. mottae</i>	Milho	3.5	f/r	b	+	+	+	+	+
MUM 15.15	<i>A. novoparasiticus</i>	-	3.5	r	b	+	+	+	+	-
MUM 10.242	<i>A. oryzae</i>	-	4.5	f/r	u	-	-	-	-	+
CCDCA 043	<i>A. parasiticus</i>	Café	4.5	r	u	+	+	+	+	-
CCDCA 045	<i>A. parasiticus</i>	Café	4.5	r	u/b	+	+	+	+	-
CCDCA 059	<i>A. parasiticus</i>	Uva	4.5	r	u	+	+	+	+	-
MUM 10.201	<i>A. parasiticus</i>	Fruto de Prunus dulcis	4.5		u	+	+	+	+	-
MUM 10.219	<i>A. sergii</i>	Fruto de Prunus dulcis	3.5	r	u	+	+	+	+	+
MUM 10.241	<i>A. sojae</i>	-	4.5	f/r	u	-	-	-	-	-
CCDCA 041	<i>A. tamarii</i>	Café	5.0	r	b	-	-	-	-	+
CCDCA 042	<i>A. tamarii</i>	Ração Humana	5.5	r	b	-	-	-	-	+
CCDCA 060	<i>A. tamarii</i>	Uva	5.0	r	b	-	-	-	-	+
MUM 00.10	<i>A. tamarii</i>	Fruto de Prunus dulcis	5.0	r	b	-	-	-	-	+
MUM 10.214	<i>A. transmontanensis</i>	Fruto de Prunus dulcis	4.5	r	b	+	+	+	+	-

u: uniseriado; b: bisseriado; n/d: não detectado; AFLA: aflatoxina; CPA: ácido ciclopiazônico; l:liso; f/r: finamente rugoso; r: rugoso; f/e: finamente; equinulado e n/d: não detectado.

Além das aflatoxinas, os fungos da Seção *Flavi* também são conhecidos por produzirem outro tipo de micotoxina, conhecida como ácido ciclopiazônico (Chang *et al.*, 2009). No presente trabalho, 70,96% (22/31) dos isolados foram produtores de CPA. As principais espécies conhecidas como produtoras de CPA são *A. flavus* e *A. tamarii*, mas *A. parasiticus* não sintetiza essa micotoxina (Rodrigues *et al.*, 2009).

Análise por MALDI-TOF MS

Os 31 isolados de *Aspergillus* da seção *Flavi* utilizados neste estudo foram agrupados em 13 diferentes *clusters*. Observa-se que a análise de MALDI-TOF MS permitiu discriminar espécies morfológicas e bioquimicamente relacionadas (Figura 1).

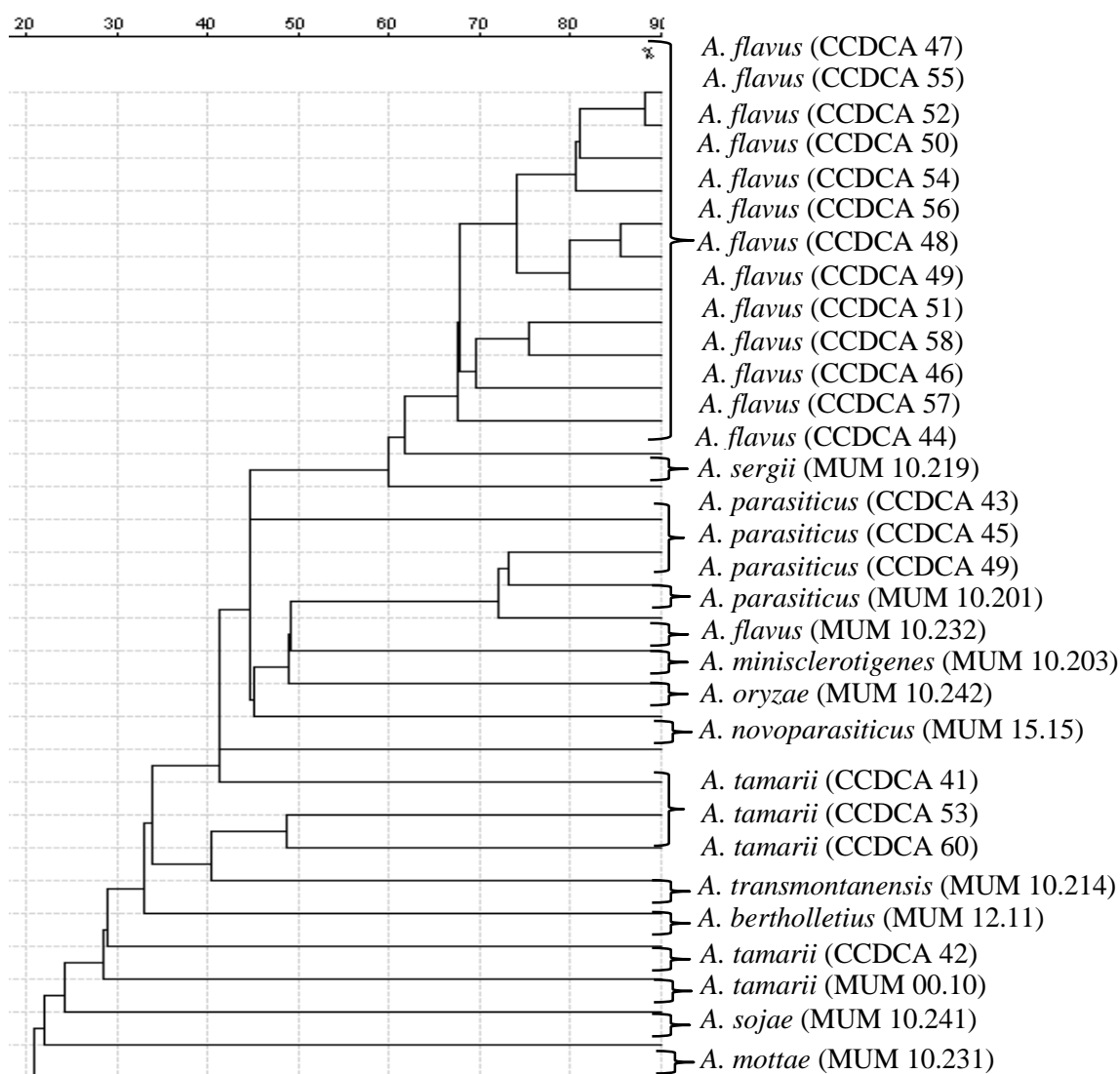


Figura 1 Dendrograma construído com base das massas de proteínas obtidas no MALDI-TOF MS das linhagens de *Aspergillus* seção *Flavi*.

Os isolados da MUM não se agruparam com os isolados da CCDCA, pois o método de armazenamento utilizado pelas duas coleções de cultura influenciou na análise de proteínas. Através desses biomarcadores, o isolado (CCDCA 42) identificado morfologicamente como *A. tamaritii* não se agrupou com os demais *A. tamaritii*. Portanto, a análise de biologia molecular foi necessária para esclarecer esses resultados. Neste trabalho observa-se pela primeira vez o perfil proteômico das espécies *A. novoparasiticus* e *A. bertholletius* e o agrupamento dessas com as outras espécies pertencentes à seção *Flavi*. Por meio do número e das massas de proteínas, essas espécies notoriamente formaram grupos separados das demais espécies.

Identificação molecular

A confirmação da identificação morfológica e por perfis proteômicos (MALDI-TOF MS) dos 20 isolados da CCDCA foi realizada através de análises de biologia molecular. A Figura 2 apresenta a árvore filogenética obtida a partir do sequenciamento parcial do gene da calmodulina.

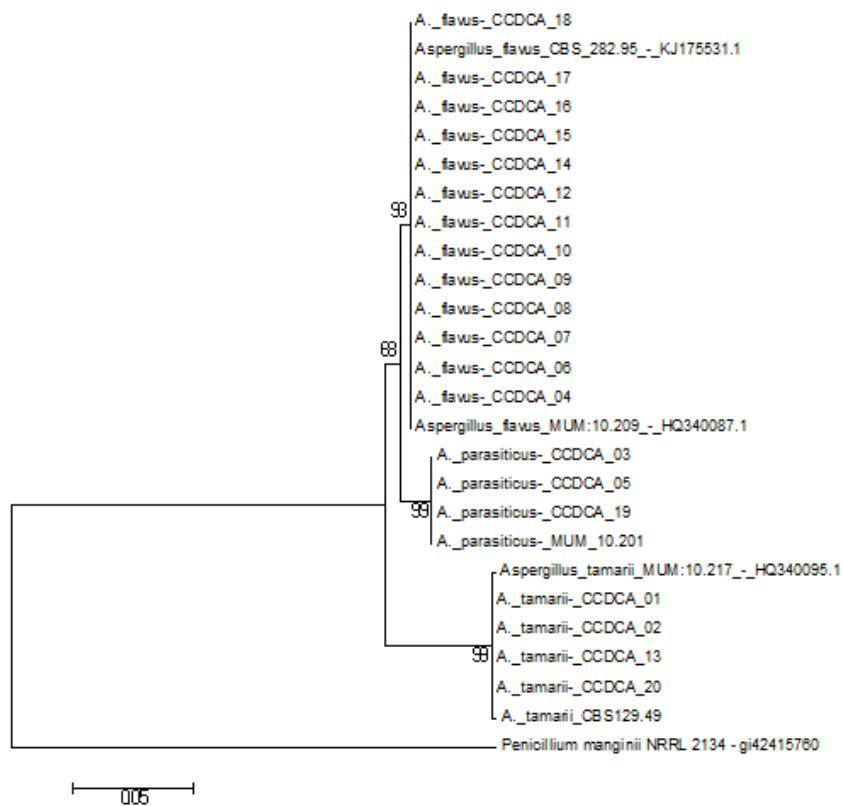


Figura 2 Árvore filogenética (Neighbor Joining) baseada no sequenciamento parcial do gene da calmodulina dos isolados da CCDCA e de seqüências de referência obtidas do GenBank.

O resultado da biologia molecular confirmou a identificação dos 20 isolados da CCDCA identificados morfológicamente, incluindo o isolado CCDCA 42, identificado como *A. tamarii*, mas que não se agrupou com os isolados dessa espécie pelos dados da técnica de MALDI-TOF MS. Novos estudos precisam ser conduzidos com maior número de isolados de *A. tamarii*, provenientes de diferentes origens geográficas. Neste caso, utilizando-se o sequenciamento de outras regiões do genoma, para verificar se existem espécies crípticas dentro da espécie *Aspergillus tamarii*.

Conclusões

O uso dos métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares permitiu uma identificação mais precisa das espécies da Seção *Flavi* preservadas na CCDCA.

Esses dados mostram a robustez da técnica morfológica, pois 100% dos isolados identificados pela análise morfológica foram confirmados por biologia molecular e quando a morfologia é comparada aos perfis proteômicos (MALDI-TOF MS) para identificação de fungos, obteve-se 95% de confiabilidade.

Referências

Baquião AC, Oliveira MMM, Reis TA, Zorzete P, Atayde DD, Correa B (2013) Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. Food Chemistry 139: 1127 – 1132.

Bragulat MR, Abarca ML, Cabañes FJ (2001) An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. Int J Food Microbiol 71: 139 -144.

Brase S, Encinas A, Keck J, Nising CF (2009) Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites. Chemical Reviews 109: 3903- 3990.

Gqleni N, Smith JE, Lacey J, Gettinby G (1997) Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. Appl Environ Microb 63: 1048 -1053.

Klich MA (2002) Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. Mycologia 94: 21–27.

Rodrigues P, Venâncio A, Kozakiewicz Z (2009) A polyphasic approach to the identification and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *Int J Food Microbiol* 129:187–193.

Rodrigues P, Santos C, Venâncio A, Lima N (2011) Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *J Appl Microbiol* 111: 877-892.

Samson R, Varga J (2012) Molecular Systematics of *Aspergillus* and its Teleomorphs. In *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press. Wymondham, UK.

Santos C, Fraga ME, Kozakiewicz Z, Lima N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Res Microbiol* 161: 168-175.

Silva FC, Chalfoun SM, Batista LR, Santos C, Lima N (2015) Use of polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from commodities in Brazil. *Ann Microbiol* 1-11.

Simões MF, Pereira L, Santos C, Lima N (2013) Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: concepts and applications. In: Malik, A., Grohmann, E., Alves, M. (eds.) *Management of Microbial Resources in the Environment*. Springer, The Netherlands, 91-117.

Sirisomboon C, Putthang R, Sirisomboon P (2013) Application of near infrared spectroscopy to detect aflatoxigenic fungal contamination in rice. *Food Control* 33: 207-214.

Soares C, Rodrigues P, Peterson SW, Lima N, Venâncio A (2012) Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. *Mycologia* 104: 682–697.

Taniwaki M, Pitt J, Iamanaka B, Sartori D, Copetti M, Balaiee A, Fngaro MH, Frisvad JC (2012) *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. *Plos one* 7: 1-7.

AGRADECIMENTOS

Fabiana Couto agradece à CAPES (Brasil), pela concessão da bolsa do PDSE- Proc.8161-12-7.