



POLIANA PATRÍCIA LIMA

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES,
POTENCIAL TOXIGÊNICO E RELAÇÕES BIOLÓGICAS DE
Aspergillus SEÇÃO *Flavi* EM AMENDOIM**

**LAVRAS-MG
2018**

POLIANA PATRÍCIA LIMA

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES, POTENCIAL TOXIGÊNICO E
RELAÇÕES BIOLÓGICAS DE *Aspergillus* SEÇÃO *Flavi* EM AMENDOIM**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. José da Cruz Machado
Orientador

**LAVRAS-MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Lima, Poliana Patrícia.

Aspectos morfológicos e moleculares, potencial toxigênico e
relações biológicas de *Aspergillus* seção *Flavi* em amendoim /
Poliana Patrícia Lima. - 2018.

67 p. : il.

Orientador(a): José da Cruz Machado.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.
Bibliografia.

1. Aflatoxinas. 2. Germinação. 3. Vigor. I. Machado, José da
Cruz. II. Título.

POLIANA PATRÍCIA LIMA

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES, POTENCIAL TOXIGÊNICO E
RELAÇÕES BIOLÓGICAS DE *Aspergillus* SEÇÃO *Flavi* EM AMENDOIM**

**MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ASPECTS, TOXIGENIC POTENTIAL
AND BIOLOGICALS RELATIONS OF *Aspergillus* SECTION *Flavi* IN PEANUT**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

Aprovada em 31 de Agosto de 2018.
Dra. Antônia dos Reis Figueira - UFLA
Dr. José Maurício Pereira - MAPA
Dr. João Almir Oliveira - UFLA
Dra. Sara Maria Chalfoun Sousa - EPAMIG

Prof. Dr. José da Cruz Machado
Orientador

**LAVRAS-MG
2018**

Aos meus pais Joaquim e Luzia pela compreensão e apoio.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus por toda bondade e por todos os sonhos e realizações por ele permitidos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade.

À CAPES, CNPQ e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Dr. José da Cruz Machado pelos ensinamentos e colaboração.

Aos mestres por dividirem seus conhecimentos.

Aos professores Luís Roberto Batista e Eduardo Alves por cederem espaço para realização de parte dos experimentos.

Aos membros da banca pela contribuição e disponibilidade.

Aos amigos do laboratório de Patologia de Sementes pela amizade. Em especial Iara e

Bárbara pela ajuda na condução e finalização deste projeto.

Aos meus pais pelo apoio, compreensão e por todos os ensinamentos ao longo da vida.

À minha irmã Vanessa pela amizade e companheirismo.

Ao meu namorado Rafael pela cumplicidade, paciência e por toda ajuda.

À minha família e amigos pela torcida.

Às amigas de república por tornarem a caminhada mais fácil.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

O setor agrícola é um dos suportes mais sólidos da economia brasileira, contribuindo com cerca de 30% do PIB nacional. Devido a esta importância, a Agricultura brasileira se encontra em constante desenvolvimento, sendo o aumento da produtividade um alvo que tem sido tratado como prioridade imediata. Fruto deste desenvolvimento surge uma crescente preocupação com a qualidade dos produtos oferecidos. No caso do amendoim a presença de micotoxinas produzidas principalmente por fungos do gênero *Aspergillus* seção *Flavi* merece atenção especial, uma vez que oferecem grandes riscos à saúde humana e animal. O objetivo no presente trabalho foi identificar por meio de técnicas moleculares e morfológicas as espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* presentes em grãos de amendoim de diferentes regiões brasileiras e sua relação com qualidade de sementes, além do potencial de produção de aflatoxinas destes isolados assim como o potencial de produção das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 destes isolados. As relações biológicas entre sementes de amendoim e *Aspergillus flavus* com diferentes potenciais de inóculo, foram estudadas sob condições de ambiente natural e controlado, verificando os efeitos em sementes armazenadas e não armazenadas e a taxa de transmissão de *A. flavus* de sementes para plantas. A identificação morfológica foi realizada em 107 isolados e mostrou que a maioria das espécies encontradas são de *A. flavus*. Além desta espécie foram encontradas *A. parasiticus* e *A. tamaritii*. Por meio da análise molecular foi possível realizar a confirmação destas espécies e identificar outras como *A. caelatus* e *A. minisclerotigenes*. A análise de produção de aflatoxinas demonstrou que 87% dos isolados são produtores de aflatoxina B1 e aflatoxina B2 e 5,06% produziram também aflatoxina G1 e aflatoxina G2. Os resultados dos estudos de relações biológicas mostraram que no geral o potencial de inóculo mais elevado (96 horas de exposição das sementes ao patógeno) provocou danos elevados às sementes, tanto armazenadas como não armazenadas. A germinação foi afetada em todos potenciais de inóculo testados e a incidência do fungo apresentou aumentos proporcionais ao aumento do potencial de inóculo. As sementes armazenadas em condições naturais apresentaram menores valores de germinação e maiores incidências do patógeno. No entanto, nas duas condições de armazenamento houve redução destes parâmetros. O vigor das sementes foi também significativamente afetado. O potencial de transmissão do fungo a partir de sementes contaminadas foi da ordem de 21%, sendo o fungo isolado mais comumente da inserção cotiledonar das plantas emergidas e no maior potencial de inóculo usado para este estudo. Com o presente trabalho conclui-se que existem diferentes espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* associadas com a cultura do amendoim e grande parte dos isolados estudados são produtores de aflatoxinas. Os efeitos causados pelo patógeno no desempenho de sementes de amendoim foram drásticos principalmente nos maiores níveis de potencial de inóculo deste patógeno nas sementes e a taxa de transmissão foi de 21% nas sementes expostas por mais tempo ao patógeno.

Palavras-chave: Aflatoxinas. *Arachis hypogaea*. Germinação. Vigor.

ABSTRACT

The agriculture is the most important sector in Brazil's economy and it contributes with 30% of the national GDP (Gross Domestic Product). Brazilian's Agriculture is in constant development, as consequence, there is a growing concern about the quality of the products that are offered. The mycotoxins presence, produced mainly in the *Aspergillus Flavi* section, in peanuts deserves special attention, because it can cause risks to the human and animal health. The aim of the work was to identify the *Aspergillus Flavi* section species present in peanut grains from different Brazilian regions, using molecular and morphological tools, and the production of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 these isolates. The biological relations between peanut seeds and *Aspergillus flavus* were verified checking the effects of seeds inoculated with different potential and stored under natural and controlled environmental and the transmission rate of *A. flavus* seeds to plants. The morphological identification was performed in 107 isolated fungus and showed that most of the species found in the analyses were: *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. tamarii*. In the molecular analysis was possible to confirm these species and to identify others, such as *A. caelatus* and *A. minisclerotigenes*. The aflatoxin analysis showed that 87% of the isolated fungus are producers of aflatoxin B1 and B2, and 5.06% of isolated fungus are producer of aflatoxin G1 and G2. The results of the biological relations studies showed that in general the highest inoculum potential (seeds exposure by 96 hours in the pathogen colony) caused high damage to the seeds, in both environments (stored and non-stored). According to the results, the different inoculums potential affected the germination test and the fungal incidence and showed proportional increase of the inoculum potential. In the natural conditions the seed germination percentage was lower, while the pathogen incidence was higher in the seeds. However, these parameters were reduced in both storage conditions and the seed vigor was significantly affected. The fungal transmission of contaminated seeds was 21%, being isolated from the cotyledonary insertion of plants and the highest inoculum potential used for this study. In the present work, we conclude that there are different *Aspergillus* species of the section *Flavi* associated with the peanut culture and the biggest part of the isolated fungus that were studied are aflatoxin producers. The effects caused by the pathogen on the peanut seeds were drastic, mainly in the higher inoculum potential level in the seeds, and the transmission rate was 21% in the seeds exposed to the pathogen for a longer period of time.

Keywords: Aflatoxins. *Arachis hypogaea*. Germination. Vigor.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 Cultura do amendoim	11
3.2 Gênero <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	13
2.3. Associação de fungos com sementes de amendoim	14
3.4 Produção de micotoxinas em sementes e grãos de amendoim	16
3.5 Identificação e detecção de isolados toxigênicos de <i>Aspergillus</i>	18
REFERÊNCIAS	20
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	26
ARTIGO 1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS DE <i>Aspergillus</i> SEÇÃO <i>Flavi</i> PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE AMENDOIM COLETADAS EM DIFERENTES REGIÕES NO BRASIL	26
1 Introdução	29
2 Material e métodos	30
2.1 Obtenção de isolados	30
2.2 Caracterização morfológica dos isolados	31
2.3 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento	32
2.4 Detecção de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ pelo método Plug Ágar	33
3 Resultados	33
3.1 Identificação morfológica das espécies	34
3.2 Identificação molecular dos isolados	34
3.3 Potencial produtivo de aflatoxinas	40
4 Discussão	40
Referências	42
ARTIGO 2 EFEITOS E TRANSMISSÃO DE <i>Aspergillus flavus</i> POR SEMENTES DE AMENDOIM	45
1 Introdução	48
2 Material e métodos	49
3 Resultados	52
4 Discussão	54
APÊNDICE A - Registros de temperatura e umidade atmosférica nos locais de cultivo de amendoim	61

APÊNDICE B - Registros de temperatura e umidade atmosférica nos locais de armazenamento do amendoim.....	62
Referências	63
CONSIDERAÇÕES GERAIS	66

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Entre os segmentos que mais contribuem para o desenvolvimento econômico e social do Brasil encontra-se o setor agrícola, cuja participação no PIB nacional é da ordem de 30%. Segundo dados do IBGE (2018) o crescimento acumulado da Agropecuária em 2017 foi de 13%, enquanto alguns setores apresentaram contribuição negativa. Dentre os produtos agrícolas produzidos no Brasil está o amendoim (*Arachis hypogaea* L.), cujo o país ocupa a 16^o posição no ranking dos produtores mundiais desta cultura. A produção na safra 2017/2018 foi de 511,5 mil toneladas e a taxa de crescimento da produção nacional desta oleaginosa foi de 3,58% ao ano entre 1975 e 2015 (CONAB, 2018). Dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) mostram que o aumento da produtividade é responsável por 90% desse crescimento.

Diante do desafio de se obter aumentos de produtividade no setor agrícola brasileiro, tendo como princípio a manutenção das áreas atuais de cultivo, surge entre várias preocupações a qualidade sanitária dos produtos, como sementes e aqueles destinados a alimentação humana e animal. A contaminação de alimentos de origem agrícola com micotoxinas produzidas por determinados fungos constitui uma das maiores preocupações entre os produtores e consumidores, uma vez que estas toxinas podem provocar efeitos carcinogênicos, imunossupressores, mutagênicos e graves doenças em humanos e animais, além de perdas econômicas diretas e indiretas.

Espécies de fungos dos gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* dentre outros podem produzir micotoxinas. No caso das espécies de *Aspergillus* as principais micotoxinas produzidas são a aflatoxina e a ocratoxina. Na cultura do amendoim a produção de aflatoxinas tem merecido atenção especial, sendo elas produzidas por *Aspergillus* da seção *Flavi*. Nesta cultura as aflatoxinas podem ser do tipo B₁, B₂, G₁ e G₂, sendo que a aflatoxina B₁ é considerada a de maior risco à saúde humana. As espécies desta seção geralmente provocam danos principalmente em sementes e grãos que permanecem armazenados, sabendo-se, no entanto, que o processo de contaminação pode ser estabelecido nos campos de cultivo (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2015; ZAIN, 2011). Estes fungos podem causar danos que afetam a qualidade fisiológica das sementes, como redução da germinação e perda de vigor, além do desenvolvimento das plantas.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o MAPA são responsáveis por estabelecer os limites máximos tolerados de micotoxinas nos alimentos destinados ao consumo humano e animal no Brasil. A Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011 estabelece limite máximo tolerado de aflatoxinas totais (B₁, B₂, G₁ e G₂) de 20 µg/Kg em amendoim com casca, descascado, cru ou torrado, pasta de amendoim ou manteiga de amendoim.

O armazenamento de grãos em condições adequadas pode contribuir para um melhor controle da proliferação desses microrganismos e a identificação correta desses agentes, assim como, a detecção e quantificação de micotoxinas são de extrema importância em termos de segurança de alimento. O efeito dos fungos toxigênicos na qualidade de sementes de amendoim é pouco abordado na literatura, havendo portanto a necessidade de pesquisas mais pontuais neste tema.

No âmbito dos estudos sobre efeitos de espécies de *Aspergillus* na qualidade de sementes de amendoim nas condições brasileiras pouco se conhece e se dispõe aos agricultores em diversos níveis.

Diante do exposto, o objetivo no presente trabalho foi identificar as espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* associadas com amostras de grãos e sementes de amendoim coletados em diferentes regiões brasileiras, verificar o potencial de produção de aflatoxinas destes isolados e avaliar as relações entre sementes de amendoim e *Aspergillus flavus* considerando os efeitos do patógeno no desempenho das sementes e a sua taxa de transmissão por esta via.

2 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cultura do amendoim

A produção mundial de amendoim na safra de 2015/2016 foi de 39,5 milhões de toneladas, segundo dados da INC (2016). O principal produtor é a China, atingindo a marca de 16,7 milhões de toneladas, seguida pela Índia e Nigéria. O Brasil é o 16º produtor no cenário mundial, no entanto, está entre os países que mais exportam este produto, sendo exportados em torno de 106 mil toneladas em 2016. Os principais importadores de amendoim são Indonésia, Holanda e Vietnã e os maiores exportadores são os Estados Unidos e a Índia. A produção

brasileira de amendoim na safra de 2017/2018 foi em torno de 511,5 mil toneladas, sendo o estado de São Paulo o maior produtor, com cerca de 90% da produção nacional (CONAB, 2017).

O amendoim pode ser cultivado em duas épocas: a primeira ocorre entre setembro e outubro, com colheita entre março e abril e a segunda entre janeiro e fevereiro. Estima-se que a área total plantada na safra de 2017/2018 tenha sido de 145,3 mil ha, com a produtividade girando em torno de 3.438 kg/ha. O fator climático de maior importância para o crescimento e desenvolvimento desta planta é a temperatura. A cultura apresenta metabolismo fotossintético C3 e a taxa fotossintética líquida máxima a 30°C. A velocidade de germinação das sementes atinge nível máximo quando a temperatura se encontra entre 32 e 34°C, sendo reduzida em temperaturas inferiores a 18°C. Quando cultivado em temperaturas abaixo do ideal a planta apresenta a fase vegetativa prolongada, adiando o início da floração (EMBRAPA, 2009).

Dentre as oleaginosas comestíveis, o amendoim é considerado uma das de maior rendimento industrial, com aproveitamento em torno de 40% para óleo e 50% para farelo, podendo ser utilizado ainda no consumo *in natura* e para fabricação de doces (AMORIM et al, 2010). No estado de São Paulo a produção de amendoim está vinculada a produção de cana-de-açúcar, sendo bem consolidada em sistema de rotação de cultura, uma vez que esta prática promove aumentos significativos na produção de cana, além de proteger o solo contra erosão e evitar a multiplicação de plantas espontâneas (AMBROSANO et al., 2011, BARBOSA et al., 2014).

Diante da grande importância do agronegócio brasileiro no cenário mundial, com grande produção e exportação de produtos agrícolas, além do abastecimento interno, é imperativo o emprego de medidas que possam garantir a qualidade e segurança do produto final, atendendo assim os padrões de qualidade exigidos mundialmente. Um fator de relevância durante toda a cadeia produtiva está relacionado à qualidade sanitária desses produtos, que estão sujeitos ao desenvolvimento de patógenos que podem reduzir a produtividade ou torná-los inapropriados para consumo.

A cultura do amendoim é afetada por diversos patógenos, dentre eles fungos causadores de doenças foliares e do sistema radicular durante o desenvolvimento da cultura no campo de produção, como *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora arachidicola*, *Cercosporidium personatum*, *Puccinia arachidis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* e alguns fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, que podem causar problemas no campo e no armazenamento, sendo prejudicial à qualidade dos

produtos (NAKAGAWA e ROSOLEM, 2011). Fatores climáticos como temperatura e umidade, juntamente com o nível de potencial de inóculo desses patógenos nos grãos podem influenciar o desenvolvimento do patógeno no armazenamento, onde são preocupantes devido à possibilidade de produção de micotoxinas.

A contaminação de produtos agrícolas por micotoxinas pode resultar em efeitos diretos e indiretos, como a perda do valor do produto no mercado, danos à saúde de animais e humanos, perda de animais, maior custo de vigilância das doenças de origem alimentar, entre outros (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2015). As perdas econômicas podem chegar a 100% quando os níveis de micotoxinas são superiores aos padrões aceitos para comercialização.

3.2 Gênero *Aspergillus* seção *Flavi*

Espécies do gênero *Aspergillus* têm alto impacto social e econômico, uma vez que os fungos pertencentes a este grupo podem se desenvolver em vários substratos e são conhecidos por danificar alimentos, produzir micotoxinas e pela sua capacidade de causar danos à saúde humana e animal. Em função de sua diversidade na produção de metabólitos, as espécies de *Aspergillus* apresentam, por outro lado, um grande potencial biotecnológico, podendo ser utilizadas na indústria alimentícia e farmacêutica (PALENCIA et al., 2010, SAMSON et al., 2014).

O gênero *Aspergillus* foi descrito por Micheli, em 1729, com o intuito de incluir os fungos que possuem conidióforos longos e uma estrutura na extremidade, denominada vesícula, na qual irradiam longa cadeia de esporos. Tal gênero engloba um grupo de fungos filamentosos que possui mais de 200 milhões de anos de evolução, sendo encontrados em solo, vegetação, água e ar (MESQUITA, 2012). É um gênero pertencente à família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, subclasse Eurotiomycetidae, classe Eurotiomycetes e filo Ascomycota. Possui reprodução assexuada e caracteriza-se pela produção de fiáldes e conídios em cadeia e algumas espécies podem produzir esclerócios.

A taxonomia do grupo *Aspergillus* seção *Flavi* apresenta uma certa complexidade e está em constante evolução. Existe uma divisão de duas classes nesta seção, baseada nos efeitos que os fungos podem provocar. Na primeira classe encontram-se as espécies potencialmente produtoras de aflatoxinas, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. parvisclerotigenus*, *A. arachidicola* e *A. minisclerotigenes*. A segunda classe é

composta pelas espécies não produtoras de aflatoxinas, englobando *A. sojae*, *A. oryzae*, *A. tamarii* e *A. caelatus* (MIDORIKAWA, 2014).

A. flavus se destaca entre as principais espécies nocivas à saúde humana e animal, além de possuir capacidade de infectar várias espécies de plantas, como por exemplo milho, feijão, amendoim e castanhas. As condições edafoclimáticas são fatores determinantes para o desenvolvimento deste fungo, assim como para a produção de micotoxinas. As principais micotoxinas produzidas por *A. flavus* são as aflatoxinas B₁ e B₂, que de acordo Kwiatkowski e Alveas (2007) constituem a segunda causa mais comum de aspergilose invasiva e não invasiva em humanos e animais.

Aspergillus flavus e *A. parasiticus* estão intimamente relacionados, no entanto podem ser separados com base nas sequências de DNA. Pela produção de micotoxinas também é possível distinguí-los, uma vez que *A. parasiticus* além de produzir as aflatoxinas B₁ e B₂, produz também a G₁ e G₂. Além da diferença na produção de micotoxinas, a cor da colônia e a textura da parede dos conídios também apresentam diferenças. Já a espécie *A. tamarii*, a coloração da colônia também é distinta das espécies já citadas, apresentando uma cor castanho-bronze e podendo ser utilizada na fermentação de alimentos e aplicados na indústria para a produção de enzimas, já que não é produtora de aflatoxinas (KUMEDA e ASAO, 2001).

2.3. Associação de fungos com sementes de amendoim

As sementes são essências na produção de alimentos para grande parte da população mundial, além de que 90% das lavouras dependem das sementes para sua propagação. A associação entre microrganismos e sementes é responsável pela ocorrência de várias doenças de importância agrícola e pela produção de micotoxinas em grãos, que causam sérios danos em seres humanos e animais. Inúmeras doenças são causadas por patógenos veiculados por sementes e para alguns deles a semente é a única maneira de sobreviver entre safras e por longos períodos de armazenamento (MACHADO, 1988; NEERGARD, 1979).

Dentre os microrganismos que causam doenças em plantas, os fungos são considerados os principais em associação às sementes e grãos. Esta associação é capaz de afetar a qualidade fisiológica das sementes, na forma de redução de germinação e vigor, além de diminuir o teor de carboidratos e outros compostos que indicam a qualidade dos grãos utilizados na produção de alimentos. Diversos estudos relatam os fungos de armazenamento como importantes agentes no processo de deterioração de sementes e grãos com destaque para as espécies de *Aspergillus*

e *Penicillium* (BERJAK, 1987; HENNING, 2005; BELLETTINI et al., 2005; BORÉM et al., 2006; PARRELLA et al., 2012).

De maneira geral, a deterioração de grãos e sementes começa ainda no campo de produção. No momento da colheita o amendoim geralmente apresenta cerca de 40% de umidade. Com teores acima de 22% de umidade a atividade metabólica da vagem oferece resistência à penetração do fungo, sendo o risco de contaminação reduzido. Com a intenção de reduzir a umidade das sementes, após o arranquio as plantas são enleiradas e submetidas à secagem no campo até atingirem a umidade média de 10%, já que abaixo de 11% não há umidade suficiente para o desenvolvimento do fungo (NAKAGAWA e ROSOLEM, 2011).

O inóculo primário é a base do desenvolvimento de epidemias, constituindo-se em um meio pelo qual os patógenos podem permanecer viáveis nesta interação, por longos períodos de tempo, quando as sementes estão armazenadas, afetando a qualidade do produto final (MACHADO, 1988). Em alguns casos o patógeno infecta as sementes de forma sistêmica, onde o mesmo segue a rota do sistema vascular e penetra nas sementes através do funículo. Isso ocorre com a maioria dos patógenos causadores de murcha vascular (NEERGARD, 1979).

Os efeitos diretos causados pelos fungos de armazenamento em sementes e grãos são observados na forma de emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, mudanças químicas e nutricionais e produção de compostos tóxicos (POMERANZ, 1982). Nas sementes, os danos podem ser percebidos desde a fase de semeadura até o final do ciclo produtivo do hospedeiro, no processo de germinação e nas fases subsequentes ao desenvolvimento das plantas. Os principais efeitos negativos causados pela incidência de fungos em sementes são a perda do poder germinativo e vigor, aumento da suscetibilidade de plantas a estresses variados, morte de plântulas originadas de sementes contaminadas, acúmulo de inóculo no solo, contaminação de equipamentos de colheita e beneficiamento, disseminação do patógeno a longas distâncias, queda de produção e qualidade dos produtos na pós-colheita (MACHADO, 2012; CARVALHO, 1999).

A presença de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em tecidos vegetais incluindo sementes e grãos é indicativo de deterioração destes substratos (MILLER, 1995). Para que ocorra o processo de deterioração é necessário que haja uma interação entre alguns fatores abióticos como a temperatura e umidade, além de outros de natureza diversa. A deterioração pode ser baixa e lenta no início, porém, a combinação destes fatores pode gerar perdas significativas na qualidade dos produtos (D'ARCE, 2009).

Os fungos considerados de armazenamento são adaptados a ambientes com baixa umidade relativa do ar, no entanto também possuem capacidade de se desenvolver em ambientes com umidade superior a 70%. Já a umidade nas sementes o ideal para estes fungos é superior a 14%. A temperatura ótima para o seu crescimento está entre 25 e 30°C, no entanto podem se desenvolver em temperaturas que variam de 12 a 48°C (MARCOS FILHO, 2005; HEDAYATI et al., 2007; REIS, 2009).

O monitoramento da incidência de fungos toxigênicos e o conhecimento dos mesmos, juntamente com o monitoramento de fatores que predisõem a contaminação destas espécies constituem a maneira eficaz de prevenir ou reduzir a produção da maioria das micotoxinas.

3.4 Produção de micotoxinas em sementes e grãos de amendoim

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, de baixo peso molecular, produzidos por fungos filamentosos, especialmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2015). A produção das micotoxinas depende de vários fatores como temperatura e umidade do ambiente, suscetibilidade do substrato à colonização do fungo produtor, atividade de água do substrato, fatores biológicos como capacidade genética do fungo em produzir toxinas e quantidade de esporos viáveis (CIEGLER, 1978).

Essas toxinas podem estar associadas às *commodities* agrícolas como cereais, oleaginosas, especiarias, castanhas em geral e leite (REDDY et al., 2010). De acordo com Soares et. al (2013) as principais micotoxinas são as aflatoxinas (AFs – B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁), ocratoxina A (OTA), patulina (PAT), fumonisinas (FUM), zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON).

As aflatoxinas são conhecidas por apresentarem efeitos tóxicos mutagênicos, carcinogênicos, teratogênicos e imunossupressores em humanos e animais. Por não serem digestíveis, as aflatoxinas são retidas na carne e leite de animais alimentados com rações contaminadas e são termoestáveis, permanecendo no alimento indefinidamente (LIU e WU, 2010; PITTET, 1998, WILLIAMS et al., 2004). Segundo Zain (2011) dentre os tipos de aflatoxinas, a B₁ é o carcinogênico natural mais potente e é produzido principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*.

Na literatura são encontrados registros sobre a associação de aflatoxinas com amendoim e outros alimentos, sendo destacados os graves problemas que esta interação pode gerar para a saúde humana e animal. O primeiro caso descrito na literatura data de 1960 onde mais de 100 mil perus morreram na Inglaterra, vítimas do consumo de farelo de amendoim contaminado com alto teor de aflatoxina, conforme demonstrado posteriormente em estudos específicos sobre este episódio (GOLDBLATT, 1969). Em 2004, no Quênia foram registrados 317 casos e 125 mortes de humanos devido ao consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas (PROBST, 2007). Em março de 2017, a ANVISA interditou um lote de paçoca (subproduto de amendoim) no estado de Goiás por detectar aflatoxinas em níveis superiores ao limite máximo tolerado (LMT) de aflatoxinas, que é de 20 µg/kg para amendoim e seus derivados de acordo com a Resolução n° 07 (BRASIL, 2011).

A resolução n° 07 publicada em 18 de fevereiro de 2011 pela ANVISA, que é o órgão responsável pela regulamentação dos níveis de toxinas presentes em alimentos e rações no Brasil, estabeleceu o limite máximo tolerado de micotoxinas para diversos alimentos. Nesta legislação estão estabelecidos os limites máximos tolerados em produtos de cereais para aflatoxina B₁, aflatoxina B₂, aflatoxina G₁, aflatoxina G₂, ocratoxina A, zearalenona, deoxinivalenol (DON), Patulina e Fumonisinás (B₁ + B₂) (BRASIL, 2011).

O limite máximo tolerado (LMT) de micotoxinas varia de acordo com a legislação de cada país e do destino final do produto. Nos países da União Europeia, o LMT de aflatoxinas totais em grãos de amendoim para consumo direto ou como ingrediente de alimentos é de 4 µg/kg e para aflatoxina B₁ é de 2 µg/kg. No caso de amendoim submetido à seleção ou outro processo o LMT de aflatoxinas totais pode chegar a 8 µg/kg e em matéria prima para rações de animais o LMT é de 50 µg/kg. Na República Tcheca os limites são de 5 µg/kg para B₁ e 10 µg/kg para B₂, G₁ e G₂, no entanto, para alimentos destinados ao consumo infantil o LMT é de 1 ppb para B₁ e 2 µg/kg para B₂, G₁ e G₂ (FAO 2003).

Na cultura do amendoim a contaminação por aflatoxina é um dos principais problemas, provocando perdas econômicas em vários países produtores desta espécie de planta (TORRES et al., 2014; VARGA et al., 2008; RODRIGUEZ-AMAYA e SABINO, 2002), no entanto, os prejuízos causados pela contaminação de produtos agrícolas por aflatoxina não afetam apenas os países cuja economia depende basicamente da agricultura. Nos Estados Unidos, por exemplo, Vardon et al. (2003) estimaram que as perdas anuais potenciais causadas por aflatoxina, fumonisina e deoxinivalenol nas culturas de milho, trigo e amendoim seriam entre US\$ 418 milhões e US\$ 1,66 bilhão. Outros autores verificaram perdas anuais na indústria do amendoim

nos Estados Unidos, devido à contaminação por aflatoxina, em torno de 25 milhões de dólares (GONÇALEZ et al., 2008; LAMB e STERNITZKE, 2001, MITCHELL et al. 2016). De acordo com algumas pesquisas realizadas no Brasil foram verificadas contaminações na cultura de amendoim por aflatoxina variando entre 19,5% e 34% (CALDAS, 2002; GONÇALEZ, 2008; IMAMURA, 2014).

3.5 Identificação e detecção de isolados toxigênicos de *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* abriga mais de 339 espécies e pode ser separado em várias morfo-espécies. Atualmente são aceitos quatro subgêneros, divididos em 19 seções (HOUBRAKEN et al., 2014). De acordo com a primeira classificação de Raper e Fennel (1965) a identificação destas seções é baseada nas coloração das colônias. Estudos recentes mostraram que grande parte de grupos baseados nas características morfológicas condizem com os resultados das análises filogenéticas (PETERSON et al., 2008; HOUBRAKEN & SAMSON 2011, HOUBRAKEN et al., 2014).

A identificação e classificação de *Aspergillus* baseadas no fenotipo, leva em consideração características macro e micromorfológicas. Para a caracterização morfológica deste grupo de fungos são recomendados cultivos dos isolados em meio CYA (Czapek Yeast Autolysate agar) e MEA (Malt Extract agar) (SAMSON et al., 2014). A incubação para o cultivo em meio MEA deve ser realizada sob a temperatura de 25°C e para o meio CYA nas temperatura de 25°C e 37°C, ambos por sete dias, no escuro. As características macromorfológicas são baseadas em coloração da colônia, textura, tamanho, produção de escleródios, exudados, pigmentos solúveis, coloração de micélio e coloração do reverso da colônia. As características microscópicas levam em conta a presença de métula (uniseriado ou biseriado), tamanho e coloração dos conídios, textura da parede dos conídios, tamanho e textura da parede dos conidióforos, tamanho e textura da vesícula (SANSOM et al., 2014).

Apesar da identificação de isolados de *Aspergillus* com base em características morfológicas muitas vezes estarem de acordo com a identificação baseada em análises filogenéticas, em alguns casos a identificação morfológica pode não fornecer um diagnóstico com alta precisão, o que se deve às tênues diferenças verificadas entre algumas espécies. Devido a equívocos que possam ocorrer na identificação de isolados é incerto comparar estudos entre si, já que pode ocorrer interpretação errônea de resultados (HOUBRAKEN et al., 2014). Em

razão da importância destes fungos na pesquisa e nos setores agrícola e industrial, é fundamental que a identificação das espécies não seja ambígua (ABARCA et al., 2004).

Estudos já realizados no Brasil acerca da identificação de *Aspergillus* associados a grãos de amendoim, revelaram informações limitadas a respeito da diversidade de espécies encontradas nos campos de produção do país, uma vez que, estes trabalhos consideraram apenas com caracteres morfológicos para a identificação das espécies ou finalizaram apenas no nível de gênero (AMORIM et al., 2010; BELLETINI et al., 2005; REIS, 2009; SANTOS et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2015; SANTOS et al., 2013; GONÇALEZ et al., 2008; BARBOSA et al., 2014; ATAYDE et al., 2012).

A fim de minimizar identificações errôneas de isolados, estudos recentes tem demonstrado que o emprego da biologia molecular, que confere maior precisão neste tipo de identificação para os fungos, incluindo membros do gênero *Aspergillus* (SAMSON et al., 2014; HOUBRAKEN et al., 2014), torna-se uma prática de suma relevância neste campo. As técnicas moleculares baseadas nas sequências de DNA vêm sendo empregadas com grande sucesso para esta finalidade. A região ITS foi o primeiro *barcode* utilizado na identificação destes fungos, no entanto esta região oferece um baixo nível de discriminação dentre as espécies, não devendo portanto ser utilizada para identificação de *Aspergillus* (SANSON et al., 2014; HOUBRAKEN et al., 2014). Sanson et al. (2014) sugeriram o uso da calmodulina (*CaM*), β -tubulina (*BenA*) ou a segunda maior subunidade do RNA polimerase II (*RPB2*), destacando que são *barcodes* ideais para identificação de espécies de *Aspergillus*. Apesar da filogenia apresentar resultados confiáveis na identificação, é importante utilizar esse método em conjunto com a caracterização morfológica, levando em consideração as informações que este segundo método tem capacidade de fornecer.

Além de serem utilizados na identificação de espécies, os métodos moleculares como PCR e qPCR têm sido utilizados na detecção de espécies de *Aspergillus* com capacidade de produzir micotoxinas. No caso de *Aspergillus* da seção *Flavi*, onde a principal micotoxina produzida é a aflatoxina, esta técnica se baseia na amplificação de genes da via biossintética de aflatoxinas, que é composta por 25 genes (MIDEROS et al., 2009; NIESSEN, 2008; YU et al., 2004).

Em adição às técnicas moleculares, que são utilizadas para verificar a capacidade de produção de micotoxinas pelos isolados, outros métodos podem ser utilizados para verificar a presença destes metabólitos em grãos/sementes e alimentos em geral. Dentre eles estão a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Imunoenzimáticas e Cromatografia Líquida de

Alta Eficiência (CLAE). A CCD é uma metodologia que separa componentes químicos pela polaridade. A identificação de toxinas específicas é realizada por meio da comparação visual da intensidade de pontos de interesse com o padrão utilizado. É considerada uma técnica simples e de baixo custo, no entanto tem alto coeficiente de variação e limite de quantificação para aflatoxinas. A técnica imunoenzimática de Elisa tem alta sensibilidade, rapidez e baixo custo, no entanto não separa e nem quantifica as aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2). A CLAE é uma técnica sensível, precisa, possui medidas quantitativas acuradas e permite o estudo de misturas difíceis de separar, no entanto necessita de um alto investimento inicial e exige mão de obra qualificada e experiente para realização das análises. Na impossibilidade de utilizar esta técnica o método CCD torna-se uma opção viável para determinadas análises (SCHNEIDER e MOSTARDEIRO, 2007; AMADO, 2002).

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek: Journal of Microbiology**, Dordrecht, v. 86, n. 1, p. 33-49, 2004.
- AMADO, M. A. Métodos imunológicos na detecção e determinação de aflatoxinas em alimentos: vantagens e inconvenientes. **Rev. Millenium**, n.26. 2002
- AMBROSANO, E. J.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G. M. B.; SCHAMMAS, E. A.; DIAS, F. L. F.; ROSSI, F.; TRIVELIN, P. C. O.; MURAOKA, T.; SACHS, R. C. C.; AZCÓN, R. Produtividade da cana-de-açúcar após o cultivo de leguminosas. **Rev. Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 4, p.810-818, 2011.
- AMORIM, E. P. R.; PREDES, R. C. T.; ELOY, A. P.; BEZERRA, I.C.; SOARES, L. P. R., SILVA, J. C. Qualidade sanitária de grãos e frutos de amendoim comercializados no estado de Alagoas e identificação através de características culturais de espécies de *Aspergillus*. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.4, p.309-312, 2010.
- ATAYDE, D.D.; REIS, T.A.; GODOY, I.J.; ZORZETE, P.; REIS, G.M.; CORREA, B. Mycobiota and aflatoxins in a peanut variety grown in different regions in the state of São Paulo, Brazil. **Crop Protection**, Londres, v.33, p.7-12, 2012.
- BARBOSA, R. M.; VIEIRA, B. G. T. L.; MARTINS, C. C.; VIEIRA, R. D. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de amendoim durante o processo de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 412, p. 977-985, 2014.
- BELLETTINI, N. M. T.; ENDO, R. M.; MIGLIORANZA, É.; SANTIAGO, CRISTINA, D. Pathogenicity of seed-borne and seedling fungi of groundnut cv. Tatu. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n.2, p. 167-172, abr/jun 2005.

BERJAK, P. Stored seeds: the problems caused by microorganisms. In: **Advanced international course on seed pathology**, 1987, Passo Fundo. Proceedings... Passo Fundo: Embrapa, p. 93-112. 1987.

BHATNAGAR-MATHUR, P.; SUNKARA, S.; BHATNAGAR-PANWAR, M.; WALIYAR, F.; SHARMA, K.K. Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. **Plant Science**, v. 234, p. 119–132, 2015.

BORÉM, F. M. et al. Controle de fungos presentes no ar e em sementes de feijão durante armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 651-659, dez. 2006.

BRASIL. Legislação sobre micotoxinas. Resolução da ANVISA – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** RDC nº07 de 18 de fevereiro de 2011.

CALDAS, E. D., SILVA, S. C., OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e Ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, 36(3):319-323. 2002.

CARVALHO, J.C.B. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

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

CONAB – Companhia nacional de Abastecimento, 2017. **Perspectivas para a agropecuária**. Vol. 5, safra 2017/2018, Produtos de verão. Brasília: 2017.

CONAB – Companhia nacional de Abastecimento, 2018. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Décimo segundo levantamento, safra 2017/2018. Brasília: 2018.

D'ARCE, M. A. B. R. **Pós-colheita e armazenamento de grãos**. São Paulo: Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição. 17 p. 2009. (Material Didático).

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Algodão – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coleção 500 perguntas, 500 respostas. **Amendoim: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. ed.1, p.240. Brasília, DF, 2009.

FAO – Food and Agriculture Organization. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. **Estudio FAO: Alimentación y nutrición**. Roma, Itália, 60f. 2003.

GOLDBLATT, L.A. Aflatoxin – Scientific Background, Control and Implications. New York: **Academic Press**. p.13-54. 1969.

GONÇALEZ, E.; NOGUEIRA, J.H.C.; FONSECA H.; FELICIO, J.D.; PINO, F.A.; CORRÊA, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanut kernels from sowing to harvest. **International Journal of Food Microbiology**, v.123, p.184-190, 2008.

HEDAYATI, M. T., PASQUALOTTO, A. C., WARN, P. A., BOWYER, P., DENNING, D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, New York, v. 153, n. 6, p. 1677-1692, June, 2007.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes**: noções gerais. Londrina: Embrapa Soja. 52 p. (Documentos, 264). 2005.

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

HOUBRAKEN, J., & SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies in Mycology**, v.70, p.1–51, 2011.

IMAMURA, K. B., TONI, J. C. V., BOCICHE, M. A. L.; SOUZA, D. A., GIANNONI, J. A. Incidência de aflatoxinas no amendoim, (*Arachis hypogaea* L) cru em casca da região da Alta Paulist-SP, durante o período de 2011 a 2012. **Revista Inst Adolfo Lutz**, 73(2):178-187. 2014.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Agência de notícias IBGE**. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/20166-pib-avanca-1-0-em-2017-e-fecha-ano-em-r-6-6-trilhoes.html>. 2018.

INC – International Nut & Dried Fruits. Nuts & Dried Fruits. **Global statistical review 2015/2016**.

KUMEDA, Y.; ASAO, T. Heteroduplex panel analysis, a novel method for genetic identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.9, p.4084-4090, Sept, 2001.

KWIATKOWSKI, A., ALVEAS, A. P. F. Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. **Rev. Saúde e Biol.**, v.2, n.2, p.45-54. Campo Mourão-PR, 2007.

LAMB, M.C.; STERNITZKE, D.A. Cost of aflatoxin to the farmer, buying point, and sheller segments of the southeast United States peanut industry. **Peanut Sci**, v.28, p.59– 63, 2001.

LIU, Y; WU, F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment, *Environ. Health Perspect.*, v.118, p.818–824, 2010.

MACHADO, J. C. Patologia de sementes: significado e atribuições. In: CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 590 p. 2012.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. 1. ed. Lavras: FAEPE. v. 30. 106p. 1988.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ. 495p. 2005.

MESQUITA, R. M. L. C. **Estudo da viabilidade de *Aspergillus flavus* Link. associado a amêndoas da castanheira do Brasil (*Bertholletia excels* Bonpl.) da região amazônica.** 2012. 62 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

MICHELI, P. A. *Nova platarum genera.* **Florence: Gyan Books.** p.234. 1729.

MIDEROS, S.X., WINDHAM, G.L., WILLIAMS, W.P., NELSON, R.J. *Aspergillus flavus* biomass in maize estimated by quantitative real-time polymerase chain reaction is strongly correlated with aflatoxin concentration. **Plant Disease**, v.93, p.1163-1170, 2009.

MIDORIKAWA, G. E. O. ***Aspergillus* seção *Flavi*: caracterização molecular de espécies aflatoxigênicas da castanha do Brasil e análise do transcriptoma de *Aspergillus oryzae* em relação a degradação enzimática do bagaço da cana-de-açúcar.** Qualificação (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília. 194 p. Brasília, 2014.

MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal Stored Products Research**, Great Britain, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.

MITCHELL, N.J.; BOWERS, E.; HURBURGH, C.; WU, F. Potential economic losses to the USA corn industry from aflatoxin contamination. **Food Addit Contam Part A hem Anal Control Expo Risk Assess.** March; 33(3): 540–550. 2016.

NAKAGAWA, J.; ROSOLEM, C.A. **O amendoim: tecnologia de produção.** Botucatu: FEPAF. 325p. 2011.

NEERGAARD, P. **Seed pathology.** London: Macmillan Press. v.2, 1979.

NIESSEN, L. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin-producing fungi. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.54, p.81–138, 2008.

OLIVEIRA, A. V., DEL PRADO, C. C. N., MODESTO, N. G., LUCENA, G. Detecção molecular de fungos com potencial toxigênico em amostras de amendoim vendidas no comércio varejista de Maringá/PR, Brasil. **Biotemas**, 28 (1): 13-19, março de 2015.

PALENCIA, E.R.; HINTON, D.M.; BACON, C.W. The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production. **Toxins**, v.2, p.399-416, 2010.

PARRELLA, N. N. L. D.; JESUS, A. M., REIS, J. B. R. S., RIBEIRO, A. M. P., SANTOS, G. S. **Qualidade fitossanitária de sementes.** Belo Horizonte: EPAMIG. 6 p. 2012. (Circular Técnica)

PETERSON, S.W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycologia**, v.100, p.205–226, 2008.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review, **Rev. Med. Vet.**, v.149, p.479-492, 1998.

POMERANZ, Y. Biochemical, functional and nutritive changes during storage. In: CHRISTENSEN, C.M. (ed). **Storage of cereal grains and their products**, p. 145-217, 1982.

PROBST, C.; NJAPAU, H.; COTTY, P. Outbreak of an Acute Aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the Causal Agent. **Microbiology**, p. 2762– 2764 Vol. 73, No. 8. Apr. 2007.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. The genus *Aspergillus*. **Baltimore: Williams & Wilkins Co.** 1965.

REDDY, K.R.N., et al. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health, **Toxin Rev.** v.29, p.3-26, 2010.

REIS, G. M.; **Variabilidade genética de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim.** 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade de São Paulo, São paulo. 41 p. 2009.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. **Braz. J. Microbiol.**, v.33, p.1–11, 2002

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B.; VARGA, J.; KOCSUB_E S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J.C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, 78: 141–173. 2014

SANTOS, C.C.M.; LOPES, M.R.V.; KOSSEKI, S.Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/S.P. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.60, n.2, p.153-157, 2001.

SANTOS, F.; MEDINA, P.F.; LOURENÇÃO, A.L.; PARISI, J.J.D.; GODOY, I.J. Quality assessment of commercial peanut seeds in the state of São Paulo, Brazil. **Bragantia**, Campinas, v.72, n.3, p.310-317, 2013.

SCHNEIDER, E. M.; MOSTARDEIRO, C. P. Aflatoxinas em amendoim e toxicidade no organismo humano. **Revista Contexto e Saúde**. Ed. Unijui. v. 7 n. 13. p.45-52. Jul/Dez 2007.

SOARES, C.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. Fungos produtores de micotoxinas. **Microbiologia. Portuguese Society for Microbiology Magazine**, 2013.

TORRES, A.M.; BARROS, G.G.; PALACIOS, S.A.; CHULZE, S.N.; BATTILANI, P. Review on pre- and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. **Food Research International journal**, v.62, p.11–19, 2014.

VARDON, P.J.; MCLAUGHLIN, C.; NARDINELLI, C. Potential economic costs of mycotoxins in the United States. **Council of Agriculture, Science, and Technology**; Ames(IA): 2003. Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems (Task force report).; p. 136-142.Chapter 10. 2003.

VARGA, J.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. Molecular diversity of *Aspergillus* and *Penicillium* species on fruits and vegetables. In: BARKAI-GOLAN, R.; PASTER, N. (Eds.) **Mycotoxins in fruits and vegetables**. Elsevier, San Diego, CA, USA, pp. 205-223, 2008.

WILLIAMS J.H., et al., Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences and interventions, *Am. J. Clin. Nutr.*, v.80, p.1106-1122, 2004.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 15,p.129–144. 2011.

YU, J., CHANG, P. K., EHRLICH, K. C., CARY, J. W., BHATNAGAR, D. CLEVELAND, T. E., PAYNE, G. A. LINZ, J. E., WOLOSHUK, C. P., BENNETT, J. W. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1253-1262. 2004.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS DE *Aspergillus* SEÇÃO *Flavi* PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE AMENDOIM COLETADAS EM DIFERENTES REGIÕES NO BRASIL

MORPHOLOGICAL, MOLECULAR CHARACTERIZATION AND POTENTIAL PRODUCTION OF AFLATOXINS FROM *Aspergillus* SECTION *Flavi* FROM PEANUT SAMPLES COLLECTED IN DIFFERENT REGIONS OF BRAZIL

Poliana Patrícia Lima^{1*}, Iara Eleutéria Dias¹, Bárbara Alves dos Santos Cisson¹, José da Cruz Machado¹, Luís Roberto Batista²

¹Departamento de Fitopatologia, UFLA, Caixa Postal 3037, 37200-000 – Lavras-MG, Brasil

²Departamento de Ciências de Alimentos, UFLA, Caixa Postal 3037, 37200-000 – Lavras-MG, Brasil

*Autor para correspondência: poliana.agro@gmail.com

Caracterização morfológica, molecular e potencial de produção de aflatoxinas de *Aspergillus* seção *Flavi* provenientes de amostras de amendoim coletadas em diferentes regiões no Brasil

Poliana Patrícia Lima¹, Iara Eleutéria Dias¹, Bárbara Alves dos Santos Ciscon¹, José da Cruz Machado¹, Luís Roberto Batista²

RESUMO - O amendoim se encontra dentre as principais commodities produzidos e exportados pelo Brasil. A contaminação destes grãos com fungos do gênero *Aspergillus* seção *Flavi* tem sido alvo de estudos direcionados à produção de micotoxinas, principalmente aflatoxina. Esta toxina merece atenção especial devido aos possíveis danos que pode causar à humanos e animais quando consomem alimentos contaminados. O objetivo no presente trabalho foi identificar por meio de técnicas moleculares e morfológicas as espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* presentes em sementes e grãos de amendoim provenientes de diferentes regiões brasileiras, União dos Palmares-AL, Guanambi-BA, Porteirinha-MG, Mocambinho-MG, Rio Pardo de Minas-MG, Sertãozinho-SP e Muitos Capões-RS. Após a identificação foi verificado o potencial de produção de aflatoxinas destes isolados. Por meio do Blotter teste salino foram coletados 107 isolados com características típicas de *Aspergillus* seção *Flavi*. Grande parte dos isolados foram identificados como *Aspergillus flavus* em todas as regiões onde foram realizadas as coletas. Nas amostras provenientes das cidades localizadas nos estados de Alagoas e Bahia 87,25% dos isolados foram identificados como *A. flavus* e 2,12% como *Aspergillus parasiticus*. No estado de Minas Gerais cerca de 92,85% como *A. flavus*. No estado de São Paulo 72,7% foram identificados como *A. flavus* e 9% como *A. parasiticus* e os isolados da cidade de Muitos Capões – RS 71,4% como *A. flavus* e 14,28% como *A. tamaritii*. Além das espécies citadas, com a realização das análises moleculares foram identificados outras espécies, como *A. caelatus* e *A. minisclerotigenes*. Nas amostras coletadas em Alagoas e Bahia 90% dos isolados estudados são produtores de aflatoxina B1 e B2, na região sudeste 90,5% produziram aflatoxina B1 e B2 e nas amostras coletadas no Rio Grande do Sul 71,42% dos isolados produziram aflatoxinas B1 e B2, dos quais 42,85% também são produtores de aflatoxinas G1 e G2.

Palavras-chave: *Aspergillus flavus*. *A. tamaritii*. *A. caelatus*. *A. minisclerotigenes*. *A. parasiticus*. Calmodulina. β -tubulina. Micotoxina.

Morphological, molecular characterization and potential production of aflatoxins from *Aspergillus* section *Flavi* from peanut samples collected in different regions of Brazil

Poliana Patrícia Lima¹, Iara Eleutéria Dias¹, Bárbara Alves dos Santos Ciscon¹, José da Cruz Machado¹, Luís Roberto Batista²

ABSTRACT - The peanut grain is one of the main commodities produced and exported by Brazil. The contamination of these grains with *Aspergillus* section *Flavi* has been studied because of the aflatoxin production by this group. The aflatoxin deserves special attention because it can cause possible damage to humans and animals health when consuming contaminated food. The aim of the work was to identify *Aspergillus* species of the *Flavi* section in peanut seeds and grains from different Brazilian regions, such as: Palmares-AL, Guanambi-BA, Porteirinha-MG, Mocambinho-MG, Rio Pardo de Minas-MG, Sertãozinho-SP and Muitos Capões-RS, using molecular and morphological techniques. After identification, the aflatoxin potential production of these isolated fungus was verified. Through the Blotter saline test, 107 isolates with typical characteristics of *Aspergillus* section *Flavi* were collected. Most part of the collected fungus were identified as *Aspergillus flavus*. In Samples from Alagoas and Bahia 87,25% were identified as *A. flavus* and 2.12% as *Aspergillus parasiticus*. In the State of Minas Gerais, about 92.85% were identified as *A. flavus*, in São Paulo State, 72.7% were identified as *A. flavus* and 9% as *A. parasiticus* and the isolates from Muitos Capões city 71,4% were identified as *A. flavus* and 14,28% as *A. tamaraii*. Other species, such as *A. caelatus* and *A. minisclerotigenes* were also identified in the collected samples. In the collected samples in Alagoas and Bahia States, 90% of the isolated fungus produced aflatoxin B1 and B2, in the southeast region 90,5% produced aflatoxin B1 and B2 and in the samples collected in Rio Grande do Sul 71.42% of the isolated fungus produced aflatoxins B1 and B2 and 42.85% also produced aflatoxins G1 and G2.

Keywords: *Aspergillus flavus*. *A. tamaraii*. *A. caelatus*. *A. minisclerotigenes*. *A. parasiticus*. Calmodulin. β -tubulin. Mycotoxin.

1 Introdução

A cultura do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma atividade tradicional no Brasil sendo explorada para o consumo interno e para exportação. Segundo dados da CONAB (2018) na safra de 2017/2018 foram produzidos 511,5 mil toneladas, das quais cerca de 25% foram destinadas à exportação.

A associação entre *Aspergillus* sp. e grãos de amendoim tem sido alvo de estudos por diversos pesquisadores (MOHAMMED e CHALA, 2014; MIDORIKAWA et al., 2014; LUO, VOGEL e NIESSEN, 2014; OLIVEIRA et al., 2015; MITCHELL et al., 2016; HUSSAIN et al., 2015), destacando-se a contaminação de grãos por micotoxinas produzidas por estes organismos. As principais espécies do referido gênero encontradas em associação com a cultura do amendoim pertencem a seção *Flavi* e seção *Nigri*. As espécies da seção *Flavi* são produtoras das principais toxinas como as aflatoxinas.

Dentre as toxinas produzidas por espécies de fungos, as aflatoxinas são consideradas as mais tóxicas. Elas podem ocorrer em culturas hospedeiras infectadas por espécies de *Aspergillus*, principalmente quando fatores ambientais como temperatura e umidade são favoráveis à sua produção. As aflatoxinas mais comuns são AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, das quais AFB1 e AFB2 são produzidas principalmente por *A. flavus* e AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 por *A. parasiticus*. Além destas espécies, outros membros da seção *Flavi* também são produtores de aflatoxinas, como: *A. minisclerotigenes*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, etc. (PILDAIN et al., 2008; BEZERRA DA ROCHA et al., 2014; MIDORIKAWA, 2014). Além das espécies produtoras de micotoxinas, a seção *Flavi* abrange espécies não produtoras destes metabólitos, podendo elas serem utilizadas na indústria farmacêutica e alimentícia. Dada à diversidade de espécies desta seção, a sua identificação torna-se um fator importante, principalmente em função de seus possíveis danos e benefícios.

Produtos agrícolas contaminados por micotoxinas podem resultar em perda de valor econômico e quando consumidos podem causar danos à saúde humana e animal. As aflatoxinas são substâncias carcinogênicas e imunossupressoras, podendo causar toxicidade crônica e aguda. Na literatura é possível encontrar alguns registros sobre o consumo de amendoim e seus derivados contaminados com aflatoxina, que provocaram grandes prejuízos e levaram pessoas e animais à morte (STEVENS et al., 1960; AMARAL, 1961; PROBST, 2007; FREITAS e BRIGIDO, 1998).

O objetivo no presente trabalho foi identificar espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* provenientes de amostras de grãos e sementes de amendoim coletadas em cinco estados brasileiros e verificar o potencial de produção de aflatoxinas destes isolados.

2 Material e métodos

2.1 Obtenção de isolados

Foram coletadas amostras de grãos de amendoim de seis cidades e um distrito, localizados em cinco estados brasileiros (Tabela 1 e Figura 1). Os locais para coleta de amostras foram definidos de maneira que abrangesse diferentes regiões do país. As amostras foram coletadas no ano de 2016 em feiras e cooperativas de produtores, sendo compostas aproximadamente por 2,0 kg. A sanidade as amostras coletados foi analisada por meio do blotter teste salino, avaliando-se 200 sementes por amostra (BRASIL, 2009). Foram utilizadas placas de Petri de 150 mm de diâmetro contendo 25 grãos por placa. Após sete dias de incubação a 20°C, as colônias fúngicas associadas aos grãos foram avaliadas. Com base nas características morfológicas as espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* foram isoladas e multiplicadas em meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar), onde permaneceram por sete dias em temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12/12h. Para obtenção de culturas puras foi preparada uma suspensão de esporos em água destilada autoclavada. Foram pipetados 50µL desta suspensão em placas de petri de 90 mm contendo uma fina camada de substrato sólido ágar-água. As placas foram incubadas durante 24h a 25°C e analisadas em microscópio ótico. Os esporos germinados foram coletados isoladamente e transferidos para placas contendo meio de cultura BDA para obtenção de culturas monospóricas. Ao fim das análises foram obtidos 107 isolados.

Tabela 1 - Informações sobre os locais onde as coletas foram realizadas.

Cidade - UF	Latitude	Longitude	Altitude	Temperatura (média)	Umidade Relativa do ar (média)
Guanambi - BA	14° 13' 30" S	42° 46' 53" W	525 m	17 a 34°C	68,4%
Mocambinho - MG	15° 51' 04" S	43° 03' 53" W	556 m	16 a 32°C	66,4%
Muitos Capões - RS	28° 18' 51" S	51° 10' 54" W	985 m	8 a 25°C	75,3%
Porteirinha - MG	15° 44' 36" S	43° 01' 42" W	556 m	16 a 32°C	66,3%
Rio Pardo de Minas - MG	15° 36' 35" S	42° 32' 23" W	794 m	14 a 32°C	66,6%
Sertãozinho - SP	21° 08' 16" S	47° 59' 25" W	601 m	13 a 32°C	72,2%
União dos Palmares - AL	09° 09' 46" S	36° 01' 55" W	145 m	19 a 33°	76%

Figura 1 - Locais de coleta: 1 – União dos Palmares-AL; 2 – Guanambi-BA; 3 – Porteirinha-MG; 4 – Rio Pardo de Minas-MG; 5 – Mocambinho (distrito de Porteirinha-MG); 6 – Sertãozinho-SP; 7 – Muitos Capões-RS.



2.2 Caracterização morfológica dos isolados

Cada um dos 107 isolados obtidos foi transferido para placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo os meios de cultura CYA e MEA em três pontos equidistantes. As culturas foram incubadas à temperatura de 25°C (MEA e CYA) e 37°C (CYA), ambas por sete dias no escuro.

Após esse período foram avaliadas as características macromorfológicas das culturas como: diâmetro das colônias (mm), coloração, presença de exsudados, esclerócios e pigmentos solúveis (KLICH, 2002; PITT et al., 2000; VISAGIE et al., 2014; ABARCA et al., 2004). Em seguida foi realizada a confecção de lâminas microscópicas a partir das colônias desenvolvidas em meio CYA à 25°C. As lâminas foram observadas em microscópio de luz vertical Leica DM2000 DFC 3000G no Laboratório de Microscopia e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras (LME/UFLA). Nessa etapa foram analisadas as características micromorfológicas: comprimento, largura e textura da parede dos conidióforos, diâmetro e formato da vesícula, diâmetro, formato, coloração e textura da parede dos conídios. Com base nas características observadas foi realizada a identificação das espécies por meio de uma chave dicotômica (Identification of Common *Aspergillus* Species - KLICH, 2002).

2.3 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Após a caracterização morfológica foram selecionados isolados representativos de cada região para a caracterização molecular. Além dos isolados representativos de cada região, foram submetidos a análise molecular os isolados que não foram identificados a nível de espécie utilizando a identificação morfológica. No total foram sequenciados genes de 31 isolados.

Conídios das colônias selecionadas foram transferidos para microtubos contendo 1,5ml de meio de cultura líquido BD (batata-dextrose) e incubados por 48 horas à 25°C. Após esse período parte das colônias foram coletadas, transferidas para microtubos de 1,5ml e maceradas em nitrogênio líquido utilizando pistilo previamente esterilizado. O DNA foi extraído utilizando o Wizard Genomic DNA Purification Kit de acordo com as instruções do fabricante.

A amplificação de parte dos genes da calmodulina (*caM*) e β -tubulina (*β -tub*) foram realizadas utilizando os primers CMD5/CMD6 (HONG et al., 2005) e Bt2a/Bt2b (GLASS e DONALDSON, 1995) (Tabela 2). As reações de PCR foram realizadas utilizando 12,5 μ l de volume de reação, contendo 0,5U Roche Taq DNA Polymerase, 1,25x Roche taq DNA Polymerase buffer, 2mM MgCl₂, 200nM de cada primer e 200 μ M de dNTPs. O programa de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos à 57,2°C para *caM* e 60°C pra *β -tub* e uma extensão a 68°C por 1 minuto, seguida de uma extensão final a 68°C por 5 minutos. Produtos de PCR foram enviados à Helixxa – Genomics Service Provider para purificação e sequenciamento.

As sequências foram analisadas utilizando-se o programa CLC Genomic Workbench versão 11 e as árvores filogenéticas foram obtidas utilizando o programa MEGA versão 7.0.26 (KUMAR et al., 2016), pelo método *Maximum Likelihood*, utilizando o modelo Tamura-Nei com suporte de bootstrap com 1000 replicatas.

Tabela 2 - Detalhamento dos primers utilizados.

Gene	Sequência de primers	Temp. ¹ anelamento	Tam. ² amplicon	Referência
<i>β-tub</i>	F:GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	60°C	555	Glass e Donaldson,1995
Bt2a/Bt2b	R:ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC			
<i>CaM</i>	F:CCGAGTACAAGGARGCCTTC	57,2°C	600	Hong et al., 2005
CMD5/CMD6	R:CCGATRGAGGTCATRACGTGG			

¹Temperatura de anelamento. ²Tamanho de amplicon.

2.4 Detecção de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ pelo método Plug Ágar

O teste para avaliar o potencial micotoxigênico dos isolados fúngicos foi realizado em todos os exemplares obtidos em cultura pura. Os isolados foram cultivados em meio YES (Ágar, Extrato de Levedura e Sacarose) durante 7 dias a 25°C (FILTENBORG e FRISVAD, 1980). Após esse período foram retirados plugs contendo o fungo e o meio de cultura dos centros das placas de Petri e foram aplicados sobre as placas de cromatografia de camada delgada (MERK-SÍLICA GEL 60, 20x20). Além dos plugs retirados das placas, foram colocados 10µL das soluções padrão de Aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂ (SIGMA-ALDRICH) utilizados como controles positivos. A eluição ocorreu em uma cuba de vidro contendo Tolueno, Acetato de Etila (TEF) e Ácido Fórmico 90% (60:30:10) como fase móvel. A visualização foi feita a 366 nm por meio de Cromatovisor CAMAG (UV-BETRACHTER).

3 Resultados

Por meio do blotter teste salino verificou-se que o maior número de isolados detectados apresentou características típicas de *Aspergillus* seção *Flavi*, tendo sido observado que os mesmos foram recuperados em grãos oriundos de todas as amostras coletadas nos diferentes locais considerados (Tabela 3). Em parte das amostras analisadas observou-se também a ocorrência de outras espécies de *Aspergillus* com características típicas de isolados pertencentes às seções de *Nigri* e *Circumdati*. Vale salientar que pelo teste utilizado foi observada frequente ocorrência de mais de uma espécie de *Aspergillus* na mesma semente, assim como de outros gêneros fúngicos como *Rhizopus* e *Penicillium*.

Tabela 3 - Frequência dos fungos detectados nas amostras de grãos de amendoim coletadas em diferentes regiões brasileiras e analisadas em laboratório (método de Blotter).

Local de coleta das amostras	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	<i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i>	<i>Penicillium</i> sp.
Guanambi-BA	10%	83%	8%	3%	67%
Mocambinho-MG	71%	49%	13%	0%	19%
Muitos Capões-RS	37%	58%	15%	2%	25%
Porteirinha-MG	15%	82%	21%	6%	38%
Rio Pardo de Minas-MG	11%	76%	10%	0%	41%
Sertãozinho-SP	38%	78%	10%	3%	32%
União dos Palmares	40%	75%	13%	2%	42%

3.1 Identificação morfológica das espécies

De acordo com a análise das características macro e micromorfológicas, a espécie mais frequentemente encontrada dentre a seção *Flavi* foi *Aspergillus flavus*, que ocorreu em todas as regiões consideradas neste trabalho. Nos dois municípios da região nordeste do Brasil, Guanambi-BA e União dos Palmares-AL, 87,25% dos isolados foram identificados como *A. flavus* e 2,12% como *Aspergillus parasiticus*. Para os demais isolados não foi possível chegar a conclusão definitiva da espécie apenas com a análise morfológica, indicando a necessidade de avaliações adicionais, como a identificação molecular das espécies.

Na região norte do estado de Minas Gerais, dentre os 42 isolados provenientes de Porteirinha, Rio Pardo de Minas e Mocambinho (distrito de Porteirinha), cerca de 92,85% foram identificados como *A. flavus*. A confirmação da identidade dos demais isolados não foi possível com base nas características morfológicas recomendadas na literatura.

Dos isolados provenientes de Sertãozinho (SP), 72,7% foram identificados como *A. flavus*, 9% como *A. parasiticus* e os demais não foi possível identificar em nível de espécie e da amostra coletada na cidade de Muitos Capões, localizada no Rio Grande do Sul, 71,4% dos isolados foram identificados como *A. flavus* e 14,28% como *A. tamaritii*.

3.2 Identificação molecular dos isolados

As análises das sequências parciais dos genes utilizados (*caM* e *β -tub*) indicaram a mesma identificação para todos os isolados nos dois genes. Dentre os 31 isolados estudados 77,4% foram identificados como *Aspergillus flavus*, 9,67% *A. minisclerotigenes*, 6,43% *A. caelatus*, 3,25% *A. parasiticus* e 3,35% *A. tamaritii* (Tabela 4).

Pela análise morfológica, 83,87% destes isolados já haviam sido identificados a nível de espécie. Dessa forma, a identificação foi apenas confirmada pela análise molecular. Por outro lado, os isolados não identificados a nível de espécie pela análise morfológica foram identificados na análise molecular. Estas espécies não se encontram descritas no material utilizado para caracterização morfológica (Identification of Common *Aspergillus* Species - KLICH, 2002).

Tabela 4 - Informações das amostras de grãos analisados, identificação morfológica, identificação molecular e análise de produção de aflatoxinas.

Código	Cidade	UF	Identificação		Aflatoxinas			
			Morfológica	<i>B-tub e caM</i>	B1	B2	G1	G2
1	Guanambi	BA	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
2	Guanambi	BA	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
4	Guanambi	BA	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-
57	Guanambi	BA	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	+	+	+	+
14	Guanambi	BA	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
19	Guanambi	BA	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
37	Guanambi	BA	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
40	Rio Pardo de Minas	MG	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
42	Rio Pardo de Minas	MG	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
47	Rio Pardo de Minas	MG	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
50	Rio Pardo de Minas	MG	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
52	Rio Pardo de Minas	MG	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
63	Rio Pardo de Minas	MG	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
65	Rio Pardo de Minas	MG	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
69	Porteirinha	MG	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-
72	Porteirinha	MG	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
76	Porteirinha	MG	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
78	Mocambinho/ Porteirinha	MG	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
79	Mocambinho/ Porteirinha	MG	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
81	Mocambinho/ Porteirinha	MG	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
86	Muitos Capões	RS	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tamarii</i>	-	-	-	-
87	Muitos Capões	RS	<i>A. sp</i>	<i>A. minisclerotigenes</i>	+	+	+	+
92	Sertãozinho	SP	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
94	Sertãozinho	SP	<i>A. sp</i>	<i>A. caelatus</i>	-	-	-	-
98	Sertãozinho	SP	<i>A. sp</i>	<i>A. caelatus</i>	-	-	-	-
99	Sertãozinho	SP	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-
103	União dos Palmares	AL	<i>A. sp</i>	<i>A. minisclerotigenes</i>	+	+	+	+
104	União dos Palmares	AL	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
105	União dos Palmares	AL	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
106	União dos Palmares	AL	<i>A. sp</i>	<i>A. minisclerotigenes</i>	+	+	-	-
107	União dos Palmares	AL	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-

Estados (UF): Alagoas (AL), Bahia (BA), Minas Gerais (MG), São Paulo (SP), Rio Grande do Sul (RS).

As sequências obtidas comparadas com as sequências dos isolados tipo disponíveis no GenBank, apresentaram similaridade de 99 a 100% com o isolado tipo de cada espécie (Tabela 5).

Considerando-se as sequências de *β-tub*, foram observados 4 haplótipos de *A. flavus* (Figura 2). Para *A. caelatus* e *A. minisclerotigenes* foi encontrado apenas um haplótipo de cada espécie, sendo as espécies de *A. caelatus* diferentes da sequência de referência. No caso de

Aspergillus tamaritii o único isolado encontrado é idêntico à sequência de referência, mostrando que essa é uma região altamente conservada. O único isolado de *A. parasiticus* encontrado nesta análise diferencia-se da sequência de referência, apresentando uma variação na sequência analisada, afetando apenas uma base (SNPs), na região codante do gene, no entanto não houve alteração do aminoácido.

Nas sequências de *caM*, foram observados 3 haplótipos nos *A. flavus* (Figura 3), onde nenhum dos isolados foi semelhante a sequência de referência. Para *A. caelatus* foi verificado apenas um haplótipo, sendo este diferente da sequência de referência, possuindo SNPs tanto na região de codante (sem alteração de aminoácido) quanto na região não codante. Nos isolados de *A. minisclerotigenes* foram encontrados dois haplótipos, sendo um deles idêntico à sequência de referência. O isolado de *A. tamaritii* encontrado é diferente da sequência de referência enquanto que *A. parasiticus* é idêntico à sequência de referência.

Dentre os isolados identificados como *A. flavus* alguns apresentam diferenças únicas em relação aos demais. Na sequência parcial de *caM* o isolado 69 foi o único componente do haplótipo 1 e na sequência parcial de *β -tub* é o único componente do haplótipo 2. Em ambos os casos este isolado diferiu das sequências de referência, apresentando SNPs na região codante de *β -tub* (sem alteração de aminoácido) e na região não codante de *caM*. Diferentemente dos demais isolados de *A. flavus* encontrados na amostra proveniente da cidade de Porteirinha-MG, não foi detectada a produção de aflatoxina pelo referido isolado.

O isolado 99 de *A. flavus* na sequência de *caM* está entre os isolados do haplótipo 3, já na sequência de *β -tub* é o único isolado do haplótipo 4, possuindo nesta mesma sequência dois SNPs na região não codante. Já o isolado 105 é o único componente do haplótipo 1 na sequência de *β -tub*, onde possui um SNP na região não codante.

Os isolados 32,19,14 e 04 são os componentes do haplótipo 2 na sequência parcial de *caM* e na sequência parcial de *β -tub* estes isolados compõem o haplótipo 3 juntamente com a maioria dos isolados estudados.

Tabela 5 - Número de acesso das sequências de referência, similaridade (%) com os isolados obtidos neste estudo, variação interna e número de haplótipos.

Espécie	n	<i>β-tub</i>				<i>caM</i>			
		Ref. ¹	Simil ²	Var. int ³	Hap ⁴	Ref. ¹	Simil ²	Var. int ³	Hap ⁴
<i>A. caelatus</i>	02	EF661470	99	0	01	EF661522	99	0	01
<i>A. flavus</i>	24	EF661485	99-100	1	04	EF661508	99-100	1	03
<i>A. minisclerotigenes</i>	03	KY924667	99-100	0	01	KY924679	100	1	02
<i>A. parasiticus</i>	01	EF661481	99	-	01	AY017584	100	-	01
<i>A. tamaritii</i>	01	EF661474	100	-	01	EF661526	99	-	01

¹Número de acesso das sequência de referência de *caM* e *β-tub*. ²Similaridade observada entre as sequência analisadas e as sequências de referência utilizadas (%). ³Variação interna observada entre os isolados analisados neste estudo. ⁴Número de haplótipos.

Figura 2 - Árvore obtida a partir das sequências parciais do gene de β -tub, pelo método Maximum Likelihood, utilizando o modelo Tamura-Nei com suporte de bootstrap com 1000 replicatas. São mostrados valores de bootstrap acima de 70.

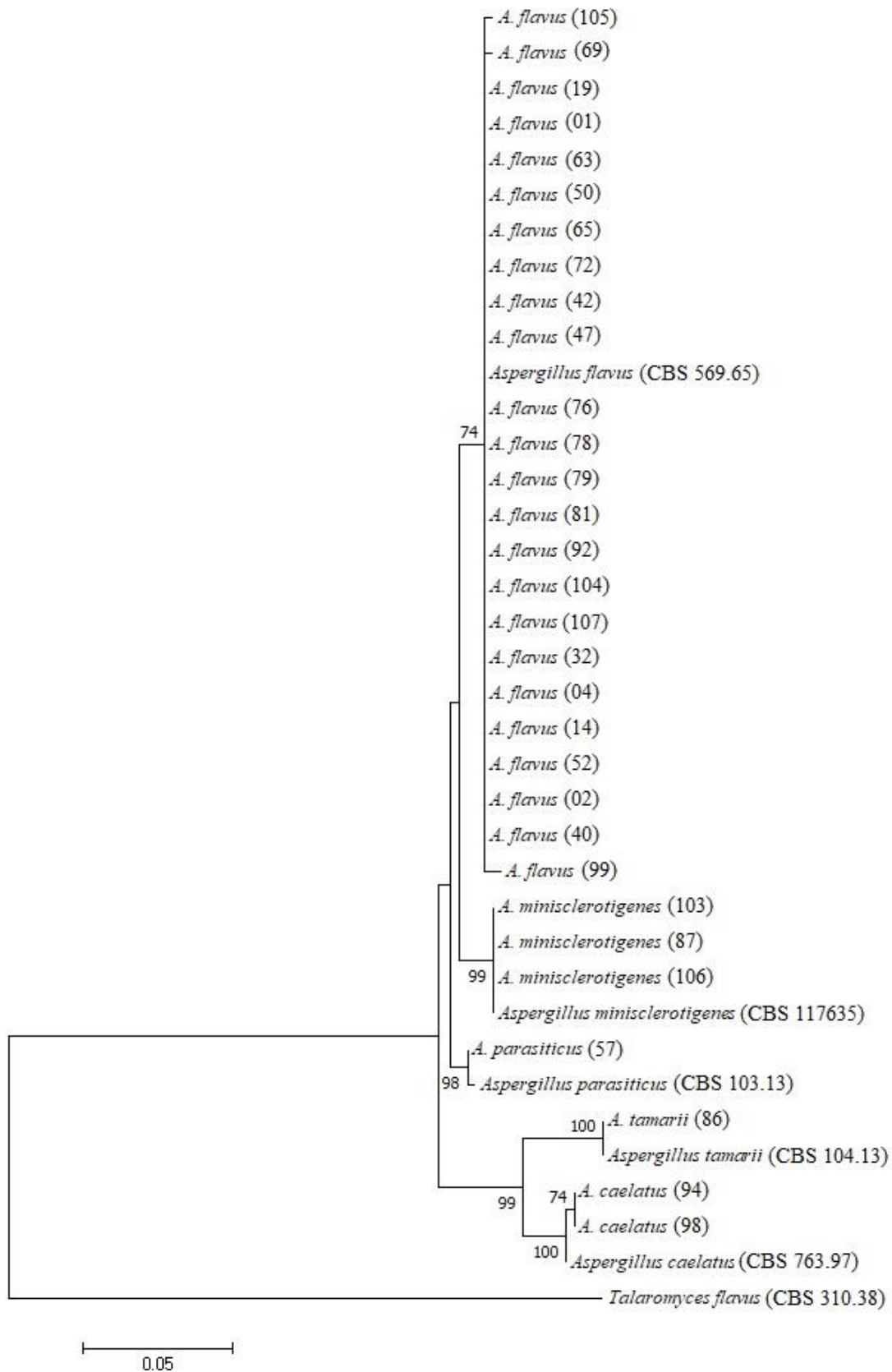
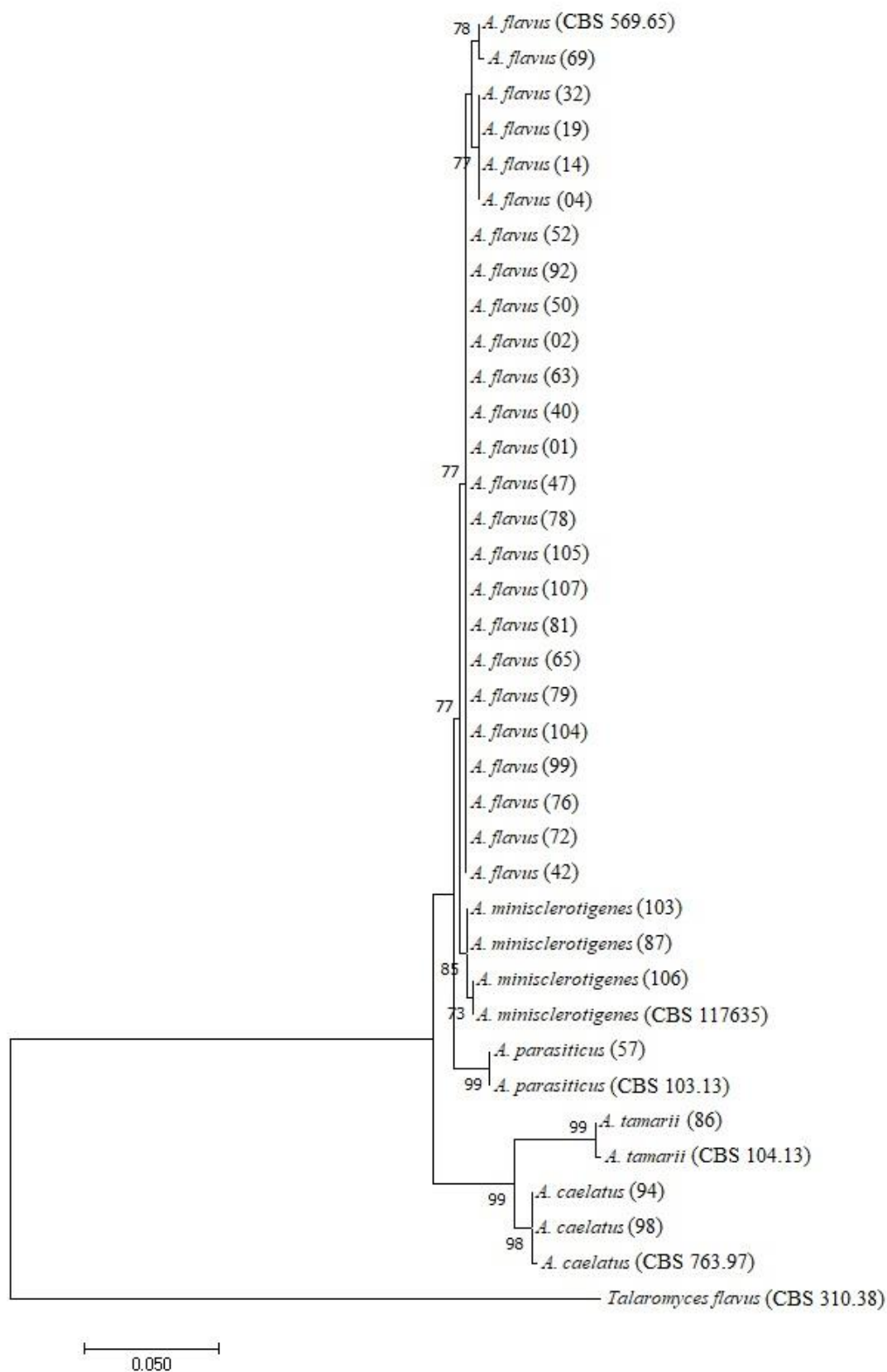


Figura 3 - Árvore obtida a partir das sequências parciais do gene de caM, pelo método Maximum Likelihood, utilizando o modelo Tamura-Nei com suporte de bootstrap com 1000 replicatas. São mostrados valores de bootstrap acima de 70.



3.3 Potencial produtivo de aflatoxinas

De maneira geral verificou-se que as aflatoxinas B1 e B2 foram produzidas por grande parte dos isolados analisados (Tabela 6). Observou-se que nas amostras do nordeste (União dos Palmares – AL e Guanambi – BA) houve detecção em maior escala de aflatoxina B1 e B2 em 90% dos isolados, tendo sido G1 e G2 produzidas em menor proporção.

Na região sudeste, nos municípios de Minas Gerais e São Paulo, houve produção de aflatoxina B1 e B2 em 90,5% e nenhum dos isolados produziram as aflatoxinas G1 e G2.

Para as amostras coletadas em Muitos Capões – RS foi verificado a produção de aflatoxina B1 e B2 por 71,42% dos isolados estudados e 42,85% além de produzir B1 e B2 também produziram as aflatoxinas G1 e G2.

Com os resultados da identificação molecular em conjunto com os resultados da produção de aflatoxinas foi possível verificar que os isolados identificados com *Aspergillus caelatus* e *A. tamarii* não produziram nenhuma das aflatoxinas testadas. Enquanto que dos três isolados de *A. minisclerotigenes*, um é produtor apenas das aflatoxinas B1 e B2 e os outros dois produziram os quatro tipos de aflatoxinas testados (B1, B2, G1 e G2), assim como o isolado de *A. parasiticus*, que também produziu os quatro tipos de aflatoxinas.

Tabela 6 - Produção de aflatoxinas dos isolados de *Aspergillus* seção *Flavi* coletados.

Local de coleta (municípios)	Número de isolados	Produção de Aflatoxinas	
		B1 e B2	G1 e G2
Guanambi - BA	40	36	1
União dos Palmares - AL	7	7	2
Rio Pardo de Minas - MG	28	26	0
Porteirinha - MG	9	10	0
Mocambinho - MG	5	5	0
Sertãozinho - SP	11	7	0
Muitos Capões - RS	7	5	3

4 Discussão

A cultura do amendoim se encontra dentre as principais hospedeiras de fungos do gênero *Aspergillus* principalmente da seção *Flavi* cuja presença é um primeiro indicativo da ocorrência de contaminação com micotoxinas. Neste contexto é importante a realização de estudos

relacionados com identificação destes organismos em nível de espécie. Embora na literatura sejam encontrados registros sobre a ocorrência e relação de *Aspergillus* na cultura do amendoim, estas informações são restritas a regiões pontuais, sem abranger diferentes áreas no país (LUO, VOGEL e NIESSEN, 2014; OLIVEIRA et al., 2015; BRAGA et al., 2017; COSTA, VERZELETTI e WAGNER, 2017; IMAMURA et al., 2014, REIS, 2009).

A ocorrência de *Aspergillus* em todas as amostras analisadas neste estudo, geralmente acima de 75%, diferentes isolados encontrados, juntamente com a sua alta capacidade de produção de aflatoxinas, reforça a preocupação que se tem sobre as reais consequências deste tipo de interação nas condições brasileiras, principalmente em relação a necessidade de fiscalização dos níveis de aflatoxinas presentes nos alimentos disponíveis para consumo. Dos 107 isolados testados para verificar o potencial de produção de aflatoxinas, 89,7% foram positivos para AFB1 e AFB2. A aflatoxina B1 é considerada o carcinogênico natural mais potente em humanos (COSTA, VERZELETTI e WAGNER 2017). Com os resultados deste estudo fica evidente o alto risco em consumir produtos contaminados com *Aspergillus*, que na sua grande maioria são produtores de substâncias tóxicas. Nesta mesma linha de estudo há relatos na literatura sobre altos percentuais de produção de aflatoxinas associados ao amendoim (BRAGA et al., 2017; COSTA, VERZELETTI e WAGNER, 2017; MARTINS et al., 2017; PILDAIN et al., 2008; REIS, 2009).

Além das aflatoxinas B1 e B2, as espécies de *A. parasiticus* e *A. minisclerotigenes* são produtoras de AFG1 e AFG2, o que também foi constatado neste estudo. Neste trabalho observou-se que outras duas espécies encontradas, *A. caelatus* e *A. tamaritii*, não produziram aflatoxinas, o que está de acordo com relatos de literatura sobre este assunto (SOUZA, 2014; MARTINS et al., 2017).

A detecção e identificação de cinco espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. caelatus*, *A. minisclerotigenes* e *A. tamaritii*) em grãos de amendoim pelas análises morfológicas e moleculares realizadas neste trabalho, confirmam resultados de outros estudos (PILDAIN et al., 2008; REIS, 2009; MARTINS et al., 2017).

Vale salientar que neste estudo não foram observadas relações diretas entre as espécies detectadas e suas origens geográficas de coleta. A espécie mais frequente, *Aspergillus flavus* foi detectada em todas as amostras analisadas independente da região de origem. Apesar do elevado número de isolados identificados via morfologia, em alguns casos há necessidade da abordagem polifásica, conforme tem sido postulado por especialistas neste processo.

Pelas análises de sequenciamento foram verificados alguns SNPs em relação às sequências de referência utilizadas, no entanto não houve alteração de aminoácidos em nenhum dos casos.

Diante dos resultados das análises realizadas neste estudo fica evidente que existem diferentes espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* em associação com sementes e grãos de amendoim nas regiões consideradas, com destaque para *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. caelatus*, *A. minisclerotigenes* e *A. tamarii*. Grande parte dos isolados estudados são capazes de produzir aflatoxinas.

Referências

- ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 86, n. 1, p. 33-49, 2004.
- AMARAL, L.B.S. Torta de amendoim e morte de suínos. **O Biol.**, 27(3):63, 1961
- BEZERRA da ROCHA, M. E., FREIRE, F. C. O., MAIA, F. E. F., GUEDES, M. I. F., RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**. v.36, ed.1, p.159-165, 2014.
- BRAGA, C. M. S. R., HOLANDA, E. G. M., BARBOSA, M. B. C., GOMES, E. B. S. Detecção presumtiva de aflatoxinas em amendoins comercializados na cidade do Recife, PE, Brasil. **Ciências Farmacêuticas**, v29, e2, p.141-146, 2017.
- BRASIL. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 1 ed., 200p.
- CONAB – Companhia nacional de Abastecimento, 2018. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Décimo segundo levantamento, safra 2017/2018.
- COSTA, F.D., VERZELETTI, F. B., WAGNER, R. Isolamento e identificação das aflatoxinas B1 e B2 de *Aspergillus parasiticus* em alimentos. **Cadernos da Escola de Saúde**, Curitiba. v11, p.65-78, 2017.
- FILTENBORG, O., FRISVAD, J. C., SVENDSEN, J. A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, 45, 581, 1983.
- FREITAS, V. P. S., BRIGIDO, B. M. Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 IN: **Peanuts and their products marketed in there gion of Campinas**, Brazilian 1995 and 1996. **Food Additives and Contaminants**, 15, 807-811, 1998.
- GLASS, N.L., DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **App. and Environmental Microbiol.** 61, 1323-1330, 1995.
- HONG, S.B., GO, S.J., SHIN, H.D., FRISVAD, J.C., SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, v. 97, p. 1316–1329. doi:10.3852/mycologia.97.6.1316. 2005.

HUSSAIN, A.; AFZAL, A.; IRFAN, M.; MALIK, K. A. Molecular detection of Aflatoxin Producing Strains of *Aspergillus flavus* from Peanut (*Arachis hypogaea*). Turkish Journal of Agriculture – **Food Science and Technology**, 3(5): 335-341, 2015.

IMAMURA, K. B., TONI, J. C. V., BOCCHÉ, M. A. L.; SOUZA, D. A., GIANNONI, J. A. Incidência de aflatoxinas no amendoim, (*Arachis hypogaea* L.) cru em casca da região da Alta Paulista - SP, durante o período de 2011 a 2012. **Revista Inst Adolfo Lutz**, 73(2):178-87, 2014.

KLICH, M. A. Identification of Common *Aspergillus* species. Netherlands: **Centraalbureau voor Schimmelauteurs**. p. 116, 2002.

KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, 33 (7), 1870-1874. <http://doi.org/10.1093/molbev/msw054>. 2016.

LUO, J., VOGEL, R.F., NIESSEN, L. Rapid detection of aflatoxin producing fungi in food by real – time quantitative loop-mediated isothermal amplification. **Int. J. Food Microbiol.** v.44, p.142–148. 2014.

MARTINS, L. M., SANT’ANA, A. S., FUNGARO, M. H. P., SILVA, J. J., NASCIMENTO, M. S., FRISVAD, J. C., TANIWAKI, M. H. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in the Brazilian peanut production chain. **Food Research International**. 94; 101-107, 2017.

MIDORIKAWA, G. E. O., 2014. **Aspergillus** seção *Flavi*: caracterização molecular de espécies aflatoxigênicas da castanha do Brasil e análise do transcriptoma de *Aspergillus oryzae* em relação a degradação enzimática do bagaço da cana-de-açúcar. Qualificação (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, DF. 194 p.

MITCHELL, N.J.; BOWERS, E.; HURBURGH, C.; WU, F. Potential economic losses to the USA corn industry from aflatoxin contamination. **Food Addit Contam Part A hem Anal Control Expo Risk Assess.** March; 33(3): 540–550, 2016.

MOHAMMED, A., CHALA, A. Incidence of *Aspergillus* contamination of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in Eastern Ethiopia. **African Journal of Microbiology Research**. v.8, p.759-765, 2014.

OLIVEIRA, A. V., DEL PRADO, C. C. N., MODESTO, N. G., LUCENA, G. Detecção molecular de fungos com potencial toxigênico em amostras de amendoim vendidas no comércio varejista de Maringá/PR, Brasil. **Biotemas**, 28 (1): 13-19, 2015.

PILDAIN, M. B., FRISVAD, J. C., VAAMONDE, G., CABRAL, D., VARGA, J., SAMSON, R. A. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.58, p.725–735, 2008.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.). Integration of modern taxonomic methods of *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Amsterdam: **Harwood Academic.**, p. 9-49, 2000.

POMERANZ, Y. Biochemical, functional and nutritive changes during storage. In: CHRISTENSEN, C.M. (ed). **Storage of cereal grains and their products**, p. 145-217, 1982.

PROBST, C.; NJAPAU, H.; COTTY, P. Outbreak of an Acute Aflatoxicosis in Kenya in: Identification of the Causal Agent, 2007. **Microbiology**, Vol. 73, No. 8, p. 2762– 2764, 2004.

REIS, G. M., 2009. **Variabilidade genética de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 41 p., 2009.

SOUZA, S. C., 2014. **Crescimento de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* e produção de ocratoxina A em meio de cultura sintético e a base de produtos agrícola**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. 84 p., 2014.

STEVENS, A. J., SAUNDERS, C. N., SPENCE, J. B., NEWHAM, A. G. Investigations into "diseases" of turkey poults. **Vet. Rec.**, 72(31):627, 1960.

VISAGIE, C.M.; VARGA, J.; HOUBRAKEN, J.; MEIJER, M.; KOCSUBÉ, S.; YILMAZ, N.; FOTEDAR, R.; SEIFERT, K. A.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). **Studies in Mycology**, v.78, p1-61, 2014.

ARTIGO 2

**EFEITOS E TRANSMISSÃO DE *Aspergillus flavus* POR SEMENTES DE
AMENDOIM**

EFFECTS AND TRANSMISSION OF *Aspergillus flavus* BY PEANUT SEEDS

Poliana Patrícia Lima^{1*}, José da Cruz Machado¹, Iara Eleutéria Dias¹

¹Departamento de Fitopatologia, UFLA, Caixa Postal 3037, 37200-000 – Lavras-MG, Brasil

*Autor para correspondência: poliana.agro@gmail.com

Efeitos e transmissão de *Aspergillus flavus* por sementes de amendoim

Poliana Patrícia Lima¹, José da Cruz Machado¹, Iara Eleutéria Dias¹, Luís Roberto Batista²

O cultivo do amendoim no Brasil vem crescendo de maneira acelerada em razão do aumento da demanda por grãos desta oleaginosa no âmbito interno e para exportação. Para o aumento de rendimento da cultura a qualidade de sementes é um fator imprescindível. Entre os principais indicadores da qualidade de sementes estão germinação, vigor, longevidade e sanidade. Como as sementes de amendoim não são utilizadas logo após a colheita, geralmente elas permanecem armazenadas por períodos variáveis. Nesta condição as sementes ficam vulneráveis ao ataque de fungos, principalmente do gênero *Aspergillus*. Com a contaminação das sementes por estes fungos, a qualidade fisiológica pode ser comprometida. Neste trabalho o objetivo principal foi verificar as relações biológicas entre sementes de amendoim e *Aspergillus flavus*, levando-se em consideração os efeitos do fungo, com diferentes níveis de potencial de inóculo, na germinação, vigor e sanidade das sementes armazenadas e não armazenadas. Para a obtenção dos diferentes níveis de potencial de inóculo foi utilizada a inoculação artificial de sementes, por meio da técnica de condicionamento hídrico. Os danos mais severos causados às sementes inoculadas ocorreram nos potenciais de inóculo mais elevados havendo uma proporcionalidade inversa entre estes fatores. A germinação das sementes sofreu uma redução média de 72% no maior potencial de inóculo. Ao final das avaliações de estande observou-se que houve em torno de 10% de plantas mortas em decorrência do ataque do patógeno. Pelos testes de germinação verificou-se que os efeitos do fungo foram mais drásticos aos 60 dias de armazenamento, chegando ao nível de apenas 1% de plântulas normais no maior potencial de inóculo. No potencial de inóculo mais elevado foi verificado que a taxa de transmissão do fungo pelas sementes foi de 21%, tendo o fungo sido isolado com maior frequência da inserção cotiledonar de plantas emergidas.

Palavras-chave: Patologia de sementes. Germinação. Vigor. Armazenamento.

Effects and transmission of *Aspergillus flavus* by peanut seeds

Poliana Patrícia Lima¹, José da Cruz Machado¹, Iara Eleutéria Dias¹, Luís Roberto Batista²

ABSTRACT - The peanut cultivation in Brazil has been increasing due to the high demand for oilseed and grain exportation. The seed quality is an essential factor for the increase of the crop yield, and its assessment by germination, vigor, longevity and sanity. As the peanut seeds are not used as soon as they are harvested, they usually remain stored for varying periods. In this condition the seeds become vulnerable to the attack of fungus, like *Aspergillus* species. Contaminated seeds by these fungus may present low physiological quality, which leads to bad development of the crop in the field. The objective of this work was to verify the biological relations between peanut seeds and *Aspergillus flavus*, and the effects of these fungus on germination, vigor and sanity of stored and non-stored seeds inoculated at different levels of inoculum potential. The seed inoculation was performed using the water conditioning technique. The highest damage to seed quality was caused by the highest inoculum potentials of *Aspergillus flavus*. Seed germination percentage decreased 72% on the highest inoculum potential. By the emergency test, 10% of seeds were killed by the fungal attack. By the germination test, it was observed that the highest damage caused by the pathogen at the higher inoculum potential to seeds occurred 60 days after storage; only 1% of normal seedlings survived under this condition. Transmission of *A. flavus* in peanut seeds varied according to the inoculum potential, reaching 21% rate at the highest inoculum potential.

Keywords: Seed pathology. Germination. Vigor. Storage.

1 Introdução

O Brasil é um tradicional produtor e exportador de amendoim na forma de grãos. A produção nacional desta *commodity* na safra de 2017/2018 foi de 511,5 mil toneladas, da qual cerca de 25% foram exportadas (CONAB, 2018). Atualmente o cultivo desta oleaginosa encontra-se em expansão principalmente devido ao aumento da demanda para consumo interno e exportações.

Um dos principais componentes para o aumento de rendimento da cultura é a qualidade de sementes. Dentre os atributos que indicam essa qualidade estão os aspectos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários. A qualidade fisiológica das sementes engloba a capacidade de germinação, vigor, longevidade e a sanitária, que diz respeito a ocorrência de fungos, bactérias e vírus em lotes de sementes. A presença destes agentes em associação com sementes são responsáveis por perdas diretas e indiretas, sendo estas sementes meios de disseminação de inóculo entre regiões produtoras (PEREIRA, 2006; SANTOS, 2013).

As sementes de amendoim geralmente apresentam baixos percentuais de germinação, devido às condições de cultivo, colheita e características químicas e estruturais (MARCHI et al., 2011). De acordo com a Instrução Normativa nº 45 de 17 de setembro de 2013 que estabelece padrões para produção e comercialização de sementes de amendoim no Brasil, o percentual mínimo de germinação deve ser de 60% para sementes básicas e de 70% para as demais categorias (certificada de 1º e 2º geração, sementes de 1º e 2º geração – C1, C2, S1 e S2), com validade de 8 meses. Para os padrões sanitários de sementes as normas existentes estabelecem níveis de tolerância para algumas doenças em campos de produção de sementes básicas. Atualmente estes padrões de campo são limitados às doenças, murcha de *Sclerocium* (*Athelia rolfsii*) e *Sclerotinia sclerotiorum*, cujo nível tolerável é zero.

Pelo sistema usual de cultivo do amendoim no Brasil, as sementes não são prontamente utilizadas logo após a colheita, permanecendo armazenadas por períodos de tempo variáveis até o momento do plantio. Nesta condição, a capacidade de conservação das sementes fica dependente da sua qualidade inicial e das condições de ambiente (CARVALHO e NAKAGAWA, 2012). O controle de fatores abióticos como temperatura e umidade entre outros, é essencial para evitar o desenvolvimento de fungos e evitar o aumento da atividade metabólica das sementes, que poderão ocasionar a deterioração das mesmas. A umidade das sementes no período de armazenamento é também de extrema importância, devendo ser inferior a 11% para evitar o desenvolvimento de fungos na pós-colheita.

Pela literatura, percebe-se que alguns estudos têm abordado a associação entre *Aspergillus* sp. e a cultura do amendoim incluindo a fase de armazenamento (LUO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015; MITCHELL et al., 2016; HUSSAIN et al., 2015). A abordagem nestes estudos é dedicada em sua maioria à ocorrência e produção de micotoxinas decorrentes da ação destes organismos. Estes fungos são de grande importância pela capacidade de contaminar os produtos e produzir micotoxinas nas fases de pré e pós-colheita (GONÇALEZ et al., 2008).

No caso de sementes, os efeitos desta interação ainda são pouco conhecidos. Presume-se que a associação com *Aspergillus* e *Penicillium* seja considerada um dos principais fatores responsáveis pela perda de qualidade das sementes, ocasionada por mudanças bioquímicas, produção de toxinas ou modificações celulares, que podem resultar em menor capacidade de germinação e perda de vigor (MACHADO, 1988; BÓREM et al., 2006).

Diante do exposto, o objetivo neste trabalho foi verificar as relações entre *Aspergillus flavus* e sementes de amendoim, considerando-se os efeitos do patógeno no desempenho das sementes contaminadas e a sua taxa de transmissão via sementes.

2 Material e métodos

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras - UFLA, no período de novembro de 2017 à janeiro de 2018. Foram utilizadas sementes da variedade Tatu Vermelho da safra de 2016/2017 cedidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, cujo perfil de qualidade apresentava germinação de 90% e a presença dos fungos *Penicillium*, *Aspergillus* seção *Flavi*, *Aspergillus* seção *Nigri* e *Rhizopus* sp em níveis de 5%, 28%, 8% e 5%, respectivamente.

O isolado de *Aspergillus flavus* (SERSPII7) utilizado para inocular as sementes de amendoim foi proveniente de amostras de sementes produzidas no Estado de São Paulo e pertencente à Coleção Micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA.

Para a inoculação das sementes foi utilizada a metodologia de condicionamento hídrico desenvolvida na Universidade Federal de Lavras (MACHADO et al., 2001). Por esta técnica o substrato utilizado para o cultivo do fungo foi o meio BDA (Extrato de batata-dextrose-ágar) acrescido de manitol como restritor hídrico. O cálculo da concentração do soluto foi realizado com base no software SPPM (MICHEL e RADCLIFFE, 1995), tendo sido utilizados 84,7g de manitol e 39g de BDA por litro de água, correspondente ao potencial osmótico de -1,2 Mpa.

Sobre o meio agarizado vertido em placas de Petri de 15 cm de diâmetro na proporção de 50 ml/placa, foram distribuídos uniformemente 2 ml de uma suspensão de conídios do isolado de *A. flavus* cultivado por sete dias em meio de cultura BDA na temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12h de luz/escuro.

As placas contendo o inóculo permaneceram em BOD por sete dias, com temperatura de 25°C e 12h de luz. Ao final deste período, as sementes de amendoim foram dispostas sobre as colônias fúngicas em camadas simples, permanecendo por quatro períodos de: 24, 48, 72 e 96 horas. A temperatura utilizada foi de 20°C e fotoperíodo de 12 h de luz/escuro. O tempo 0h foi considerado a testemunha, onde as sementes não entraram em contato com o patógeno. Em seguida as sementes foram retiradas das placas e secas por 48h em ambiente com temperatura de 25°C.

Parte das sementes inoculadas foi submetida aos testes para verificar os efeitos do patógeno em plantas e nas sementes logo após a inoculação. As avaliações foram realizadas por meio dos testes: sanidade (blotter teste), germinação, vigor (emergência e envelhecimento acelerado). Pelo teste de emergência em bandejas contendo substrato de solo, na proporção de 1:1 (areia e composto orgânico), foram avaliados: IVE, peso de parte aérea e do sistema radicular seco, estande inicial e final, e taxa de transmissão do fungo pelas sementes.

O restante das sementes foi submetido ao armazenamento pelo período de 60 dias em duas condições ambientais. A primeira em câmara fria com temperatura em torno de 10°C e umidade relativa do ar variando de 50 a 80% e a segunda em condições naturais de laboratório, onde não houve controle de temperatura e umidade. A temperatura e umidade de ambos os locais foram aferidas diariamente (Apêndice B). O teste de germinação e blotter teste foram realizados aos 30 e 60 dias de armazenamento.

Para avaliar os efeitos de *Aspergillus flavus* no desempenho das sementes foram realizados testes de germinação, vigor (índice de velocidade de emergência - IVE), e emergência em bandejas pelo qual foram avaliados: estandes, inicial e final, peso de parte aérea e sistema radicular seco das plantas emergidas.

Para o teste de germinação utilizou-se o método de rolo de papel esterilizado e água destilada 2.5x o peso do papel. Foram utilizadas 25 sementes por rolo, totalizando 200 sementes por tratamento, que foram mantidos na temperatura de 25°C. A primeira leitura foi realizada cinco dias após a montagem do teste e a segunda aos 10 dias. Esse teste foi adaptado das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) e o resultado expresso em porcentagem de sementes normais.

O teste de emergência (IVE) foi conduzido em bandejas plásticas contendo composto orgânico e areia autoclavados na proporção de 1:1. Foram semeadas 25 sementes por bandeja e o ensaio foi conduzido em dois ambientes diferentes, um ambiente constituído de câmara de crescimento vegetal, com temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e a outra condição foi casa de vegetação sem controle de temperatura e umidade. Os ambientes utilizados foram escolhidas para verificar o efeito do fungo nessas condições. Em ambos os casos, temperatura e umidade foram monitoradas e registradas diariamente (Apêndice A). Em ambos ambientes, regas foram realizadas diariamente de forma homogênea e periódicas entre os tratamentos. Para determinar o IVE foram contadas as plantas emergidas diariamente (foram consideradas as plantas com cotilédones acima do solo) e posteriormente efetuando o cálculo pela fórmula de Maguire (1962). O estande inicial foi contado aos 10 dias após o plantio, quando a maioria das plantas já havia emergido e o estande final aos 30 dias após a semeadura. Para verificar o peso, as plantas foram retiradas das bandejas e divididas em parte aérea e sistema radicular. Em seguida as plantas foram acondicionadas em saco de papel e mantidas em estufa de circulação de ar com temperatura em torno de 65°C durante cinco dias e pesadas para obtenção de peso seco.

Para verificar a incidência do patógeno, as sementes foram submetidas ao blotter teste salino. Utilizou-se placas de Petri de vidro de 150 mm de diâmetro, contendo três folhas de papel germitest umedecidas com meio de cultura salino (NaCl 6% + ágar 1%) (adaptado de BRASIL, 2009). Foram colocadas 25 sementes por placa, totalizando 200 sementes por tratamento. As placas contendo as sementes permaneceram à 20°C por sete dias. Em seguida realizou-se a leitura com o auxílio de microscópio estereoscópico e quando necessário foi utilizado o microscópio ótico para confirmar a identificação do patógeno. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes contaminadas.

O teste de envelhecimento acelerado foi realizado conforme descrito por Marcos Filho (1999). Uma camada única de sementes foi colocada sobre uma tela metálica suspensa dentro de um gerbox (11x11x3,5 cm) contendo 40 ml de água destilada. Os gerboxes contendo as sementes foram mantidos a 42°C durante 72 horas no escuro. Após esse período foi realizada a avaliação da germinação destas sementes nas mesmas condições descritas anteriormente.

Para avaliar a taxa de transmissão do fungo pelas sementes foi utilizado o mesmo ensaio conduzido para verificar a emergência (duas condições de cultivo: casa de vegetação e câmara de cultivo vegetativo). Decorridos 30 dias da semeadura foi realizado o exame de fragmentos de três partes das plantas emergidas (inserção cotiledonar, 1º e 2º inserção foliar). Os fragmentos foram desinfestados em álcool 70% e hipoclorito de sódio 1% e em seguida

colocados em placa de Petri de 60 mm de diâmetro contendo meio BDA. Em seguida as placas foram incubadas em BOD com temperatura de 25°C e a avaliação ocorreu aos sete dias, verificando a presença ou ausência do patógeno inoculado. A taxa de transmissão foi calculada por meio da fórmula descrita por Teixeira e Machado (2003).

As análises de variância foram realizadas utilizando o programa estatístico Sisvar® software versão 5.3 (FERREIRA, 2011). O experimento foi montado no Delineamento Blocos Casualizados, com fatorial de 2x5, duas condições ambientais e cinco períodos de inoculação, com exceção dos testes de germinação e Blotter teste, onde havia apenas os cinco períodos de exposição. O teste utilizado foi regressão ($P < 0,05$).

3 Resultados

De modo geral os efeitos mais acentuados no desempenho das sementes de amendoim foram registrados nos potenciais de inóculo mais elevados do fungo. Nesta condição a germinação foi drasticamente reduzida.

Por este teste, foi possível verificar que houve uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$) na porcentagem de plântulas normais, proporcional aos aumentos de potencial de inóculo do patógeno (Figura 1A). No maior potencial de inóculo, P96, as sementes apresentaram uma porcentagem de 12,5% de plântulas normais, em contraste ao percentual médio de 84,5% das sementes não inoculadas. Esses valores indicam uma redução de 72% na germinação.

Por meio do teste de sanidade observou-se que houve um aumento da incidência de *A. flavus* proporcional ao aumento do potencial de inóculo de *Aspergillus flavus* (Figura 1B). A análise estatística destes dados foi significativa a nível de 5% de probabilidade. A incidência de *A. flavus* nas sementes com potencial de P96 foi de 99%, enquanto na testemunha (não inoculada), P0, foi de 33%, apresentando assim um aumento de 66% na incidência deste patógeno. Vale salientar que as sementes já continham inicialmente o fungo em incidência em de 28%. Além de verificar os sinais do patógeno nas sementes, com este teste foi possível averiguar, de certa forma uma maior intensidade do inóculo produzido na superfície das sementes, havendo variações desta intensidade de acordo com os diferentes níveis de potencial de inóculo.

Pela análise de regressão dos dados do teste de envelhecimento acelerado foi verificado significância a nível de 5% de probabilidade. Por este teste, a germinação foi em média de 1,5%

de plântulas normais no maior potencial de inóculo, P96. Já no potencial P48 o valor médio foi de 26% e em P0 foi de aproximadamente 62% (Figura 2A).

Em relação ao vigor representado pelo IVE, peso seco e estande final, não observou-se correlação significativa entre os potenciais de inóculo e as condições ambientais de cultivo, no entanto, esses fatores foram significativos isoladamente ($P < 0,05$). Os dados de estande inicial apresentaram correlação significativa ($P < 0,05$). Conforme ilustrado nas figuras 2B, 2C, 2D, 2E e 2F foi possível observar que as sementes com maior potencial de inóculo foram mais afetadas. Quanto às condições ambientais de cultivo do amendoim, a ação do patógeno foi mais acentuada em câmara de cultivo vegetal, cujas condições são controladas, tendo sido observado um menor número de plantas no estandes inicial e final.

No estande inicial e para o potencial de inóculo P96, foram contabilizadas 60% de plantas emergidas em condições naturais e 47% de plantas emergidas em condições controladas. Neste mesmo potencial (P96) constatou-se que houve morte de plantas, pois no estande final a porcentagem de plantas contabilizadas foi 51% e 36%, respectivamente em condições naturais e controladas.

Pelos dados de peso de parte aérea seca, observou-se que no maior potencial de inóculo, P96, em condições de casa de vegetação, houve uma redução média de 61% desta variável em relação à testemunha, P0 (Figura 2C). Por sua vez nas condições controladas a redução foi em torno de 44%.

Os resultados dos testes de germinação e sanidade, realizados nas sementes avaliadas aos 30 e 60 dias de armazenamento apontaram diferenças significativas ($P < 0,05$), no entanto apenas a germinação apresentou correlação positiva com potenciais de inóculo e condições de armazenamento. Aos 30 dias de armazenamento observou-se que no potencial de inóculo P96 os valores de germinação foram inferiores aos demais potenciais em ambas as condições de armazenamento. Nas sementes armazenadas em câmara fria a porcentagem de germinação foi em torno 10% e nas sementes armazenadas em condições naturais foi de 11,5% (Figura 3A). Por outro lado, o percentual de germinação de sementes armazenadas por 60 dias diminuiu drasticamente, caindo para 1% em ambas as condições de armazenamento (Figura 3C). Para as sementes não contaminadas foi possível observar que em condições controladas de armazenamento (câmara fria) a porcentagem de plântulas normais foi superior àquelas que permaneceram em condições naturais de armazenamento, nos dois períodos analisados.

Pelo teste de sanidade das sementes armazenadas, no maior potencial de inóculo do fungo (P96) e nos dois períodos avaliados (30 e 60 dias – Figuras 3B e 3D) os valores

percentuais de incidência de *Aspergillus flavus* detectados nas duas condições de armazenamento foram em torno de 95%. Nas sementes não inoculadas e armazenadas em condições naturais os valores de incidência do patógeno foram de 59,5% e 60% para os dois períodos avaliados, 30 e 60 dias. Para o armazenamento em condições controladas (câmara fria) os percentuais de incidência do fungo foram 54,5% e 58% para ambos os períodos avaliados (30 e 60 dias). Nos demais potenciais de inóculo, P24, P48 e P72, a incidência do patógeno atingiu no mínimo valores de 80%, ressaltando, no entanto, que o índice de intensidade do inóculo observado junto às sementes, foi menor nos menores potenciais de inóculo.

Em ambas as condições de cultivo pelo teste de emergência foi verificado que houve transmissão do patógeno de sementes para plantas emergidas com significância a nível de 5% de probabilidade. A taxa de transmissão em ambas as condições de cultivo ocorreu em média de 21%, com base no exame de fragmentos da inserção cotiledonar e na primeira inserção foliar, no potencial de inóculo mais elevado, P96 (Figuras 4A e 4B). A taxa de transmissão verificada nos fragmentos de inserção cotiledonar em P0 nas duas condições ambientais de cultivo foi em torno de 6%. Nos fragmentos retirados da primeira e segunda inserção foliar não foi verificada presença do patógeno em P0 em nenhuma das condições ambientais.

4 Discussão

A interação de patógenos com sementes é uma preocupação do ponto de vista de manejo de doenças que, em sua maioria, causam danos com severidade na cultura em desenvolvimento, além de afetar diretamente as sementes, impedindo a obtenção de estandes de acordo com padrões esperados. Para todos os patógenos que se associam às sementes é fundamental o conhecimento sobre o grau desta interação, tendo em vista a construção de estratégias de controle das doenças correspondentes. Em geral, os fungos associados às sementes são agrupados em dois grandes grupos com base em seu comportamento ecológico, no caso, fungos de campo e fungos de armazenamento. No presente estudo verificou-se que a espécie *Aspergillus flavus*, que é um dos principais produtores de toxina danosa ao homem e animais, afetou drasticamente o desempenho de sementes de amendoim. Portanto, fica claro que esta espécie deve ser considerada com especial atenção em programas de qualidade de sementes de amendoim, podendo ser comparada às espécies de fungos considerados de campo, que são organismos tipicamente patogênicos, capazes de causar danos dos mais variáveis aos seus hospedeiros.

Com base em algumas variáveis consideradas neste estudo, os danos causados por *A. flavus* foram em níveis equiparáveis aos fungos fitopatogênicos, associados às sementes de amendoim, como espécies de *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia* etc (BELLETTINI et al., 2005; MORAES et al., 2001; GUERRA, 2013). Vale destacar que um aspecto de suma importância observado neste estudo foi a correlação positiva detectada entre potenciais de inóculo de *A. flavus* e o desempenho das sementes de amendoim, representado pela germinação e pelo vigor com reflexo nos estandes e pesos de plantas emergidas em diferentes condições de cultivo.

Na comparação entre diferentes condições de armazenamento, para dois períodos de tempo avaliados, a ação do fungo foi mais severa em sementes inoculadas e armazenadas em condições ambientais naturais, com níveis de danos diretamente proporcionais aos potenciais de inóculo inicial das sementes. Diferente de informações de literatura que abordam as relações entre fungos de armazenamento e qualidade de sementes, os danos causados por *A. flavus* em sementes de amendoim foram severos independentemente das condições de cultivo. Em geral, postula-se que estes organismos são mais prejudiciais às sementes de amendoim em condições de estresse durante o armazenamento, ocasião em que provocam deteriorações de tecidos colonizados.

Fungos do gênero *Aspergillus* são considerados de armazenamento devido à habilidade de colonizarem substratos com teores de água relativamente baixos, porém acima dos níveis recomendados para o armazenamento de cada espécie de sementes (LINS, 2014). Algumas espécies deste gênero causam deterioração das sementes com umidade relativa do ar em torno de 70% (TANAKA, 2001). Neste ambiente as sementes tornam-se vulneráveis à ação daquelas espécies, o que não ocorre com fungos de campo, que requerem umidades do ambiente em torno de 100%. Para o armazenamento de sementes e grãos de forma segura, a umidade dos mesmos deve estar entre 8-10°C e a umidade e temperatura do ambiente não podem ultrapassar 70% e 10-15°C respectivamente (EMBRAPA, 2004).

Em outros trabalhos, realizados com este mesmo patógeno em outras culturas foram observadas reduções variáveis na porcentagem de germinação e da população de plantas em testes de emergência (SANTOS-CISCON, 2017). É importante salientar, entretanto, que nestes trabalhos não houve informação sobre o nível de potencial de inóculo dos fungos nas sementes utilizadas.

Apesar da ausência de sintomas típicos de doenças nas plantas de amendoim oriundas de sementes inoculadas, os dados de IVE, peso e estande foram úteis para avaliar os efeitos

danosos de *A. flavus* a partir das sementes portadoras deste fungo. Com base nesses parâmetros foram verificadas reduções significativas causadas pela ação do patógeno, principalmente nos maiores potenciais de inóculo. No caso do IVE, os valores médios verificados nas condições controladas de cultivo podem ser atribuídos às características fisiológicas das plantas, já que a temperatura média de cultivo foi menor do que a exigida pela cultura (em torno de 30°C). Além disso, o alto potencial de inóculo nas sementes pode ter contribuído para os valores inferiores deste índice. A redução do estande final verificada em alguns casos, possivelmente ocorreu pela ação do patógeno no início do desenvolvimento das plantas.

O principal objetivo no armazenamento de sementes é propiciar condições adequadas para a manutenção da qualidade deste insumo. Diferente dos fungos de campo a ação danosa dos fungos de armazenamento concentra-se no período pós-colheita, embora o inóculo inicial tenha sua origem, na maioria dos casos, nos campos de produção. Além dos fatores que predisõem as sementes aos fungos na pós-colheita, como danos físicos, presença de insetos, etc. a quantidade inicial de inóculo nas sementes exerce papel fundamental no processo de deterioração. Neste estudo ficou evidente que *Aspergillus flavus* pode causar danos severos às sementes de amendoim proporcionais aos níveis de potencial de inóculo inicial do fungo no começo do período de armazenamento.

A transmissão de *Aspergillus flavus* decorrente de sua associação com as sementes de amendoim ocorrem em níveis médios inferiores aos valores observados para fungos fitopatogênicos de campo, como *Sclerotinia sclerotiorum* em soja, feijão e algodão, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em algodão, *Stenocarpella maydis* em milho, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijão, cujos índices oscilam na faixa de 40-60%, podendo atingir percentuais próximos de 100% em potenciais de inóculo mais elevados, (ZANCAN, 2014; BOTELHO, 2011; ARAÚJO et al., 2006; BARROCAS, 2008; SIQUEIRA et al., 2016; SOUSA, 2014).

Apesar dos aparentes níveis baixos da taxa de transmissão de *A. flavus* neste trabalho, que foram em média de 18% para potencial de inóculo em níveis medianos, podendo chegar a 21% no maior potencial, é importante ressaltar que o uso de sementes de amendoim portadoras de inóculo do referido fungo nestas condições, representa um elevado risco para o sucesso deste tipo de cultivo. Vale lembrar que espécies de *Aspergillus* apresentam uma alta capacidade de estabelecimento no solo e isto faz com que plantios sucessivos de amendoim, nas mesmas áreas, garantam a sobrevivência e multiplicação do fungo por longos períodos de tempo.

Com o presente trabalho é possível concluir que sementes de amendoim contaminadas com *Aspergillus flavus*, principalmente com altos níveis de potencial de inóculo, podem ter seu desenvolvimento extremamente comprometido, levando-se em consideração germinação e vigor. Em relação à taxa de transmissão deste fungo via sementes de amendoim, em níveis de até 21%, fica claro portanto a necessidade de se determinar o perfil de qualidade sanitária das sementes antes do plantio e com base nestes resultados tomar medidas de controle como o tratamento sanitário de sementes.

Figuras

Figura 1 - Percentual de germinação das sementes (A) e de incidência de *Aspergillus flavus* (B) em função de diferentes níveis de potencial de inóculo do patógeno.

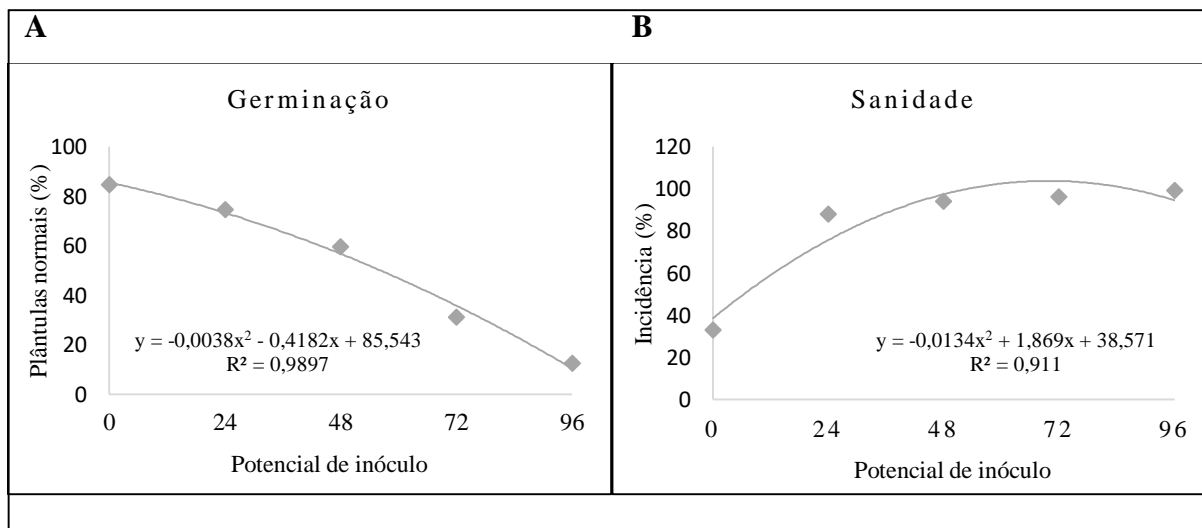


Figura 2 - Testes de vigor realizados nas sementes de amendoim inoculadas com *Aspergillus flavus* com diferentes níveis de potencial de inóculo. (CN) Condições naturais, (CC) condições controladas.

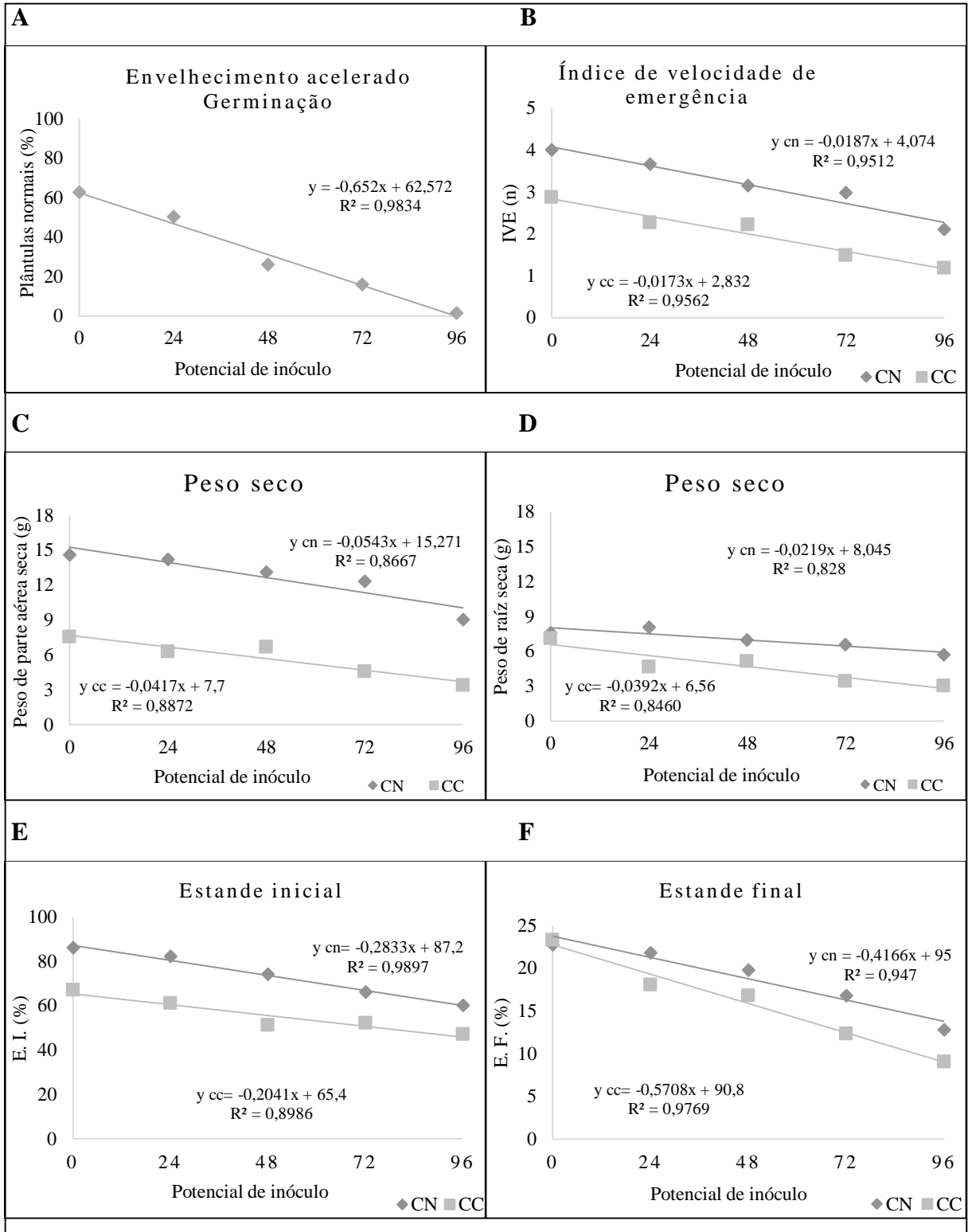


Figura 3 - Percentual de germinação (A e C) e incidência de *Aspergillus flavus* (B e D) em função de diferentes níveis de potencial de inóculo do patógeno em sementes armazenadas por 30 e 60 dias. (CN) Condições naturais de armazenamento, (CC) condições controladas de armazenamento.

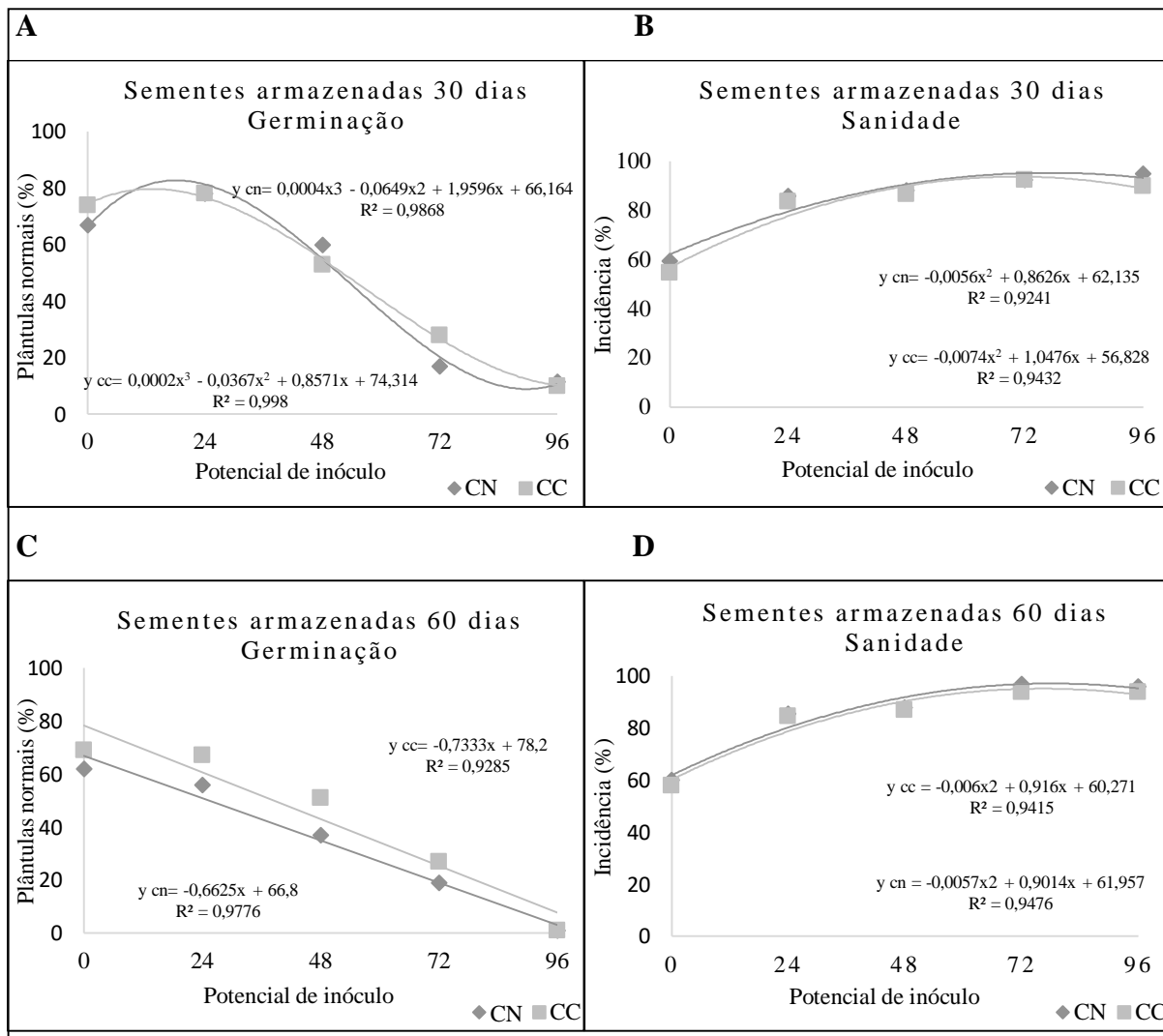
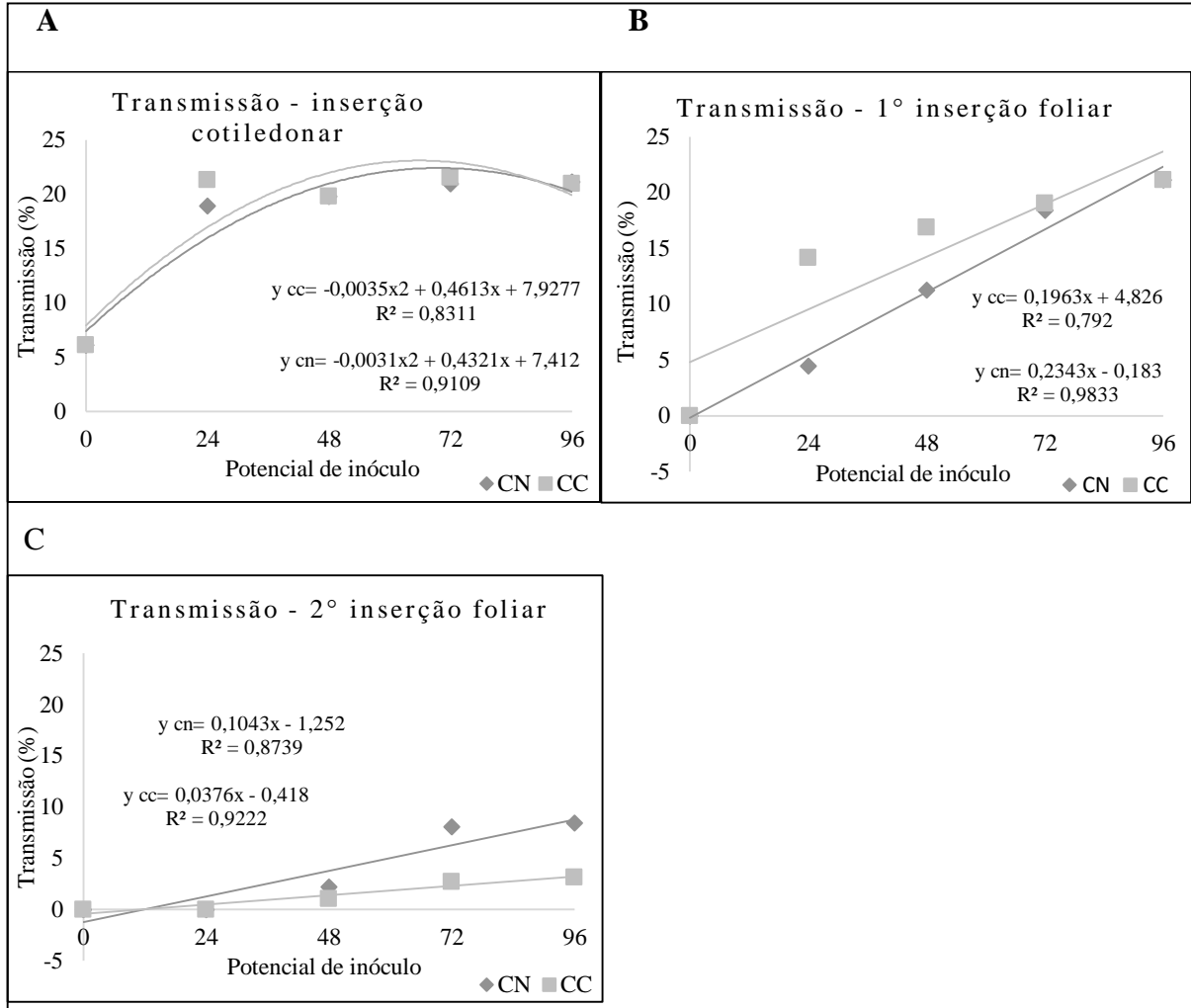
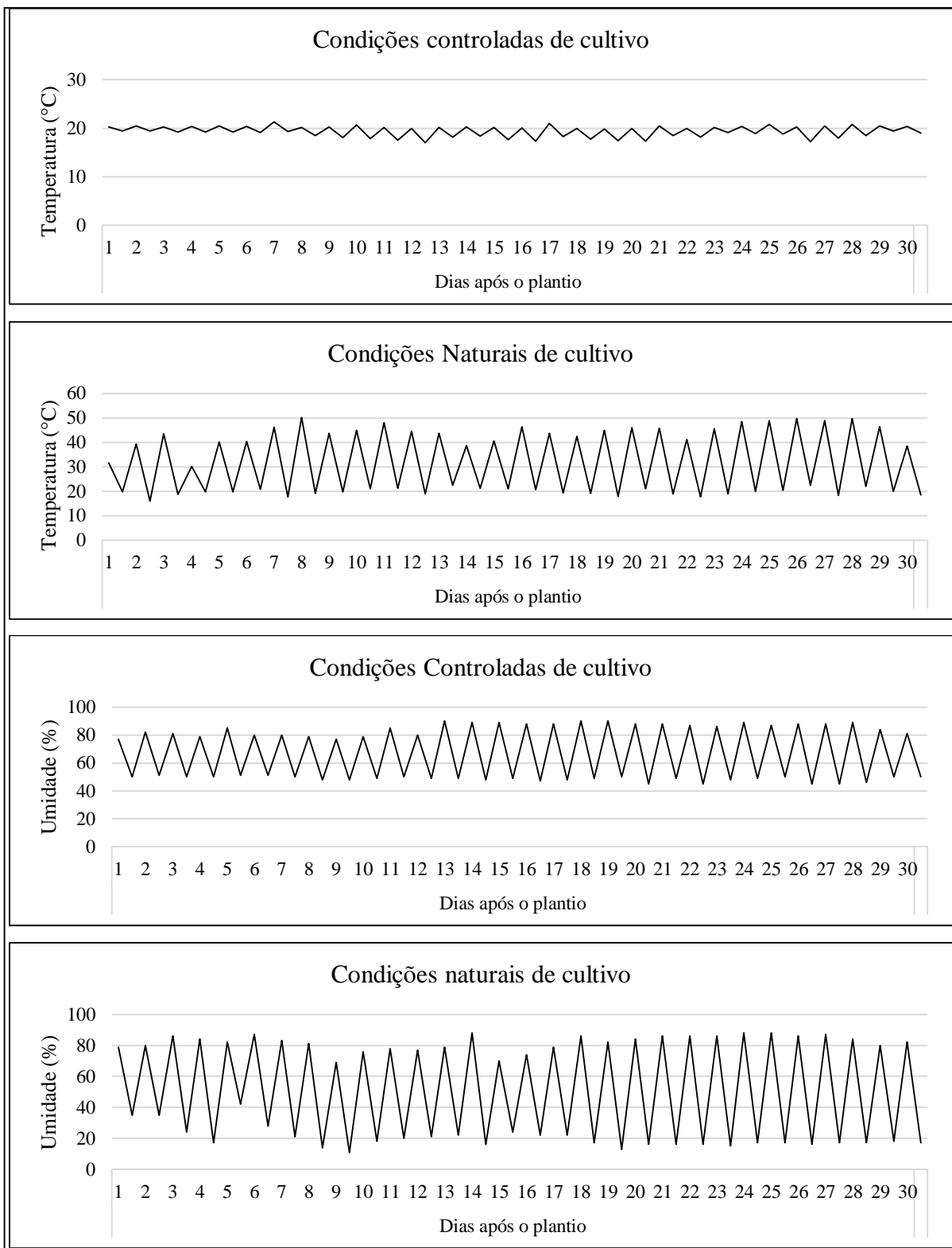


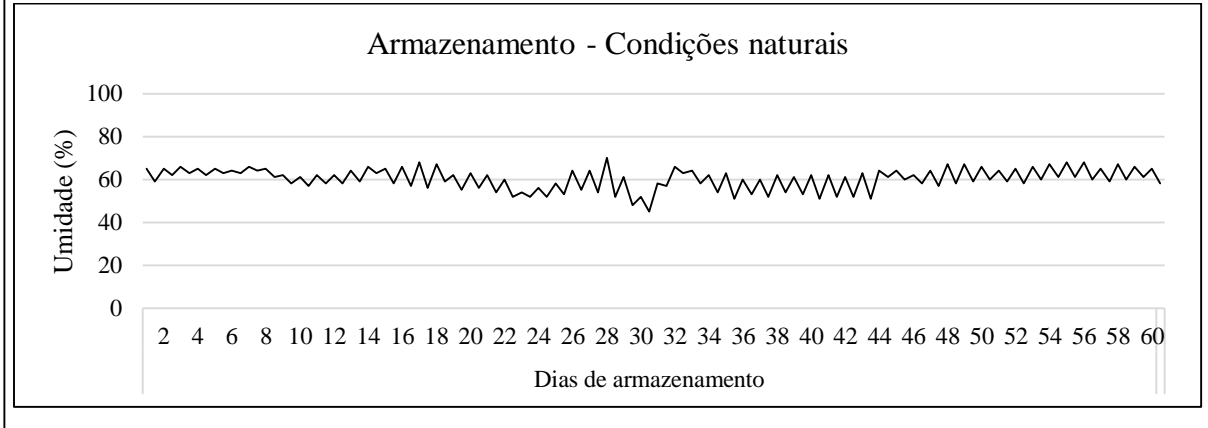
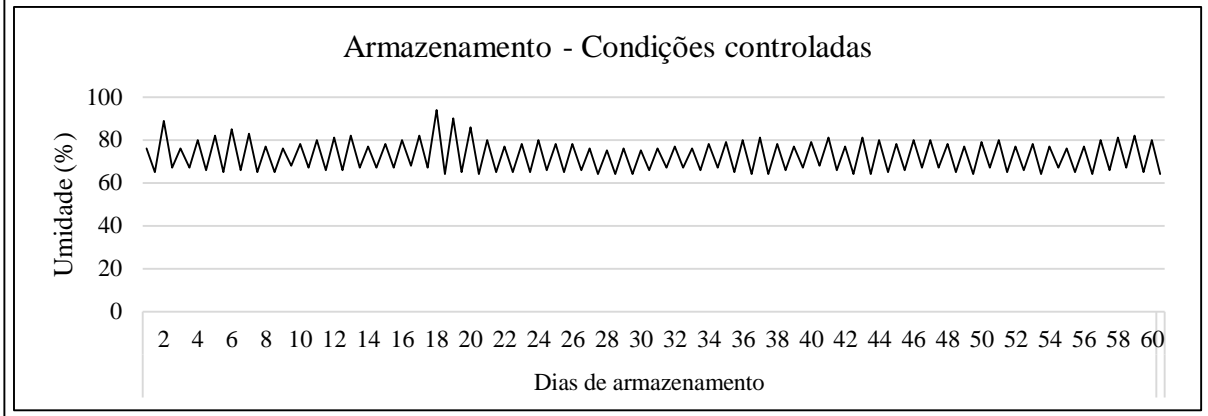
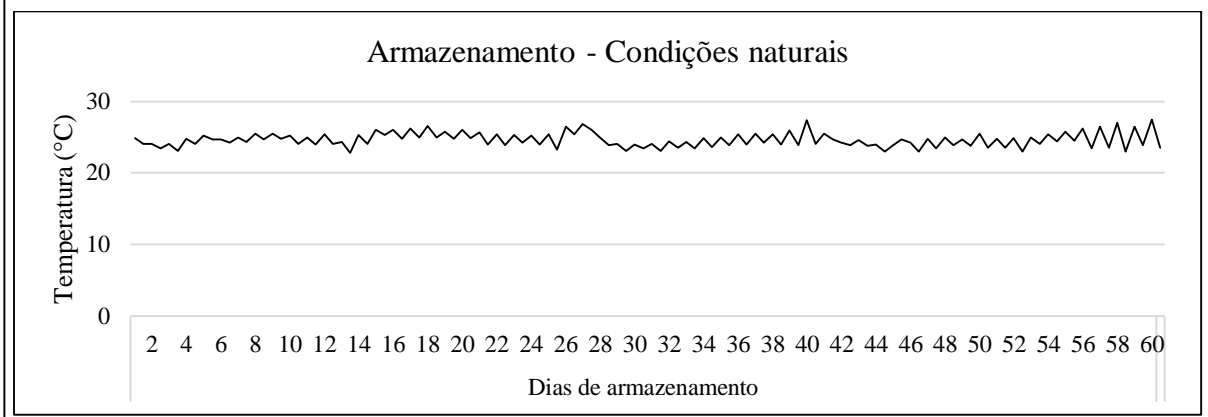
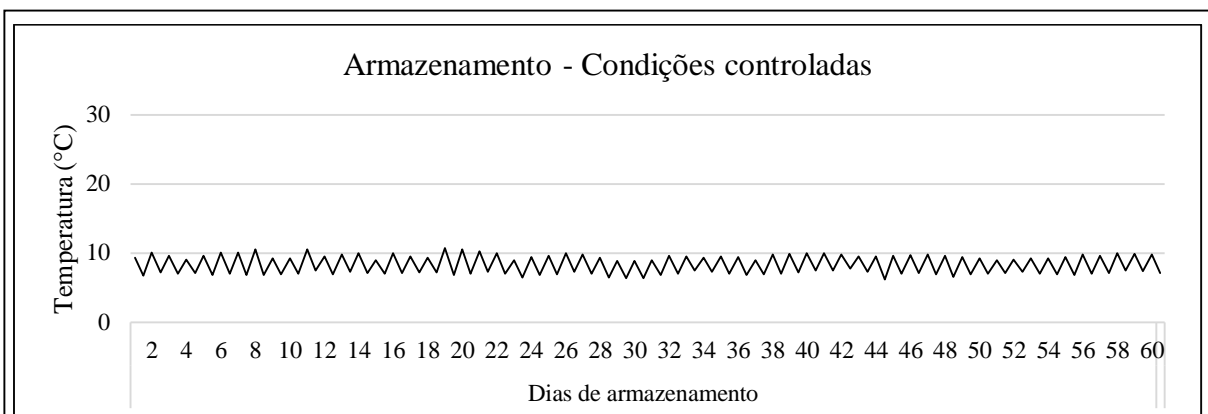
Figura 4 - Percentual da taxa de transmissão de *Aspergillus flavus* pelas sementes verificada na inserção cotiledonar (A), na primeira inserção foliar (B) e segunda inserção foliar (C) em função de diferentes níveis de potencial de inóculo do patógeno, sob condições ambientais natural (CN) e controlada (CC).



APÊNDICE A - Registros de temperatura e umidade atmosférica nos locais de cultivo de amendoim



APÊNDICE B - Registros de temperatura e umidade atmosférica nos locais de armazenamento do amendoim



Referências

ARAÚJO, D. V., POZZA, E. A., MACHADO, J. C., ZAMBENEDETTI, E. B., CELANO, F. A. O., CARVALHO, E. M., CAMARGOS, V. N. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**. 31(1). jan-fev, 2006.

BARROCAS, E. N. **Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas.** Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. 110p. 2008.

BELLETTINI, N. M. T.; ENDO, R. M.; MIGLIORANZA, É.; SANTIAGO, CRISTINA, D. Pathogenicity of seed-borne and seedling fungi of groundnut cv. Tatu. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n.2, p. 167-172, abr/jun 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 1 ed., 200p. 2009.

BORÉM, F.M., RESENDE, O., MACHADO, J. C., FONTENELLE, I. M.R., SOUZA, F. F. Controle de fungos presentes no ar e em sementes de feijão durante armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 10, 651-659. 2006.

BOTELHO, L. S. **Detecção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja.** Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. 156p. 2011.

CARVALHO, N.M., NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. 5th Edition, FUNEP, Jaboticabal, 590 p. 2012.

CONAB – Companhia nacional de Abastecimento, 2018. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Décimo segundo levantamento, safra 2017/2018.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de Segurança e qualidade para a cultura do amendoim**. Série Qualidade e segurança dos alimentos. Brasília-DF, 2004.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p. 1039-1042. 2011.

GONÇALEZ, E.; NOGUEIRA, J.H.C.; FONSECA H.; FELICIO, J.D.; PINO, F.A.; CORRÊA, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanut kernels from sowing to harvest. **International Journal of Food Microbiology**, v.123, p.184-190, 2008.

GUERRA, Y. L. **Prospecção de óleos essenciais para o controle da murcha de esclerócio em amendoim**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife-PE, 2013.

HUSSAIN, A.; AFZAL, A.; IRFAN, M.; MALIK, K. A. Molecular detection of aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* from peanut (*Arachis hypogaea*). **Turkish Journal of Agriculture – Food Science and Technology**, 3(5): 335-341, 2015.

LINS, J. L. F., SILVA, J. M., SILVA, L. P., SANTOS, T. M. C., SANTOS, E. L. Ocorrência de fungos de campo e armazenamento em ingredientes e rações para suínos. **Rev Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v.9, n.2, p. 14-20, abr-jun, 2014.

LUO, J.; TANIWAKI, M.H.; IAMANAKA, B.T.; VOGEL, R.F.; NIESSEN, L. Application of loop-mediated isothermal amplification assays for direct identification of pure cultures of *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, and *A. caelatus* and for their rapid detection in shelled Brazil nuts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 172, p.5–12, 2014.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**, Brasília: MEC/ESAL/FAEPE. 106p. 1988.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 95-101, 2001.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science** 2:176-177. 1962.

MARCHI, J.L. de; CICERO, S.M.; GOMES JUNIOR, F.G. Utilização da análise computadorizada de plântulas na avaliação do potencial fisiológico de sementes de amendoim tratadas com fungicida e inseticida. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, p.652-662, 2011.

MARCOS FILHO, J. 1999. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES,. cap.3, p.1-24.

MICHEL, B.E., RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, 87, 131-136, 1995.

MITCHELL, N.J.; BOWERS, E.; HURBURGH, C.; WU, F. Potential economic losses to the USA corn industry from aflatoxin contamination. **Food Addit Contam Part A hem Anal Control Expo Risk Assess**. March; 33(3): 540–550. 2016.

MORAES, S. A., GODOY, I. J., PEZZOPANE, J. R. M., PEREIRA, J. C.V. N. A., SILVEIRA, L. C.P. Eficiência de fungicidas no controle da mancha preta e verrugose do amendoim por método de monitoramento. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.2, p.134-140. 2001.

OLIVEIRA, A. V., DEL PRADO, C. C. N., MODESTO, N. G., LUCENA, G. Detecção molecular de fungos com potencial toxigênico em amostras de amendoim vendidas no comércio varejista de Maringá/PR, Brasil. **Biotemas**, 28 (1): 13-19, março de 2015.

PEREIRA, E. L. **Produção e qualidade de sementes de cultivares de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) influenciadas pela calagem e pela época de colheita**. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 146f. 2006.

SANTOS, F.; MEDINA, P.F.; LOURENÇÃO, A.L.; PARISI, J.J.D.; GODOY, I.J. Quality assessment of commercial peanut seeds in the state of São Paulo, Brazil. **Bragantia**, Campinas, v.72, n.3, p.310-317, 2013.

SANTOS-CISCON, B. A. **Molecular identification, toxigenic potential and effects of *Aspergillus* associated to bean seeds**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 80p. 2018.

SIQUEIRA, C. S., BARROCAS, E. N., MACHADO, J. C., CÔRREA, C. L. Transmission of *Stenocarpella maydis* by maize seeds. **Rev. Ciência Agronômica**. v.47, n.2, p.393-400, abr-jun, 2016.

SOUSA, M. V., MACHADO, J. C., SIMMONS, H. E., MUNKVOLD, G. P. Real-time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseolus* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) seeds. **Plant Pathology**, v. 64, 2014.

TANAKA, M. A. S., MAEDA, J. A., PLAZAS, I. H. A. Z. Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. **Scientia Agricola**, v.58, n.3, p.501-508, jul-set.2001.

TEIXEIRA, H., MACHADO, J.C. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. V.27, n.5, p.1045-1052, 2003.

ZANCAN, W. L. A. **Mofa-branco em algodão, girassol e feijão: potencial de transmissão e efeitos na qualidade de sementes e variabilidade do patógeno.** Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. 125p. 2013.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A preocupação pela qualidade de sementes, grãos e subprodutos têm se tornado de modo geral prioridade para os produtores, distribuidores e consumidores destes produtos em todo mundo. A proteção e sustentabilidade dos sistemas produtivos, com o intuito de garantir à população a disponibilidade de alimentos saudáveis em quantidades suficientes são prioridades em todos os segmentos que compõem a cadeia de produção até a fase final de consumo. A contaminação de grãos e sementes por fungos do gênero *Aspergillus* e outros com comportamento semelhante tem sido um primeiro passo para produção de micotoxinas, que podem ocasionar danos à saúde humana e animal e prejuízos à economia com reflexos ao mercado internacional.

Com objetivo de minimizar estes danos, encontra-se em vigência no Brasil a resolução RDC nº07 de 2011, publicada pela ANVISA, que estabelece o limite máximo tolerado de micotoxinas em vários produtos. No entanto, para reduzir ou prevenir a produção da maioria das micotoxinas, é fundamental o monitoramento da ocorrência dos fungos toxigênicos e dos fatores que predisõem este tipo de contaminação.

A possibilidade de diferentes espécies de fungos associarem-se à cultura do amendoim, conforme demonstrado neste estudo, deixa claro a necessidade de se conhecer com precisão a diversidade destes agentes bem como a capacidade dos mesmos em produzir(em) aflatoxinas. De posse destes conhecimentos é que se estabelece estratégias adequadas para prevenção de riscos que decorrem destas interações. A associação de espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* com sementes de amendoim verificada neste trabalho reforça portanto a preocupação de se estabelecer esquemas para o seu combate na prática. Embora a amostragem das sementes e grãos não tenha abrangido todas as regiões produtoras de amendoim no país, foi possível demonstrar neste trabalho a grande diversidade das espécies de *Aspergillus* seção *Flavi*, e a sua capacidade toxigênica em função das regiões consideradas para a coleta das amostras.

Por relatos de literatura, poucas informações são encontradas tratando da interação de *Aspergillus flavus* com sementes de amendoim. Nestas publicações não há registros sobre efeitos destes fungos referenciados a fatores como níveis de potencial de inóculo e outros que predominam em ambientes de cultivo desta oleaginosa. Dessa forma, por meio deste estudo foi possível quantificar os efeitos da presença de *Aspergillus flavus* em sementes com diferentes potenciais de inóculo. Variáveis como germinação, vigor e desempenho pós plantio podem ser afetados de maneira proporcional aos níveis de inóculo inicial nas sementes utilizadas em

plantios. É importante ressaltar, que estes fungos podem se estabelecer no solo, o que juntamente com outros fatores pode assegurar a sobrevivência destes fungos por longos períodos nas regiões atingidas.

Em relação ao manejo deste patossistema, e com base nos resultados destes estudos, julga-se fundamental: avaliar a ocorrência deste grupo de patógenos em lotes de sementes na fase de pré-plantio e no início do período de armazenamento. Dependendo dos resultados dessas análises outras medidas podem ser aplicadas como é o caso do tratamento sanitário das sementes. Neste caso, é necessário que a pesquisa ofereça subsídios pontuais para cada caso.

Finalmente é importante salientar que diante da complexidade que envolve as relações das espécies do gênero *Aspergillus* e outros fungos considerados de armazenamento com sementes e grãos de amendoim, é recomendável que estudos adicionais e mais aprofundados sobre alguns aspectos ainda não devidamente esclarecidos sejam alvos prioritários em programas de pesquisa no país. A implantação de testes de sanidade para sementes e grãos de amendoim em esquema de rotina, com distinção segura de espécies toxigênicas e não toxigênicas, é uma maneira de contribuir efetivamente para aumento e melhoria da produção do amendoim nas condições brasileiras.