



## IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMO GENÉTICO EM FUNGOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS*, ATRAVÉS DE SEQUENCIAMENTO DE DNA

*Jéssica Hellen da Silva*<sup>1</sup>, *Valber D'Angelo Favaro*<sup>2</sup>, *Cintia Corteccione Nunez Del Prado*<sup>2</sup>, *Alessandra Valéria de Oliveira*<sup>3</sup>

**RESUMO:** O amendoim é uma cultura bastante produzida no Brasil, e devido ao clima quente e as condições inadequadas de tratamento e armazenamento, os produtores vem apresentando problemas com fungos do gênero *Aspergillus*. Tendo em vista que o amendoim vem sendo cada vez mais adotado na alimentação brasileira por seu importante valor nutricional e que esses fungos podem produzir toxinas, o presente projeto tem por objetivo detectar a presença de *Aspergillus* aflatoxigênicos e não aflatoxigênicos em amendoim, através da amplificação e sequenciamento de regiões de genes relacionada à biossíntese de aflatoxinas. A metodologia se passa em 3 passos: a identificação morfológica dos isolados de *Aspergillus*, a extração e amplificação do DNA genômico através dos micélios de cada isolado e a análise genética por sequenciamento de DNA.

**PALAVRAS-CHAVE:** grãos, micotoxinas, variabilidade genética.

### 1. INTRODUÇÃO

O clima tropical do Brasil propicia condições favoráveis para a proliferação dos fungos responsáveis pela produção das aflatoxinas. (NEVES, et.al., 2009). E nos países tropicais, as perdas causadas por fungos são em torno de 4%, podendo chegar até 30% em alguns países, principalmente devido às temperaturas e umidades relativas altas (LOPES et. al., 2005).

Linhagens de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* produzem como metabólicos tóxicos as aflatoxinas e estas causam problemas à saúde dos animais, as chamadas micotoxinas (alterações patológicas ou funcionais). As aflatoxinas são metabólicos fúngicos secundários produzidos por algumas linhagens das espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e, mais raramente, *Aspergillus nomius* (SANTUARIO; FERNANDO; ROSA, 2006).

Há mais de 100 fungos que são considerados toxigênicos e aproximadamente 300 substâncias já foram identificadas como micotoxinas, porém o número de pessoas afetadas por micotoxinas ainda é desconhecida (MURAY et al., 2006). Entre os gêneros fúngicos envolvidos na produção de micotoxinas destaca-se *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.* As espécies de *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* costumam contaminar alimentos durante a secagem e armazenamento (HERMANS et.al., 2006).

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica (PROBIC).jessicahellen\_16@hotmail.com.br

<sup>2</sup> Acadêmicos do Curso Biomedicina do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná.

<sup>3</sup> Orientadora, Professora Doutora do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Cesumar – UNICESUMAR. alessandra.oliveira@unicesumar.edu.br

Segundo o Centro Nacional de Pesquisa Agroindustrial Tropical (CNPAT), nos últimos anos foi confirmada a presença de diversos fungos, incluindo *Aspergillus flavus*, associado à deterioração de grãos. E no Brasil ainda vivemos com condições inadequadas de plantio, colheita, secagem, transporte e armazenamento de produtos agrícolas favorecendo assim a contaminação por fungos toxigênicos (LOPES et al., 2005).

Diversos pesquisadores tem descrito a utilização de técnicas fundamentadas em PCR e sequenciamento de DNA na detecção direta de microrganismos em alimentos (GANDRA, 2008; ROSSEN et al., 1991; JESEN, et.al., 1994; DESTRO, 1995; GANDRA, 2006). Diversas variações têm sido desenvolvidas, para tornar a PCR um sistema de triagem epidemiológica.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo identificar polimorfismo genético em *Aspergillus* produtores de aflatoxinas, diferenciando geneticamente as linhagens contaminantes de amendoim e relacionar o polimorfismo encontrado com diferentes espécies de fungos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Serão analisadas 50 amostras de amendoim (*Arachis hypogaea L.*) *in natura* destinadas a consumo humano, coletadas de forma aleatória em diversos pontos de venda do comércio de Maringá, Paraná no período de abril de 2013 a junho de 2013. Será coletado 500 g de cada amostra, na qual até a análise serão mantidas sob refrigeração a -20°C.

Para o isolamento de colônias do *Aspergillus* fragmentos da amostra serão colocados em placas de petri com meio sabouraud, após o surgimento das colônias, os isolados serão transferidos para uma cultura pura em placas petri com o mesmo meio. Em seguida uma parcela é transferida para um ependorff contendo meio batata líquido, assim ocorre o desenvolvimento do micélio por uma semana.

A extração de DNA seguirá o protocolo de Cenis (1992) com adaptações. As amostras são centrifugadas para obtenção do pellet, é adicionado tampão TE e uma nova centrifugação é feita. A cada 10mg do micélio serão utilizados 0,2mL do tampão de extração (3% SDS; 0.5mM EDTA; 1.0M NaCl; 0.1mM Tris-HCl pH 8.0), o micélio é “esmagado” para lisar as células e liberar o DNA no meio, em seguida adiciona-se acetato de sódio pH 5,2 e a amostra descansa por 10 minutos a -20°C. Uma nova centrifugação é feita o sobrenadante é armazenado em outro ependorff e o mesma proporção de isopropanol é adicionada, aos tubos são adicionadas álcool 70%, depois da evaporação do álcool, 50 uL de tampão TE é adicionado e o pellet é ressuspendido. As amostras são congeladas.

Para o diagnóstico molecular de *Aspergillus* sp será usada a técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) que irá amplificar segmentos de DNA usando primers específicos do gene da aflatoxina B1 que são: IGSR e IGSF, e além disso o primer do gene da B-tubulina será usado como controle positivo. O resultado da PCR será observado por eletroforese em gel de agarose 1,4%, onde os produtos da PCR serão separados por tamanho, a visualização dos fragmentos de DNA será feita sob luz ultravioleta. Em seguida os fragmentos de DNA serão sequenciados para verificação do polimorfismo genético.

### 3. RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se com esse trabalho identificar polimorfismo genético entre diferentes linhagens de *Aspergillus* sp contaminantes de amostras de amendoim vendidas em Maringá-PR.

### 4. REFERÊNCIAS

- DESTRO, M.T. **Listeriamonocytogenes em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)–Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
- GANDRA, E.A. **Multiplex PCR para detecção de *S. aureus*, *S.intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)–Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.
- GANDRA, E.A. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Sci. Technol.** Maringá, v.30, n.1, p.109-118. 2008.
- HERMANNNS, G. et.al. Fungos e fumonisininas no período pré-colheita do milho. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.26,n.1, jan/mar.2006.
- JENSEN, M.A. et al. The application of a PCR-based assay for the detection of Salmonella. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. Las Vegas. Abstracts. Las Vegas: **ASM**, p. 369, 1994.
- LOPES, P.R.S. et.al. Crescimento e alteração no fígado e na carcaça de alevinos de Jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.40, n.10, out.2005.
- MOLLER, E.M. et.al. Species-specific PCR assays for the fungal pathogens *Fusariummoniliforme* and *Fusariumsubglutinans* and their application to diagnose maize ear rot disease. **Journal of Phytopathology**. v.147, p. 497-508. 1999.
- MURRAY, et.al. **Microbiologia Médica**. 5 ed. Rio de Janeiro: editora Elsevier, 2006.
- NEVES, J.A. et.al. Determinação de presença de aflatoxinas em castanhas de caju. **UEPG Ci. Exatas Terra**. Ponta Grossa, v.15, n.1, p. 39-44, abr. 2009.
- SANTURIO, Janio M.; FERNANDES, Adriano; ROSA, Alexandre Pires. **Desempenho de pintos de corte oriundos de matrizes de corte alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de aflatoxina**. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA: Chapecó, 2006.
- YODER, W.T.; CRISTIANSO, L.M. Species-specific primers resolve members of *Fusarium* section *fusarium*. Taxonomic status of the edible “Quom” fungus reevaluated. **Fungal Genetics and Biology**, v.23, n.1, p. 68-80. 1998.

