



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

SÉRGIO MURILO SOUSA RAMOS

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Penicillium* e *Talaromyces* EM SOLOS
USADOS PARA O CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum
officinarum* L.) E DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS**

Recife

2018

SÉRGIO MURILO SOUSA RAMOS

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Penicillium* e *Talaromyces* EM SOLOS
USADOS PARA O CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum
officinarum* L.) E DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do
Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para a
obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Aplicada

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Neiva Tinti de Oliveira

Coorientadores: Dr. Antônio Félix Costa

Prof^º Dr^º Cledir Santos

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Ramos, Sérgio Murilo Sousa

Diversidade de espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* em solos usados para o cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e detecção da produção de micotoxinas / Sérgio Murilo Sousa Ramos - 2018.

119 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Neiva Tinti de Oliveira

Coorientadores: Antônio Félix Costa

Cledir Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Recife, 2018.

Inclui referências e anexo.

1. Fungos filamentosos 2. Taxonomia 3. Biodiversidade

I. Oliveira, Neiva Tinti de (orient.) II. Costa, Antônio Félix (coorient.) III. Santos, Cledir (coorient.) IV. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-204

SÉRGIO MURILO SOUSA RAMOS

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Penicillium* e *Talaromyces* EM SOLOS
USADOS PARA O CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum
officinarum* L.) E DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do
Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para a
obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 14 /03/2018.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Alexandre Reis Machado (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra/UFPE (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Idjane Santana de Oliveira (Examinadora Externa)
Centro Acadêmico de Vitória-Universidade Federal de Pernambuco

Keila Aparecida Moreira (Examinadora Externa)
Unidade Acadêmica de Garanhuns – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico esse trabalho às duas mulheres mais importantes da minha vida: as minhas queridas e amadas mãe e esposa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela minha vida repleta de desafios, alegrias e muita proteção do alto.

Aos meus pais José Domingos Ramos e Maria do Carmo Souza Ramos pela educação que me proporcionaram, carinho e amor incondicionais ao longo da minha vida. Para mim são os melhores pais do mundo, um presente do Pai celestial.

A minha esposa Lidiane Roberta Cruz da Silva Ramos pelo apoio incansável na construção desse trabalho e por ser meu refúgio e meu porto seguro nos momentos bons e ruins da minha vida. Para mim é a melhor esposa que Deus poderia ter me oportunizado para a construção de uma nova família, uma verdadeira benção e presente de Deus.

À Brennda e à Sophya Roberta por me auxiliarem no papel de pai e me ajudarem a construir uma família com harmonia, animando-me diante de desafios como este e me proporcionando a alegria de viver.

As minhas guias espirituais pela paciência, proteção, instrução e acompanhamento incansáveis em prol da minha evolução moral e apoio no projeto de construção familiar. Elas são outro presente de Deus na minha existência.

Aos os meus colaboradores e amigos Henrique Bispo e Alba pela dedicação e apoio permanente na parte prática dessa tese. Sem dúvida, uma ajuda mais que oportuna. Uma demonstração do apoio e da presença de Deus na minha vida.

Agradeço imensamente a minha adorável orientadora, professora Dra. Neiva Tinti de Oliveira, pelo seu apoio, paciência e dedicação para que esse trabalho pudesse ser consumado. Seu exemplo de pesquisadora, encheu-me de ânimo para seguir até o fim deste projeto acadêmico.

Ao meu coorientador Dr. Antônio Félix pela paciência, ajuda incondicional e empenho permanente na execução deste projeto de doutorado. Agradeço ao IPA (Instituto de Pesquisa Agronômica de Pernambuco) por todas as análises de solo realizadas através de seus profissionais. Realmente, foi um apoio de grande valia para a execução desse projeto de doutorado.

Ao meu coorientador Dr. Cledir Santos, que apesar da distância, interessou-se pela proposta e deu suas contribuições sempre que solicitado.

À professora Dra. Cristina Maria de Souza-Mota, que me acompanha desde à especialização na Micologia, pelo apoio, carisma e ajuda em todos os momentos que precisei.

À professora Dra. Keila pelo apoio ao longo da pesquisa e por ter sido sempre solícita em todos os momentos que precisei de sua ajuda.

Ao professor Dr. Alexandre o qual, ao integrar o quadro de professores da Micologia, proporcionou-me um auxílio extraordinário nas análises moleculares deste projeto acadêmico.

Ao agricultor Marconi pelo empenho e ajuda na coleta de solo na Usina Trapiche;

Sou grato à administração da Usina Trapiche por terem me oportunizado realizar a pesquisa e por todo apoio dispensado ao longo dessa empreitada.

Aos demais professores e professoras que me apoiaram direta ou indiretamente ao longo da execução desse trabalho.

Aos amigos e amigas do laboratório de Fungos Fitopatogênicos pelo apoio nessa caminhada acadêmica.

Ao meu amigo Renan Barbosa do Nascimento, que mesmo estando na Holanda e preocupado com a execução de seu Doutorado, arrumou tempo para mais uma vez colaborar com mais uma etapa acadêmica da minha vida.

A todos os meus amigos e amigas de turma, muitos estão comigo desde a especialização, pelo carinho, amizade e apoio dispensados ao longo deste trabalho.

A todos os técnicos e técnicas do Departamento por terem sempre sido solícitos comigo ao longo dessa jornada universitária.

Enfim, obrigado a todos que formam o Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e à UFPE, enquanto Instituição de educação, por toda a minha formação acadêmica.

RESUMO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo Pernambuco o sétimo produtor nacional e o segundo da região Nordeste. Dentre os resíduos gerados pela indústria sucroalcooleira, a vinhaça é o mais importante e é considerado um poluidor. Por outro lado, as usinas utilizam a vinhaça como adubo para o solo em pousio (sem cana). Porém, toda alteração mecânica e/ou físico-química no ecossistema edáfico impacta diretamente as comunidades microbianas do solo, dentre estas as dos fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces*. A discriminação das espécies destes gêneros não é tarefa fácil, fazendo-se necessária uma abordagem polifásica (taxonomia clássica, análises de biologia molecular, além de padrão de extrólitos, como as micotoxinas), para maior robustez na identificação. Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a diversidade e a produção de micotoxinas por espécies de *Penicillium* e de *Talaromyces* em solos usados para o cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinalis* L.) em uma usina de Pernambuco, Brasil. Os isolados foram obtidos através de diluições seriadas dos solos e plaqueamento em meio Ágar Sabouraud adicionado de Cloranfenicol. As análises ecológicas foram realizadas através de índices e com o auxílio do programa estatístico NTSYS. A detecção das micotoxinas: citrinina (CIT), ocratoxina A (OTA), patulina (PAT), ácido ciclopiazônico (α -CPA) e ácido penicílico (ACP) foi realizada através de Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS). No total foram obtidas 1.344 UFC's, das quais 674 foram provenientes da área cultivada e 670 da área em pousio. Dezesesseis espécies foram prospectadas, destas, sete novas, sendo uma para *Talaromyces* e seis para *Penicillium*. Os índices de diversidade de espécies e equitabilidade foram similares e elevados para as duas áreas analisadas (cultivada e em pousio), com um discreto aumento para a área cultivada. A Análise de Componentes Principais revelou duas distintas comunidades (área cultivada e em pousio). Dentre as cinco micotoxinas avaliadas, apenas a CIT e a PAT foram detectadas por quatro isolados. Desta forma, pode-se concluir que solos de cultivo de cana-de-açúcar representam excelentes fontes de *Penicillium* e *Talaromyces* e abrigam espécies raras e/ou ainda não descritas pela ciência. Solos cultivados com cana-de-açúcar e solos em pousio apresentam comunidades *Penicillium* e *Talaromyces* distintas, com algumas poucas espécies produtoras de citrinina e patulina.

Palavras-chave: Biodiversidade. Taxonomia. Fungos Filamentosos. Vinhaça.

ABSTRACT

Brazil is the largest producer of sugarcane in the world, with Pernambuco being the seventh national producer and the second in the Northeast region. Among the waste generated by the sugar and alcohol industry, vinasse is the most important and is considered a polluter. On the other hand, the sugar cane industry use vinasse as fertilizer for fallow soil (without cane). However, any mechanical and / or physicochemical alteration in the soil ecosystem directly affects the microbial communities of the soil, among them the filamentous fungi belonging to the genus *Penicillium* and *Talaromyces*. Discrimination of the species of these genera is not an easy task, requiring a polyphasic approach (classical taxonomy, molecular biology, as well as an extrolite pattern, such as mycotoxins), for greater robustness in identification. In view of the above, the objectives of the present work were to evaluate the diversity and production of mycotoxins by *Penicillium* and *Talaromyces* species in soils used for the cultivation of sugarcane (*Saccharum officinalis* L.) at a sugar cane industry in Pernambuco, Brazil. The isolates were obtained by serial dilutions of the soils and plating in Sabouraud agar added with Chloramphenicol. The ecological analyzes were performed through indexes and with the aid of the NTSYS statistical program. The detection of mycotoxins: citrinin (CIT), ochratoxin A (OTA), patulin (PAT), cyclopiazonic acid (α -CPA) and penicillic acid (ACP) was carried out by Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (LC- MS). In total, 1,344 CFU's were obtained, of which 674 were from the cultivated area and 670 from the fallow area. Sixteen species were prospected, of these, seven new, one for *Talaromyces* and six for *Penicillium*. The species diversity and equitability indexes were similar and high for the two analyzed areas (cultivated and fallow), with a slight increase for the cultivated area. Principal Component Analysis revealed two distinct communities (fallow and cultivated area). Among the five mycotoxins evaluated, only CIT and PAT were detected by four isolates. Thus, it can be concluded that soils of sugarcane cultivation represent excellent sources of *Penicillium* and *Talaromyces* and harbor rare species and / or not yet described by science. Soils cultivated with sugarcane and fallow soils show distinct *Penicillium* and *Talaromyces* communities, with a few species producing citrinin and patulin.

Keywords: Biodiversity. Taxonomy. Filamentous Fungi. Vinasse.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1- Percentual de área total de cana-de-açúcar por Unidade da Federação. Fonte: Conab, 2015.....	18
Figura 2 - Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.). Fonte: www.comprerural.com.....	19
Figura 3 - (A) - Área de cultivo de cana-de-açúcar da usina Trapiche; (B) - Área em pousio da usina Trapiche, ambas as áreas localizadas no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil. Fonte: o autor.....	23
Figura 4: Tipos de conidióforos em <i>Penicillium</i> e <i>Talaromyces</i> . Fonte: Samson <i>et al.</i> , (1984).....	31
Figura 5 - <i>Talaromyces vermiculatus</i> (= <i>T. flavus</i> (Klöcker) Stolk & Samson, comb. nov.). <i>Talaromyces flavus</i> var. <i>flavus</i> , CBS 310.38. a. diferentes tipos de estruturas conidiogênicas; b. conídio; c-d. desenvolvimento do ascogônio e do anterídio; e. fusão entre os dois gametângios e subsequente septação do ascogônio; f. desenvolvimento dos septos horizontal, transverso e oblíquo; g-h. production de ramos das células ascógenas, que se desenvolverão nas hifas ascógenas: i. cadeia de ascos; j-1. ascosporos, j. CBS 352.72; k. CBS 387.48; l. CBS 310.38. <i>Talaromyces flavus</i> var. <i>macrosporus</i> , CBS 317.63 m. cadeia de ascos; n. ascosporos. Fonte: Stolk e Samson, (1972).....	36
Figura 6- Estrutura química da citrinina (CIT).....	43
Figura 7- Estrutura química da ocratoxina A (OTA).....	45
Figura 8- Estrutura química da patulina (PAT).....	47
Figura 9- Ácido Ciclopiazônico (α -CPA).....	49
Figura 10- Ácido Penicílico (CPA).....	49
Figura 11- Culturas de um representante de cada espécie, incubadas durante 7 dias a 25 °C, A. Verso e reverso sobre MEA.....	60
Figura 12- Árvore filogenética das espécies de <i>Penicillium</i> deduzidas da análise bayesiana com base nas sequências de β -tubulina. As probabilidades posteriores de Bayesian são indicadas acima dos nós. A árvore foi enraizada em <i>Talaromyces flavus</i> NRRL2098 e <i>Talaromyces loliensis</i> CBS643.80. As espécies obtidas neste estudo são destacadas negrito.....	62

Figura 13- Árvore filogenética das espécies de <i>Penicillium</i> deduzidas da análise bayesiana com base nas sequências de β -tubulina. As probabilidades posteriores de Bayesian são indicadas acima dos nós. A árvore foi enraizada em <i>Talaromyces flavus</i> NRRL2098 e <i>Talaromyces loliensis</i> CBS643.80. As espécies obtidas neste estudo são destacadas em negrito.....	63
Figura 14- <i>Talaromyces trapichae</i> , culturas incubadas durante 7 dias a 25 °C, A. Verso sobre MEA, B. Reverso sobre MEA, C. Verso sobre CYA, D. Reverso sobre CYA, E. Verso sobre G25N, F. Reverso sobre G25N, G, H e I. Conidióforo biverticilado, J. Micélio sinematoso, K. Conídios.....	65
Figura 15- <i>Penicillium mimosum</i> , culturas incubadas durante 7 dias a 25 °C, A. Verso sobre MEA, B. Reverso sobre MEA, C. Verso sobre CYA, D. Reverso sobre CYA, E. Verso sobre G25N, F. Reverso sobre G25N, G e H. Conidióforo biverticilado, I. Conídios.....	67
Figura 16- <i>Penicillium barbosae</i> , culturas incubadas durante 7 dias a 25 °C, A. Verso sobre MEA, B. Reverso sobre MEA, C. Verso sobre CYA, D. Reverso sobre CYA, E. Verso sobre G25N, F. Reverso sobre G25N, G. Conidióforo monoverticilado, H. conidióforo biverticilado, I. conidióforos monoverticilado e biverticilado, J. Conídios.....	69
Figura 17- <i>Penicillium tintae</i> , culturas incubadas durante 7 dias a 25 °C, A. Verso sobre MEA, B. Reverso sobre MEA, C. Verso sobre CYA, D. Reverso sobre CYA, E. Verso sobre G25N, F. Reverso sobre G25N, G e H. Conidióforo monoverticilado, I. conidióforo biverticilado, J. Conídios.....	71
Figura 18- <i>Penicillium fernandae</i> , culturas incubadas durante 7 dias a 25 °C, A. Verso sobre MEA, B. Reverso sobre MEA, C. Verso sobre CYA, D. Reverso sobre CYA, E. Verso sobre G25N, F. Reverso sobre G25N, G e H. Conidióforo monoverticilado, I. conidióforo biverticilado, J. Conídios e conidióforo monoverticilado.....	73
Figura 19- <i>Penicillium cruzii</i> , culturas incubadas durante 7 dias a 25 °C, A. Verso sobre MEA, B. Reverso sobre MEA, C. Verso sobre CYA, D. Reverso sobre CYA, E. Verso sobre G25N, F. Reverso sobre G25N, G e H. Conidióforo monoverticilado, I. Micélio sinematoso, J. Conídios.....	75

Figura 20- <i>Penicillium mottae</i> culturas incubadas durante 7 dias a 25 °C, A. Verso sobre MEA, B. Reverso sobre MEA, C. Verso sobre CYA, D. Reverso sobre CYA, E. Verso sobre G25N, F. Reverso sobre G25N, G e H. Conidióforo monoverticilado, I. Conídios.....	77
Figura 21- Diversidade (bits.ind ⁻¹) e Equitabilidade de Pielou das espécies de <i>Penicillium</i> e de <i>Talaromyces</i> de solos cultivados com cana-de-açúcar (Culti) e em pousio (Pousio), em seis coletas (C1, C2, C3, C4, C5 e C6). Análise estatística com base nos índices de Shannon e de Pielou.....	79
Figura 22- Riqueza de espécies de <i>Penicillium</i> e de <i>Talaromyces</i> de solos cultivados com cana-de-açúcar (Culti) e em pousio (Pousio), em seis coletas (C1, C2, C3, C4, C5 e C6).....	79
Figura 23- Abundância de <i>Penicillium</i> e de <i>Talaromyces</i> de solos cultivados com cana-de-açúcar (Culti) e em pousio (Pousio), em seis coletas (C1, C2, C3, C4, C5 e C6)..	80
Figura 24- Frequência de ocorrência (9%) das espécies de <i>Penicillium</i> e de <i>Talaromyces</i> provenientes de solos cultivados com cana-de-açúcar (Culti) e em pousio (Pousio), em seis coletas (C1, C2, C3, C4, C5 e C6).....	81
Figura 25- Dendrograma de proximidade entre as amostras (seis coletas: C1, C2, C3, C4, C5 e C6) provenientes de solos de área cultivada com cana-de-açúcar e de área em pousio (sem cana) de uma usina situada no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil.....	82
Figura 26-Dendrograma de proximidade entre as espécies de <i>Penicillium</i> e de <i>Talaromyces</i> provenientes de solos de cultivo de cana-de-açúcar, de uma usina situada no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil. Análise estatística com base no índice de Bray-Curtis; método de ligação do peso proporcional (WPGM, Weighted Pair-Group Method, Arithmetic Average). Análise cofenética: $r > 0,84$	83
Figura 27-Projeção bi-dimensional dos dois primeiros fatores da Análise dos Componentes Principais de amostras de solos de área cultivada com cana-de-açúcar (Culti) e em pousio (Pousio), em seis coletas (C1, C2, C3, C4, C5 e C6), de uma usina situada no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil. Fator 1 (Dinn-1) e Fator 2 (Dinn2). Análise cofenética: $r > 0,73$	84

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Acompanhamento da produção sucroalcooleira no Estados do Norte-Nordeste (Safrá: 2017/2018 Posição em 31/12/17).....	19
Tabela 2 - Espécies de <i>Penicillium</i> relatadas como produtoras de Ocratoxina A (OTA).....	46
Tabela 3 - Análise de fatores abióticos das amostras de solo de área Cultivada com cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.) e de solo de área em pousio, de uma usina situada no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil.....	55
Tabela 4-Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC's) de espécies de <i>Penicillium</i> e <i>Talaromyces</i> por coleta, nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar e área em pousio (Mata Atlântica), de uma usina situada no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil e Dominância Relativa, de acordo com Magurran (1988).....	57
Tabela 5 - Análise dos 3 primeiros componentes principais.....	85
Tabela 6- Detecção da produção das micotoxinas Ácido Ciclopiazônico (APA), Ácido Penicílico (CPA), Citrinina (CIT), Ocratoxina A (OTA) e Patulina, através da técnica de cromatografia líquida de ultra performance ACQUITY UPLC M-Class, (Waters Corporation) por espécies de <i>Penicillium</i> e <i>Talaromyces</i> solo de área Cultivada com cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.) e de solo de área em pousio, de uma usina situada no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil.....	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.2	Objetivo Geral	17
1.1.3	Objetivos Específicos.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1	O CULTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR (<i>SACCHARUM OFFICINARUM L.</i>).....	18
2.2	A USINA TRAPICHE: PRODUÇÃO DE ÁLCOOL E AÇÚCAR NO ESTADO DE PERNAMBUCO.....	22
2.3	OS IMPACTOS DA COLHEITA DA CANA COM A QUEIMA DA PALHADA NA MICROBIOTA DO SOLO.....	24
2.4	A INTERFERÊNCIA DA APLICAÇÃO DA VINHAÇA NA MICROBIOTA EDÁFICA.....	25
2.5	FUNGOS EM SOLOS DE CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	27
2.	O GÊNERO <i>PENICILLIUM</i> : DA DESCOBERTA À TAXONOMIA CONTEMPORÂNEA.....	29
2.7	O GÊNERO <i>TALAROMYCES</i> C. R. BENJ.....	34
2.8	REORGANIZAÇÃO DA TAXONOMIA DE <i>PENICILLIUM</i> E <i>TALAROMYCES</i>	36
2.9	<i>PENICILLIUM</i> E <i>TALAROMYCES</i> PROSPECTADOS DE SOLOS DE FLORESTAS.....	38
2.10	MICOTOXINAS PRODUZIDAS POR ESPÉCIES DE <i>PENICILLIUM</i> E <i>TALAROMYCES</i>	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
3.1	ÁREA DE ESTUDO.....	50
3.2	COLETAS E ISOLAMENTO DE ESPÉCIES DE <i>PENICILLIUM</i> E DE <i>TALAROMYCES</i> PRESENTES EM SOLOS DE CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR, NO MUNICÍPIO DE SIRINHAÉM, PERNAMBUCO, BRASIL.....	50

3.3	ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DO SOLO.....	50
3.4	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS CULTURAS DE <i>PENICILLIUM</i> E DE <i>TALAROMYCES</i>	50
3.5	ANÁLISE MORFOLÓGICA	51
3.6	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES.....	51
3.7	ANÁLISES ECOLÓGICAS DA COMUNIDADE DE <i>PENICILLIUM</i> E DE <i>TALAROMYCES</i> ENCONTRADAS.....	51
3.8	DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS PELAS ESPÉCIES DE <i>PENICILLIUM</i> E DE <i>TALAROMYCES</i> ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE ACQUITY UPLC M-CLASS.....	52
4	RESULTADOS.....	55
4.1	ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DO SOLO.....	55
4.2	IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES.....	55
4.2.1	Descrição de <i>Talaromyces trapichae</i> nova espécie de <i>Talaromyces</i> para a seção <i>Trachyspermi</i>.....	64
4.2.2	Descrição de seis novas espécies de <i>Penicillium</i> provenientes de solos de cultivo de cana-de-açúcar em Pernambuco, Brasil.....	66
4.3	ANÁLISES ECOLÓGICAS.....	78
4.4	DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS.....	86
5	DISCUSSÃO.....	88
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
7	CONCLUSÕES.....	97
	REFERÊNCIAS	98
	ANEXO A- <i>Penicillium</i> and <i>Talaromyces</i> Communities of Sugarcane Soils (<i>Saccharum officinarum</i> L.): Ecological and Phylogenetic Aspects, a ser publicado online no dia 15 de março de 2018 pelo periódico Journal of Agricultural Science....	119

1 INTRODUÇÃO

A expansão da demanda mundial por etanol, originária de fontes renováveis, associada às extensas áreas cultiváveis e às condições edafoclimáticas favoráveis ao cultivo da cana-de-açúcar, colocam o Brasil como o maior produtor mundial dessa cultura agrícola, com grande importância para o agronegócio brasileiro e o tornam o país mais promissor para a exportação dessa commodity (Conab, 2018).

De um modo geral, dentre os fungos que podem ser isolados do solo, como os de cultivos de cana-de-açúcar destacam-se as espécies de *Penicillium* e de *Talaromyces*. A maioria destas espécies é sapróbia e não são muito exigentes do ponto de vista nutricional. Estas características conferem às espécies desses gêneros a capacidade de crescerem em qualquer ambiente onde existam quantidades mínimas de sais minerais, ou por outro lado, as mais diversas e complexas fontes de carbono orgânico. O gênero *Penicillium* é de extrema relevância na natureza, pois as suas espécies atuam ativamente na degradação da matéria orgânica (Pitt, 1991; Klich, 2002; Houbraken *et al.*, 2011; Houbraken *et al.*, 2014). Por sua vez, o gênero *Talaromyces* também atua como exímio decompositor de compostos orgânicos. Além disso, algumas espécies desse gênero estão associadas a micoses fatais em pacientes imunocomprometidos (Guevara-Suarez *et al.*, 2017).

Devido à grande variabilidade, diversidade fenotípica e genética, há poucos estudiosos especialistas nos gêneros, principalmente no Brasil. A discriminação das espécies deste gênero não é tarefa fácil. O rigor e a estabilidade na sua taxonomia têm por isso importância prática. Trata-se de gêneros que agrupam elevado número de espécies, apresentando muitas delas grandes semelhanças entre si. Por isso, a taxonomia destes fungos tem sofrido ao longo dos anos algumas alterações e melhoramentos que estão sendo introduzidos por diversos investigadores. Aliada à taxonomia clássica, técnicas que venham compor uma abordagem polifásica vêm sendo utilizadas, tornando robusta a identificação das linhagens. Composto tal abordagem, são utilizadas também análises de biologia molecular com a amplificação parcial e posterior sequenciamento dos gens β -tubulina, calmodulina e regiões de ITS, além de padrão de extrólitos, como as micotoxinas (Houbraken *et al.*, 2011).

Micotoxinas são metabólitos secundários e algumas são potenciais agentes nefrotóxicos e carcinogênicos a humanos e outros animais (Hoeltz *et al.*, 2009). Dentre as micotoxinas produzidas por *Penicillium*, destaca-se a patulina, termo-resistente e tolerante às condições ácidas. É produzida por espécies de *Aspergillus*, *Bissochlamys* e *Penicillium*, sendo

P. expansum a espécie mais estudada quanto à produção desta micotoxina. Alguns estudos relatam ser a PAT uma micotoxina teratogênica e genotóxica (Celli *et al.*, 2009).

Outra micotoxina relevante produzida por algumas espécies de *Penicillium* é a ocratoxina A, trata-se de uma β -fenilalanina ligada a uma isocumarina. É considerada citotóxica, nefrotóxica, carcinogênica, teratogênica e imunossupressora, apresentando efeitos tóxicos como danos ao DNA, inibindo síntese protéica, induzindo a peroxidação de lipídios e causando estresse oxidativo (Abrunhosa, 2008).

A citrinina é um poliquetídio, que apresenta ação nefrotóxica. Trata-se de uma micotoxina produzida principalmente por *Penicillium citrinum*. Entretanto outras espécies de *Penicillium* e até mesmo do gênero *Aspergillus* mostraram-se capazes de produzir esta toxina (Frisvad *et al.*, 2004; 2005).

O ácido ciclopiazônico, outra micotoxina, conforme a literatura, provoca diarreia, perda de peso, desidratação, dentre outros sintomas que culminam com a morte de animais que o ingeriram. Esse metabólito secundário é produzido tanto por espécies de *Penicillium* como por espécies de *Aspergillus*. Além disso, é um contaminante natural de alimentos como queijo, milho, figo, arroz, entre outros (Maragos *et al.*, 2017).

O ácido penicílico é uma micotoxina com ação carcinogênica, citotóxica e hepatóxica. Esse composto é produzido por muitos fungos incluindo o gênero *Penicillium*. É também conhecido como ácido 3-metoxi-5-metil-4-oxi-2,5-hexadienoico e já foi encontrado em monocotiledôneas como o milho e dicotiledôneas como o feijão (Diniz, 2015).

Dentre as técnicas para determinação da produção de micotoxinas a partir de fungos, tem-se a Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS). A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma amostra estudada, que garante alta seletividade e eficiência de distinção de cada constituinte analisado (Keulemans, 1957; Cíola, 1985). O acoplamento do cromatógrafo ao espectrômetro de massas promove um aumento de seletividade, obtenção da informação estrutural das moléculas bem como de sua massa molar (Vékey, 2001).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho são isolar e identificar através de uma abordagem polifásica, linhagens de *Penicillium* e de *Talaromyces* presentes em solos usados para o cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinalis* L.) no Estado de Pernambuco Brasil, bem como avaliar aspectos ecológicos e a produção de micotoxinas pelas espécies encontradas, utilizando Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS).

1.1 OBJETIVOS

1.1.2 Objetivo Geral

Avaliar a diversidade e a produção de algumas micotoxinas de espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* em solos usados para o cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinalis* L.) em uma usina de produção de cana-de-açúcar, localizada no Estado de Pernambuco, Brasil.

1.1.3 Objetivos Específicos

Isolar espécies de *Penicillium* e de *Talaromyces* presentes em solos de cultivo de cana-de-açúcar, no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil; Identificar as linhagens isoladas através de uma abordagem polifásica (taxonomia clássica, biologia molecular e produção de metabólitos secundários); Avaliar a produção de citrinina, ocratoxina A, patulina, ácido ciclopiazônico e ácido penicílico das linhagens de *Penicillium* e *Talaromyces*, através de Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS); Realizar análises ecológicas sobre as comunidades de *Penicillium* e *Talaromyces* presentes no solo de área cultivada com cana-de-açúcar; Avaliar as diferenças existentes entre as comunidades de *Penicillium* e *Talaromyces* encontradas nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar e na área sem cana (em pousio); Incorporar um representante de cada espécie isolada ao acervo da Coleção de Culturas - Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. O CULTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

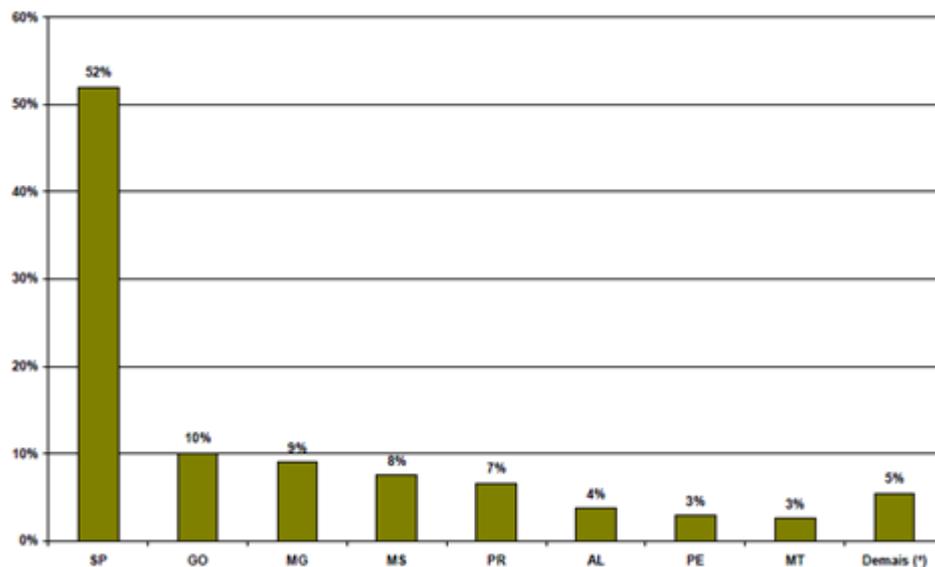
O cultivo de cana-de-açúcar no Brasil está vivenciando um novo ciclo. Atualmente, o setor agrícola brasileiro é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo (Conab, 2018).

A produção de cana-de-açúcar, estimada para a safra 2017/18, é de 646,4 milhões de toneladas. Redução de 1,7% em relação à safra anterior. A área a ser colhida está estimada em 8,77 milhões de hectares, queda de 3,1%, se comparada com a safra 2016/17. A produção de açúcar deverá atingir 39,39 milhões de toneladas, aumento de 1,8% ao produzido na safra 2016/17, continuando favorecida pela conjuntura favorável. A produção de etanol está estimada em 26,12 bilhões de litros, redução de apenas 6,1% em razão da preferência pela produção de açúcar (Conab, 2018).

Em 2015, o Brasil produziu cerca de 650 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, sendo o Estado de São Paulo considerado o maior produtor, com 51,7% (Conab, 2015).

O Estado de Pernambuco é o segundo maior produtor de cana-de-açúcar no Nordeste, perdendo apenas para Alagoas, sendo também o segundo maior produtor de etanol total, perdendo apenas para o Estado de Sergipe. Pernambuco ocupa a sétima posição nacional (Figura 1) em produção de cana-de-açúcar, com 3% (276,3 mil hectares) (Conab, 2015).

Figura 1 - Percentual de área total de cana-de-açúcar por Unidade da Federação.



Fonte: Conab, 2015.

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea (Figura 2) da família Poaceae e do gênero *Saccharum* ssp., uma planta do tipo C4 e de ciclo perene, típica de climas tropicais e subtropicais (Ferrari, 2010). Provavelmente originária das regiões da Indonésia e Nova Guiné, trata-se de uma planta de reprodução sexuada quando cultivada comercialmente, porém, é multiplicada assexuadamente, por propagação vegetativa. É caracterizada pela inflorescência do tipo panícula, flor hermafrodita, caule em crescimento cilíndrico composto de nós e entrenós, folhas alternas, opostas, presas aos nós dos colmos, com lâminas de sílica em suas bordas, e bainha aberta (Rodrigues, 1995).

Figura 2 - Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.).



Fonte: www.comprerural.com

A previsão para a safra sucroalcooleira de 2017/2018, conforme os dados do MAPA (Sapcana das Unidades Produtoras de Cana e Álcool), mantém o Estado de Pernambuco na segunda posição do Norte-Nordeste brasileiro na produção de cana-de açúcar, açúcar total, etanol hidratado e etanol total (Tabela 01).

Tabela 1 - Acompanhamento da produção sucroalcooleira nos Estados do Norte-Nordeste (Safra: 2017/2018 Posição em 31/12/17).

ESTADOS	Cana (toneladas)	Açúcar total (toneladas)	Etanol (m³) anidro	Etanol (m³) hidratado	Etanol (m³) Total
ALAGOAS	8.442.883	677.901	127.707	53.380	181.087
PERNAMBUCO	7.955.581	593.694	68.230	142.866	211.096
PARAÍBA	4.544.384	128.155	134.481	142.260	276.741
BAHIA	3.539.738	149.927	74.714	105.931	180.645
MARANHÃO	2.220.470	22.574	142.972	19.688	162.660
TOCANTINS	2.187.596	0	115.747	60.566	176.313
RIO GRANDE DO NORTE	1.773.091	115.378	24.893	28.349	53.242

SERGIPE	1.039.698	54.100	14.521	26.664	41.185
PARÁ	976.712	45.851	43.472	8.086	51.558
PIAUÍ	850.019	63.022	19.577	823	20.400
AMAZONAS	222.127	11.866	0	4.845	4.845
RONDÔNIA	78.038	0	0	4.444	4.444
CEARÁ	0	0	0	0	0
ACRE	0	0	0	0	0
TOTAL	33.810.337	1.862.468	766.314	597.902	1.364.216
NORTE/NORDESTE:					

Fonte: Base de dados do MAPA (SAPCANAS DAS UNIDADES PRODUTORAS DE CANA E ÁLCOOL).

A cana-de-açúcar é cultivada em regiões tropicais e subtropicais de mais de 90 países, difundida em uma ampla faixa de latitude de 35°N a 30°S, adaptando-se a diversas condições de climas e solo, exigindo precipitações pluviométricas entre 1500 a 2500 mm por ciclo vegetativo (Rodrigues, 1995). Trata-se de uma cultura de grande importância econômica no mundo (Dantas Neto *et al.*, 2006).

Os fatores ambientais responsáveis pela maior expressão de produtividade da cana-de-açúcar são a temperatura (16°C a 33°C), a alta incidência de radiação solar, bem como a disponibilidade de água no solo, ou seja, trata-se de uma planta essencialmente tropical. Apesar da cultura se desenvolver em uma boa amplitude térmica, estudos indicam que temperaturas inferiores a 21°C reduzem a taxa de alongamento dos colmos e promovem o acúmulo de sacarose (Aude, 1993).

Quanto ao tempo de desenvolvimento, tem-se a cana de ano (12 meses) e a de ano e meio (18 meses), sendo chamada de cana-planta, a de primeiro corte. Depois do primeiro corte, denomina-se cana-soca, com cortes anuais por uma média de cinco anos (Aude, 1993). O cultivo convencional da cana-de-açúcar apresenta as seguintes etapas: preparo do solo, plantio, manejo para a cana-planta, manejo para a cana-soca e colheita (Pereira *et al.*, 2015).

Na implantação de um canavial, antes mesmo da etapa do preparo de solo, é necessário realizar o planejamento da área com base no levantamento topográfico. Assim, definem-se as áreas de plantio em locais subdivididos, conhecidos por talhões, e alocam-se os carregadores principais e secundários pelos quais os equipamentos utilizados no plantio e na colheita irão circular. Desse modo, há toda uma sistematização do terreno. O propósito da formação de talhões é manter as linhas de cana com o maior comprimento possível com o intuito de otimizar operações e minimizar as manobras das máquinas. Cada talhão tem em média de 10 a 20 hectares (EMBRAPA, 2007).

Na etapa de preparo de solo, consideram-se a conservação do solo e a criação de terraços a fim de reduzir o processo erosivo. Dessa maneira, formam-se sucros espaçados adequadamente para possibilitar melhor rendimento na aplicação de defensivos e na colheita. O espaçamento relaciona-se diretamente com a produtividade, porque afeta a disponibilização de recursos como água, luz, temperatura e nutrientes. Em geral, esse espaçamento é em torno de 1,8 metros e, sulcos com profundidade de 20cm a 30cm (EMBRAPA, 2007).

Ainda no preparo de solo, realizam-se a calagem e a adubação de acordo com os resultados de prévias análises físico-químicas do solo, além do revolvimento do ambiente edáfico através da gradagem (EMBRAPA, 2007).

Na etapa de plantio da cana-planta, observam-se quatro estágios fenológicos: brotação, emergência, perfilhamento, crescimento e maturação dos colmos (Shih e Gascho, 1980). Após 20 ou 30 dias do plantio ou rebrota ocorrem a brotação e a emergência. Essas etapas caracterizam-se pelo rompimento das folhas da gema e o desenvolvimento das raízes no tolete. A fase de perfilhamento é caracterizada pela formação das touceiras e atinge o auge após a cobertura total do solo pelas folhas da cana. Em seguida, tem-se o crescimento dos colmos, no qual a planta atinge a altura máxima e inicia o acúmulo de açúcar, além disso, o crescimento radicular torna-se mais vigoroso. Nesse momento, as folhas mais velhas secam e ponteiros continuam a ser emitidos. A palha da cana-de-açúcar será constituída por essas folhas secas e pelos ponteiros. Finalmente, o acúmulo de açúcar no colmo, determina a maturação completa da cana (Shih e Gascho, 1980).

No âmbito da colheita é preciso considerar que há três tipos básicos: a colheita da cana crua com a incorporação da palhada, a colheita da cana crua sem palhada e a colheita da cana previamente queimada. No primeiro caso, há maior produção de colmos, elevação no teor de matéria orgânica do solo, menores valores de resistência do solo à penetração e diminuição da densidade edáfica quando comparado ao sistema cana crua sem incorporação da palhada e cana queimada (Souza *et al.*, 2005). Todavia, apesar de haver um crescimento da colheita mecanizada no Brasil, a colheita com a prévia queima controlada, isto é, o uso do fogo de maneira prescrita e conduzida dentro dos limites pré-estabelecidos de intensidade, com o intuito de apenas manejar a vegetação, ainda é predominante (Araújo *et al.*, 2005).

Dentre os resíduos gerados pela indústria sucroalcooleira, a vinhaça é o mais importante, devido ao grande volume produzido. Para a produção de um litro de álcool, são gerados cerca de 13 litros de vinhaça, embora esta quantidade dependa da tecnologia utilizada nas usinas ou destilarias. Por apresentar elevada concentração de nutrientes, principalmente potássio (K) e de

matéria orgânica, este resíduo é considerado potencial poluidor. A alternativa mais viável para o seu descarte é a aplicação da vinhaça aos solos cultivados com cana-de-açúcar (Silva *et al.*, 2014). Ao ser adicionada ao solo, a vinhaça causa a elevação do pH. Entretanto, segundo Rodella *et al.*, (1983), esta alteração é transitória, podendo retornar aos valores originais, após determinado período de tempo e há elevação da capacidade de troca de cátions (CTC), devido ao grande aporte de matéria orgânica, que diminui o risco de lixiviação de cátions e o aumento dos teores de macronutrientes no solo (Glória e Orlando Filho, 1983).

Portanto, a aplicação desse subproduto tem sido associada à melhoria da fertilidade do solo, devido ao fornecimento de nutrientes e ao incremento de matéria orgânica propiciado pelo resíduo. O uso agrícola da vinhaça e, conseqüentemente, a redução dos riscos ambientais, fez com que o resíduo adquirisse valor econômico, a partir de 1975, passando de agente poluidor a condicionador químico e físico do solo (Barros *et al.*, 2010).

Durante o plantio da cana-de-açúcar ocorre o intenso preparo do solo que ocasiona alterações em suas propriedades físicas (Centurion, 2007), refletindo em alterações na estrutura do solo, principalmente na camada superficial (Cerri *et al.*, 1991). Dentre essas alterações, pode-se destacar: mudança nos valores de densidade do solo, resistência mecânica à penetração, porosidade total, porosidade de aeração, armazenagem e disponibilidade de água às plantas, dinâmica de água na superfície e no seu perfil, assim como a consistência e a máxima compactabilidade do solo (Klein *et al.*, 1998).

Dentre as usinas pernambucanas de relevante importância na produção de álcool e açúcar no Brasil, destaca-se a Usina Trapiche.

2.2 A USINA TRAPICHE: PRODUÇÃO DE ÁLCOOL E AÇÚCAR NO ESTADO DE PERNAMBUCO

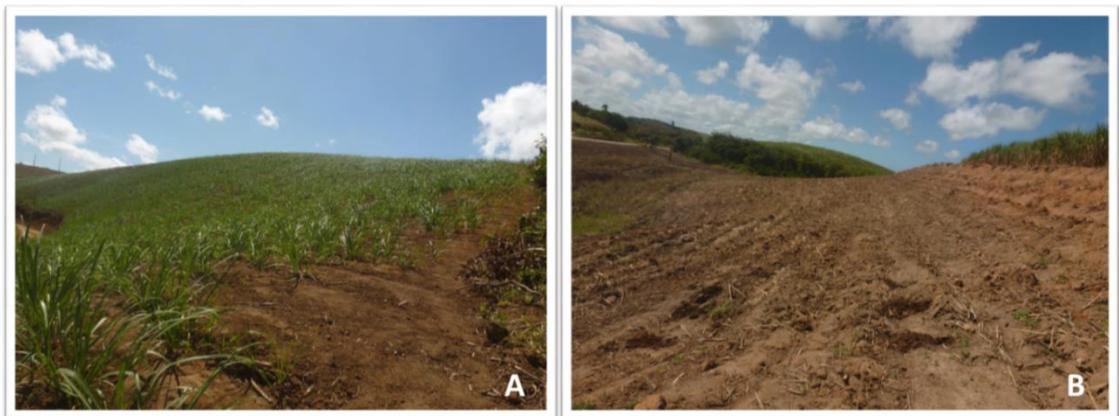
A Usina Trapiche, localiza-se no município de Sirinhaém, Litoral Sul de Pernambuco, Brasil, é uma das mais conceituadas usinas produtoras de açúcar e álcool do país (ALEPE, 2012). Segundo dados da ALEPE (2012), a usina apresenta cerca de 31 mil hectares. Segundo o sistema de Köppen, predominam na área o clima Ams', tropical chuvoso de monção com verão seco, com precipitação pluvial média anual da ordem de 2.295,5 mm e temperatura média de 25 °C (Saldanha *et al.*, 2007). Quanto ao solo, predominam na usina solos do tipo latossolo amarelo, argissolos amarelo, vermelho-amarelo e acinzentado, gleissolo, cambissolo e solos aluviais (Silva *et al.*, 2001).

A Trapiche foi fundada por Bartolo Carolo, italiano nascido em 20 de Abril de 1888 em Montéchio Precalcino – Norte da Itália, e vindo para o Brasil ainda no primeiro mês de vida. Bartolo veio para Pernambuco com sua família que se instalou na fazenda de Santa Rita do Passa Quatro. Seus pais foram colonos nesta fazenda e o Sr. Bartolo cresceu ajudando seus pais com o trabalho na fazenda.

Por volta de 1904 foi para Pontal com seus pais para trabalharem na plantação de café na fazenda trapiche. Em 1932 o sítio foi gradativamente transformado no plantio de cana-de-açúcar (Figuras 3 a e b) que era entregue na Usina Albertina. No ano de 1947 surgiu a Usina Nossa Senhora Aparecida Ltda., com sua primeira produção de 31.850 sacas de açúcar. Em 1958 a família Bortolo Carolo possuía 1.011 alqueires de terras e a usina já produzia 52.100 sacas de açúcar. Em 20 de janeiro de 1961 a Empresa transformou-se em Açucareira Bortolo Carolo S/A, com contrato social registrado na JUCESP sob. o número 175.847 de 21.02.1961. No dia 07 de Janeiro de 2005, a razão social foi alterada de "Açucareira Bortolo Carolo S/A", para "Usina Trapiche S/A - Açúcar e Álcool".

De acordo com dados do site da empresa (Usina trapiche, 2017), atualmente por dia são produzidos 28.000 sacos de açúcar, além de também produzir energia elétrica, gerada a partir das águas do Rio Sirinhaém e do bagaço da cana.

Figura 3 - (A) - área de cultivo de cana-de-açúcar da usina Trapiche; (B) - área em pousio da usina Trapiche, ambas as áreas localizadas no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil.



Fonte: Próprio Autor.

2.3 OS IMPACTOS DA COLHEITA DA CANA COM A QUEIMA DA PALHADA NA MICROBIOTA DO SOLO

Alterações na atividade biológica do solo, nos ciclos energético e biogeoquímico têm sido relatadas em função do modo como é realizada a colheita da cana-de-açúcar, isto é, de forma mecanizada (sem a queima da palhada) ou manual com a queima da palhada (Barbosa, 2010).

A resposta dos micro-organismos aos impactos provocados pelo tipo de manejo edáfico, em geral, é rápida quando comparadas às mudanças observadas nas propriedades físico-químicas do solo e, isso é um indicativo de que esse ecossistema possa estar mais conservado ou degradado (Araújo e Monteiro, 2007).

A colheita manual da cana-de-açúcar, ainda muito utilizada, é precedida pela queima da palhada com o intuito de eliminar restos vegetais e animais peçonhentos para facilitar a atividade dos cortadores e do transporte dos toletes para a usina (Azania *et al.*, 2006). Todavia, além de intensificar a emissão de gases poluidores e causadores do efeito estufa (Figueiredo *et al.*, 2011) também é responsável por prejudicar a saúde humana (Lopes e Ribeiro, 2006).

A comunidade de micro-organismos do solo para o cultivo de cana-de-açúcar tem sua diversidade favorecida pela colheita sem queima da palhada quando comparada à colheita manual (Pereira *et al.*, 2015). A colheita mecanizada é uma medida mitigadora do efeito estufa, além de proporcionar uma boa cobertura do solo por resíduos vegetais (a palhada) e contribuir para qualidade edáfica bem como favorecer o aumento no potencial produtivo da cultura (Tavares *et al.*, 2010).

A qualidade do solo é resultante da ação integrada de seus atributos biológicos, químicos e físicos para que o ecossistema edáfico exerça suas funções no sistema solo-planta-atmosfera (Vezzani e Mielniczuc, 2009). Dentre os atributos biológicos do solo, a biomassa microbiana é definida como componente vivo do solo, incluem-se, portanto, bactérias, fungos, protozoários, actinomicetos, os quais, por sua vez, atuam na decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes e fluxo de energia dentro do solo (Cardoso, 2004).

Para a caracterização da qualidade de um solo, as propriedades microbiológicas mais utilizadas são: a biomassa microbiana do solo (BMS) e a respiração basal do solo (RBS). A primeira refere-se à atividade da parte viva da matéria orgânica do solo (MOS) e a segunda, chamada de C (carbono) prontamente mineralizável, avalia a atividade metabólica da população microbiana, baseada na liberação de CO₂ (Oliveira *et al.*, 2014).

Os efeitos da queimada no solo variam conforme as condições ambientais no momento da passagem do fogo, o tipo de solo, a frequência da queima e a quantidade disponível de combustível, os quais, em conjunto, são responsáveis pela intensidade e duração da queima com repercussão direta na microbiota edáfica (Redin *et al.*, 2011).

A chama atua diminuindo a disponibilidade de matéria orgânica, fonte inicial de energia dos micro-organismos, o que resulta na redução da mesofauna e, conseqüentemente, na queda da produtividade edáfica. De um modo geral, a microbiota edáfica é afetada nos primeiros centímetros do solo, ressaltando-se que a gravidade dos danos, relaciona-se com as variáveis ambientais (temperatura, umidade, relevo, solo e vegetação) bem como a intensidade e frequência do fogo (Redin *et al.*, 2011).

Outro aspecto a ser analisado no cultivo da cana-de-açúcar é a interferência da aplicação da vinhaça, resíduo gerado durante a produção do álcool, como uma prática já bem estabelecida para a melhoria da produção dessa cultura e os seus efeitos sobre os micro-organismos do solo.

2.4 A INTERFERÊNCIA DA APLICAÇÃO DA VINHAÇA NA MICROBIOTA EDÁFICA

O Brasil, atualmente o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, atende a um apelo ambiental bem atual, isto é, a produção de biocombustível (CONAB, 2018). Sabe-se que durante o beneficiamento da cana-de-açúcar são gerados uma enorme quantidade de resíduos e, dentre estes, está a vinhaça (vinhoto ou restilo). É estimado que para cada litro de álcool produzido são gerados de dez a quinze litros de vinhaça (Oliveira *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013).

Caracteristicamente, a vinhaça apresenta um elevado potencial de contaminação ambiental, com coloração marrom-escuro, forte odor, baixo nível de pH, elevado teor de matéria orgânica, alta taxa de potássio e grande demanda química de oxigênio (España-Gamboa *et al.*, 2011; Fuess e Garcia, 2014).

Devido ao seu potencial poluidor, desenvolveram-se técnicas alternativas de aplicação da vinhaça, diminuindo assim seu efeito nocivo ao solo e a sua microbiota. Dentre os procedimentos, tem-se a aplicação do vinhoto concentrado na linha de plantio e a fertirrigação (Silva *et al.*, 2013).

No âmbito da colocação do restilo na linha de plantio, a vantagem está no transporte do resíduo bem como na liberação lenta do nitrogênio para as plantas, uma vez que o resíduo concentrado promove a imobilização deste nutriente (Silva *et al.*, 2013).

Em se tratando da fertirrigação, trata-se de uma prática já consolidada (Silva *et al.*, 2014) a qual vem sendo estudada para aplicação em outras culturas como feijão e linhaça (Viera *et al.*, 2012; Agostinho *et al.*, 2014) e no desenvolvimento de pastagens (Oliveira *et al.*, 2015). Nessa técnica, os impactos ambientais gerados pela vinhaça são suavizados, porém o custo no transporte do resíduo é economicamente inviável para áreas distantes da usina (Silva *et al.*, 2013).

Em função do seu alto teor de matéria orgânica e de outros nutrientes necessários para os vegetais, a literatura cita a vinhaça como benéfica para as áreas agrícolas. Além disso, o uso racional desse resíduo proporciona redução dos custos com adubação e os impactos ambientais (Silva *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2012). Por outro lado, a utilização desse subproduto sucroalcooleiro sem critérios técnicos promove prejuízos ao ecossistema edáfico, como: a lixiviação dos sais existentes no vinhoto (Ribeiro *et al.*, 2014), a salinização do solo, a contaminação de lençóis freáticos, entre outros impactos (Fuess e Garcia, 2014).

Para utilizar a vinhaça como substituto do adubo mineral em culturas agrícolas é necessário levar em consideração a composição química desse resíduo, as exigências da cultura e o tipo de solo em que a aplicação ocorrerá (Ribeiro *et al.*, 2014). Além disso, a interferência da vinhaça na população microbiana pode ser positiva ou negativa, podendo ou não comprometer as atividades edáficas mediadas pela microbiota. Esse comprometimento dependerá dos critérios adotados para a aplicação da vinhaça (Martins e Campos, 2011).

É possível haver um ganho na composição biológica do solo em função do aumento de matéria orgânica fornecido pelo resíduo, através da aplicação dimensionada do mesmo (Yang *et al.*, 2013). Desse modo, os micro-organismos atuam como bioindicadores potenciais da qualidade do ambiente edáfico, uma vez que a microbiota é sensível às mudanças ambientais (Martins e Campos, 2011).

Dentre os distintos micro-organismos que compõem o ecossistema edáfico estão os fungos filamentosos e, nesse universo fúngico encontramos os pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces*.

2.5 FUNGOS EM SOLOS DE CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A ecologia microbiana do solo trata das relações dos micro-organismos presentes neste substrato, com os fatores abióticos (ambientais) e bióticos (interação com outros organismos). De acordo com Araújo e Monteiro (2007) é na camada superficial do solo, entre 1 e 30 cm de profundidade, que ocorre maior atividade microbiana, sobretudo devido à maior oxigenação e presença de matéria orgânica. Por isso, toda alteração mecânica e/ou físico-química no ecossistema edáfico impacta diretamente as comunidades microbianas do solo. Nessas camadas, os micro-organismos ocupam uma fração menor que 0,5 % do volume total do solo e representam menos que 10 % da matéria orgânica (Araújo e Monteiro, 2007).

Os fungos filamentosos desempenham funções essenciais para o funcionamento do solo, tais como: decomposição da matéria orgânica, liberação de nutrientes em formas disponíveis às plantas e degradação de substâncias tóxicas (Maciel, 2008; Blackwell, 2011; Borges *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2013a; Oliveira *et al.*, 2013; Matsuzawa *et al.*, 2014).

A presença de um micro-organismo em determinado solo é função das condições ambientais dominantes e dos limites da sua bagagem genética (Domsch, *et al.*, 1993). Dessa forma, existem fatores ambientais (abióticos) que limitam a sobrevivência e a atividade dos micro-organismos do solo. Os principais fatores abióticos do solo são a temperatura, o pH, a salinidade, as fontes de energia, substratos orgânicos, os nutrientes e os elementos tóxicos. Além disso, há os efeitos do impacto antropogênico sobre a microbiota do solo, tais como, mudança no manejo e cultivo do solo

O ambiente edáfico é densamente colonizado por micro-organismos. Estima-se que para cada grama de solo existam cerca de 10^9 células microbianas (Torsvik *et al.*, 2002) e de 10 a 30 mil genomas microbianos diferentes (Roesch *et al.*, 2007). A funcionalidade dessas comunidades microbianas no solo contribui para o desenvolvimento dos produtores primários, em especial, as plantas, através do catabolismo de compostos orgânicos geradores de compostos químicos essenciais. Além disso, os micro-organismos colaboram na supressão de fitopatógenos, imobilização e mineralização de nutrientes, decomposição de contaminantes, manutenção da estrutura do solo e, principalmente, nos ciclos biogeoquímicos do carbono, enxofre, nitrogênio e fósforo (Garbeva *et al.*, 2004; Wakelin *et al.*, 2008).

Dentre os micro-organismos de maior influência funcional no solo, tem-se os fungos (Anderson e Cairney, 2004). A grande maioria das pesquisas promotoras da relação entre fungos e a cultura da cana-de-açúcar são pautadas nas diversas doenças dos canaviais. Dentre

as doenças fúngicas comprometedoras da fisiologia da cana-de-açúcar citam-se: a ferrugem (*Puccinia melanocephala*), o carvão (*Sporisorium scitamineum*), mancha parda, podridão abacaxi, podridão vermelha e podridão de *Fusarium*. É através do uso de fungicidas, utilização de variedades resistentes e do tratamento de mudas que essas doenças fúngicas da cana-de-açúcar são combatidas (Tokeshi, 1997).

Além disso, é importante destacar que a maioria das interações entre fungos e plantas não resultam em patogênese, uma vez que, boa parte dos fungos não manifestam fatores essenciais para expressar uma doença (Heath, 2003). Todavia, cerca de 10% dos diversos tipos de fungos são patógenos de vegetais e, desenvolvem as mais distintas interações como: parasitas obrigatórios ou biotróficos, os quais crescem e se reproduzem em hospedeiros vivos; parasitas facultativos ou necrotróficos, que podem viver tanto em hospedeiros vivos como mortos bem como em meios de cultura artificiais e, saprófitas, os quais se alimentam de matéria orgânica morta (Kahmann e Basse, 2001).

A presença no solo de associações entre fungos do filo Glomeromycota e as raízes das plantas cultivadas possibilita maior oferta de nutrientes e pode controlar sistemas, como a exsudação radicular (Toljander *et al.*, 2007). Esta associação micorrízica além de elevar a microbiota do solo, ajuda na disponibilidade de nutrientes em um ecossistema edáfico com baixo nível de fósforo e carbono, por exemplo (Nazir, 2010). As pesquisas que correlacionam a ocorrência de fungos no solo e suas interações com a cana-de-açúcar em função de atributos físicos ou químicos são escassas.

Barros (2012) realizou estudo que envolveu a aplicação da vinhaça em solos com cultivo de cana-de-açúcar o qual revelou a presença dos seguintes gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phytophthora* e *Trichoderma*. Além disso, o autor comparou áreas com e sem aplicação da vinhaça e observou que a vinhaça não alterou as condições biológicas edáficas.

Alguns trabalhos demonstram a presença do gênero *Penicillium* como endofítico na cana-de-açúcar. Este gênero foi encontrado com grande frequência em tecidos internos desta Poaceae bem como em sua rizosfera (Stuart, 2006).

2.6 O GÊNERO *PENICILLIUM*: DA DESCOBERTA À TAXONOMIA CONTEMPORÂNEA

Em 1809 Link descreveu o gênero *Penicillium*, por observar ao microscópio conidióforos similares à pincéis. O pesquisador resolveu, então, denominá-lo de *Penicillium*, do Latim *Penicillius* e descreveu a três espécies *P. candidum*, *P. glaucum* e *P. expansum*. Trata-se de um dos diversos gêneros de fungos que se reproduzem através da produção de esporos denominados de conídios, que são originados a partir de estruturas designadas conidióforos ou esporóforos.

O primeiro pesquisador a introduzir um sistema de classificação secundária para o gênero foi Dierckx (1901). Ele propôs a subgêneros *Aspergilloides*, *Biverticillium* e *Eupenicillium*. Em 1910, Thom designou *Penicillium expansum* como espécie tipo para este gênero. A espécie apresenta padrão de ramificação predominantemente terverticilado, sendo frequentemente isolada de solos (Raper e Thom, 1949).

Biourge (1923), seguiu o sistema de classificação de Dierckx e o ampliou com duas seções, quatro séries e seis subseções. Thom (1930) não aceitou o sistema de classificação secundária de Dierckx e Biourge e introduziu um novo sistema com quatro subgêneros, 12 seções e 18 subseções (séries). Seu sistema foi baseado principalmente nas características macroscópicas das colônias e no padrão de ramificação do conidióforo.

Dezenove anos mais tarde, Raper e Thom (1949) publicaram o “Manual of the *Penicillia*” aceitando o trabalho de Thom e reconhecendo 137 espécies para o gênero. Segundo os autores, as espécies de *Penicillium* geralmente crescem utilizando uma ampla diversidade de monossacarídeos, dissacarídeos, álcoois e ácidos como única fonte de carbono. As hifas e os conídios frequentemente armazenam trealose e polióis, como o manitol. Ainda de acordo com Raper e Thom (1949), a maioria das espécies de *Penicillium* é nutricionalmente pouco exigente, não exigindo vitaminas complexas para crescerem, além de conseguirem crescer na presença de nitrato como a única fonte de nitrogênio.

Geralmente as colônias de *Penicillium* são constituídas por micélio abundante, apresentando coloração em diversos tons de verde, variando entre: verde-amareladas, verde-azuladas, verde-acinzentadas, ou menos frequentemente incolores, brancas, salmons, avermelhadas, amarelo-arroxeadas, ou de outras tonalidades. A coloração do reverso das colônias é também relevante ferramenta taxonômica. Pode ser incolor, ou variar de tons de amarelo, verde, vermelho e marrom. Isolados de algumas espécies são capazes de produzir

pigmentos que modificam a tonalidade do meio de cultura. Tais isolados podem também produzir gotas de exsudato de coloração diversa, especialmente quando crescidos sobre o meio Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA). Tanto a capacidade de pigmentar o meio, quanto a de produzir exsudato, são características avaliadas durante o processo de identificação clássica (Raper e Thom 1949; Pitt, 1991).

Em espécies de *Penicillium* observam-se hifas septadas, geralmente anastomosadas, apresentando paredes não pigmentadas (Pitt, 1991). Os conidióforos, estruturas assexuadas que produzem conídios (esporos), derivam do micélio e são frequentemente perpendiculares ao substrato. A estrutura do conidióforo consiste de um estipe que pode ser estreito ou alargado, com parede lisa ou rugosa, a depender da espécie. No ápice do estipe surge o “*Penicillus*”, formado por células conidiogênicas, chamadas de fiálides. As fiálides podem localizar-se diretamente no estipe ou sobre células de apoio denominadas métulas e ramos. Algumas espécies de *Penicillium* apresentam uma ramificação adicional, denominada râmulo, localizada entre a métula e o ramo (Onions e Brady, 1987; Pitt, 1991; Cruz *et al.*, 2013a).

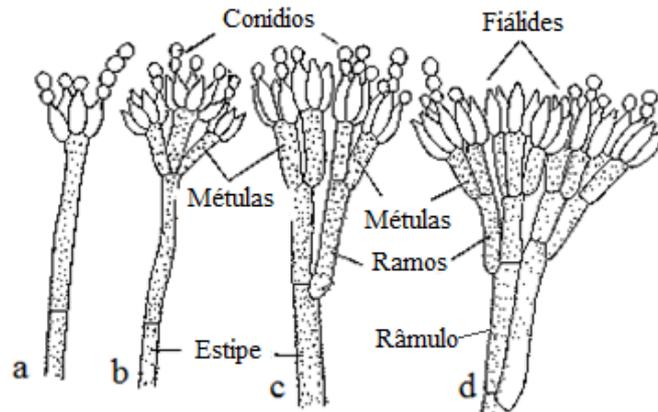
As fiálides geralmente apresentam forma de balão ou de garrafa que se estreitam no ápice, sendo esse estreitamento denominado “*collula*”. Algumas espécies apresentam forma acerosa, ou seja, forma de agulha. É no interior destas células conidiogênicas que os conídios são originados, geralmente catenulados e de forma basípeta, isto é, o conídio mais velho ocupa o topo da cadeia (Raper e Thom, 1949).

Os conídios são reconhecidos por serem unicelulares, uninucleados, hialinos e muito pequenos. Variam de globosos à cilíndricos e, a depender da espécie, a parede pode ser lisa, rugosa, ou espinescente. Algumas espécies são capazes de produzir esclerócios, que são estruturas multicelulares de resistência que podem permanecer latentes por longos períodos até as condições do meio se tornarem propícias ao seu desenvolvimento (Pitt, 1979; 1991).

Em 1979, o renomado taxonomista australiano, Dr. John Pitt não seguiu o conceito de Thom e publicou um manual de identificação, com 150 espécies. O autor dividiu *Penicillium* em quatro subgêneros, 10 seções e 21 séries, com base no padrão de ramificação dos conidióforos, formas das fiálides e características de crescimento. Segundo Pitt, podiam existir cerca de 300 espécies para o gênero e afirmou que provavelmente cerca de 1000 fenótipos diferentes ainda seriam catalogados (Pitt, 1979). Além disso, ele tratou *Eupenicillium* separadamente de *Penicillium*, subdividindo o gênero em oito séries. Esta classificação foi considerada secundária, pois foi baseada em uma combinação de vários fatores, tais como taxas de crescimento em condições normais, morfologia da colônia e características microscópicas

de ambos os estados teleomórficos e anamórficos. Quanto ao padrão de ramificação dos conidióforos, Pitt agrupou as espécies em: monoverticiladas, biverticiliadas, terverticiladas e quarterverticiladas. Espécies monoverticiladas apresentam apenas um estágio de ramificação entre o estipe e os conídios, ou seja as fiálides (Figura 4a). Biverticiladas são as espécies que apresentam dois estágios de ramificação entre o estipe e os conídios. Neste caso, apresentam imediatamente após o estipe, uma célula de suporte, denominada métula e mediatamente sobre a métula, encontra-se a fiálide (Figura 4b). No padrão terverticilado, observa-se a presença de um ramo entre o estipe e a métula, formando assim três estágios de ramificação (Figura 4c). Por fim, o padrão quadriverticilado, no qual observa-se um râmulo entre o estipe e o ramo, seguido por métula e fiálide (Figura 4d).

Figura 4 - Tipos de conidióforos em *Penicillium* e *Talaromyces*.



Fonte: Samson *et al.*, (1984).

Ramírez (1982) publicou outra monografia, seguindo as ideias publicadas anteriormente por Thom (1930) e Raper e Thom (1949). Em 1985, Stolk e Samson propuseram um outro esquema taxonômico para *Penicillium*, sendo essa classificação considerada primária, por ser baseada na forma das fiálides, bem como no padrão de ramificação dos conidióforos. Os autores dividiram o gênero em 10 seções e 18 séries.

Em 1991, Pitt catalogou um conjunto de espécies de *Penicillium* e concluiu que cerca de 30 a 40 dessas espécies eram comuns na natureza. Segundo o autor, os teleomorfos são reconhecidos como gêneros separados. As espécies de *Penicillium* são associadas com dois gêneros teleomorfos de Ascomycetes: *Eupenicillium* Ludwig e *Talaromyces* C. Benjamin. As espécies pertencentes ao gênero *Talaromyces* produzem gimnotécio, um ascocarpo no qual os ascos são circundados por um emaranhado de hifas frouxamente dispostas. Enquanto as

espécies de *Eupenicillium* produzem cleistotécio com parede pseudoparenquimatosa, lisa e colorida, a depender da espécie (Pitt, 1991).

Segundo a classificação de Alexopoulos *et al.*, (1996), o gênero *Penicillium* apresenta espécies apenas anamorfias e foram incluídas no Filo Ascomycota, Classe Plectomycetes, Ordem Eurotiales e Família Trichocomaceae. No ano 2000, Pitt e colaboradores listaram 225 espécies aceitas para o gênero *Penicillium*, mencionando seus respectivos sinônimos (Pitt *et al.*, 2000). Após quatro anos, Frisvad e Samson publicaram uma monografia apenas sobre o subgênero *Penicillium*, dividindo-o em cinco secções e 17 séries (Frisvad e Samson, 2004).

Segundo a maioria dos taxonomistas especialistas em *Penicillium*, a taxonomia do gênero é complexa, sobretudo devido à morfologia das espécies. Por isso, tornou-se necessária a busca de outras ferramentas que viessem tornar sua taxonomia mais robusta e precisa. Neste contexto, a biologia molecular, através do sequenciamento de regiões parciais do genoma dos fungos, veio contribuir ativamente tanto para a classificação quanto para a compreensão da filogenia do gênero. Estudos filogenéticos de *Penicillium* tiveram início em meados dos anos 90. Berbee (1995), através de estudo a partir de sequências de rDNA 18S, concluiu que *Penicillium* é polifilético. Em estudos seguintes, o gênero se divide em dois clados: um clado inclui espécies *Talaromyces* e membros do subgênero *Biverticillium* e o outro clado inclui espécies *Eupenicillium* e espécies *Penicillium* acomodados nos subgêneros *Penicillium*, *Furcatum* e *Aspergilloides* (LoBuglio e Taylor 1993, LoBuglio *et al.*, 1993. Berbee *et al.*, 1995, Ogawa *et al.* 1997, Wang e Zhuang 2007). Peterson (2000a) estudou a filogenia de *Eupenicillium* e membros da subgêneros *Penicillium*, *Furcatum* e *Aspergilloides* mais detalhadamente. Em seguida, ele dividiu as espécies estudadas em seis grupos e mostrou que muitos taxa de *Penicillium* são polifiléticos. Além disso, os dados indicaram que os sistemas de classificação atuais com base em ramificação conidióforo não é consistente com a filogenia e é necessário um novo sistema de classificação secundária.

Frisvad e Samson (2004) estudaram o subgênero *Penicillium*, analisando as sequências parciais do gene para a β -tubulina, de 180 isolados. Propuseram cinco secções e 17 séries. De acordo com os autores, as sequências do gene para a β -tubulina foram excelentes marcadores de espécies.

Em 2007, a comissão internacional de especialistas para a taxonomia do gênero *Aspergillus*, também aplicada ao gênero *Penicillium* recomendou que a descrição de espécies novas deste gênero deve mostrar evidências de divergência evolutiva de espécies. Assim, é requerida a análise molecular baseada em pelo menos dois “loci” gênicos diferentes, tais como

o da RNA polimerase, o da actina, o da β -tubulina ou o da calmodulina. Estes dois últimos são os genes frequentemente mais utilizados, por isso, tanto para o gene da β -tubulina quanto para o da calmodulina, existem grandes conjuntos de dados disponíveis em bancos de dados, como o *GenBank* (Samson *et al.*, 2007).

Técnicas moleculares desenvolvidas a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como o sequenciamento de DNA, têm sido ferramentas úteis na identificação de vários organismos, dentre eles os fungos. A região ITS (Internal Transcribed Spacer) e o gene para a β -tubulina estão entre as regiões mais estudadas durante a identificação molecular de fungos (Brunner *et al.*, 2007), inclusive de espécies pertencentes ao gênero *Penicillium*. O sequenciamento da região ITS, separa os genes 18S e 28S do rDNA, podendo ser amplificada com primers específicos ancorados nessas duas regiões. Trata-se de uma região que apresenta elevada conservação de intraespecificidade, sendo variável entre diferentes espécies, possibilitando a distinção ao nível específico (Fungaro, 2000). Constituintes dos microtúbulos, as tubulinas são proteínas responsáveis pela formação do citoesqueleto. Presentes em todos os eucariotos, exercem um papel crítico em vários processos celulares, tais como a motilidade celular, o transporte citoplasmático e a divisão celular (Stotz; Long, 1999). Tanto a sequência de nucleotídeos do gene para a β -tubulina quanto a sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene têm sido largamente usadas para compreender as relações filogenéticas em fungos (Tuszynski *et al.*, 2006).

Foi com base na amplificação parcial dos genes RPB1, RPB2 (genes para a RNA polimerase II), Tsr1 (ribossomo de biogênese da proteína putativa) e Cct8 (possíveis componentes do complexo caperonina TCP-1), que Houbraken e Samson (2011) propuseram a segregação da família Trichocomaceae em três famílias: Aspergillaceae, Thermoascaceae e Trichocomaceae. Essa segregação foi baseada em análises morfológicas e filogenéticas. Após esta última reclassificação o gênero *Penicillium* foi denominado *Penicillium sensu stricto*, no qual se encontram tanto espécies anamorfas, quanto teleomorfas. O gênero *Penicillium sensu stricto* foi assim reclassificado e inserido na família Aspergillaceae. Morfologicamente, as espécies pertencentes à família Aspergillaceae são caracterizadas por produzir fiálides ampuliformes ou cilíndricas e ascos produzidos dentro de cleistotécios ou rodeados por células de Hülle. Os ascosporos apresentam um sulco ou fenda. Por outro lado, na família Trichocomaceae foram incluídas espécies que produzem fiálides lanceoladas e ascos envolvidos por camadas de hifas soltas e ascosporos sem fendas. Na família Thermoascaceae, as espécies incluídas também produzem ascosporos com ausência de sulco, porém distinguem-

se por produzirem ascos em báculos, além de serem termotolerantes ou termófilas. Neste caso incluem-se os gêneros *Thermoascus* e *Paecilomyces*.

Houbraken e Samson (2011) propuseram a junção dos anamorfos com os teleomorfos criando *Penicillium sensu stricto*. Após a reclassificação estabelecida por Houbraken e Samson (2011), o gênero *Penicillium* foi denominado *Penicillium sensu stricto*, estando agora inserido na família Aspergillaceae. Os autores incluíram em *Penicillium* os antigos gêneros *Chromocleista*, *Eupenicillium*, *Hemicarpenales*, *Thysanophora* e *Torulomyces*, propondo novas combinações para as espécies pertencentes a estes gêneros. A partir da análise filogenética foram formados 25 clados para o gênero *Penicillium*, sendo cada clado denominado seção.

Ainda em 2011, Samson e colaboradores avaliaram a relação filogenética entre as espécies anamorfos atribuídas ao subgênero *Biverticillium* do gênero *Penicillium* e as espécies teleomorfos atribuídas ao gênero *Talaromyces*, através do sequenciamento parcial da SSU (subunidade pequena) e/ou LSU (subunidade grande) do rDNA, bem como da região ITS do rDNA. Os autores concluíram que as espécies pertencentes ao subgênero *Biverticillium* e ao gênero *Talaromyces* formam um grupo monofilético distanciado das espécies integrantes de outros subgêneros de *Penicillium*. Com base no conceito de nomenclatura única para uma espécie, os autores transferiram todas as espécies presentes no subgênero *Biverticillium* para o gênero *Talaromyces*, mesmo que para algumas a fase teleomorfa ainda não tenha sido descrita (Samson *et al.*, 2011).

Espécies do gênero *Penicillium* são de elevada relevância na natureza, pois participam ativamente em ciclos biogeoquímicos, atuando na decomposição de matéria orgânica (Cruz *et al.*, 2013a).

2.7 O GÊNERO *TALAROMYCES* C.R. BENJ

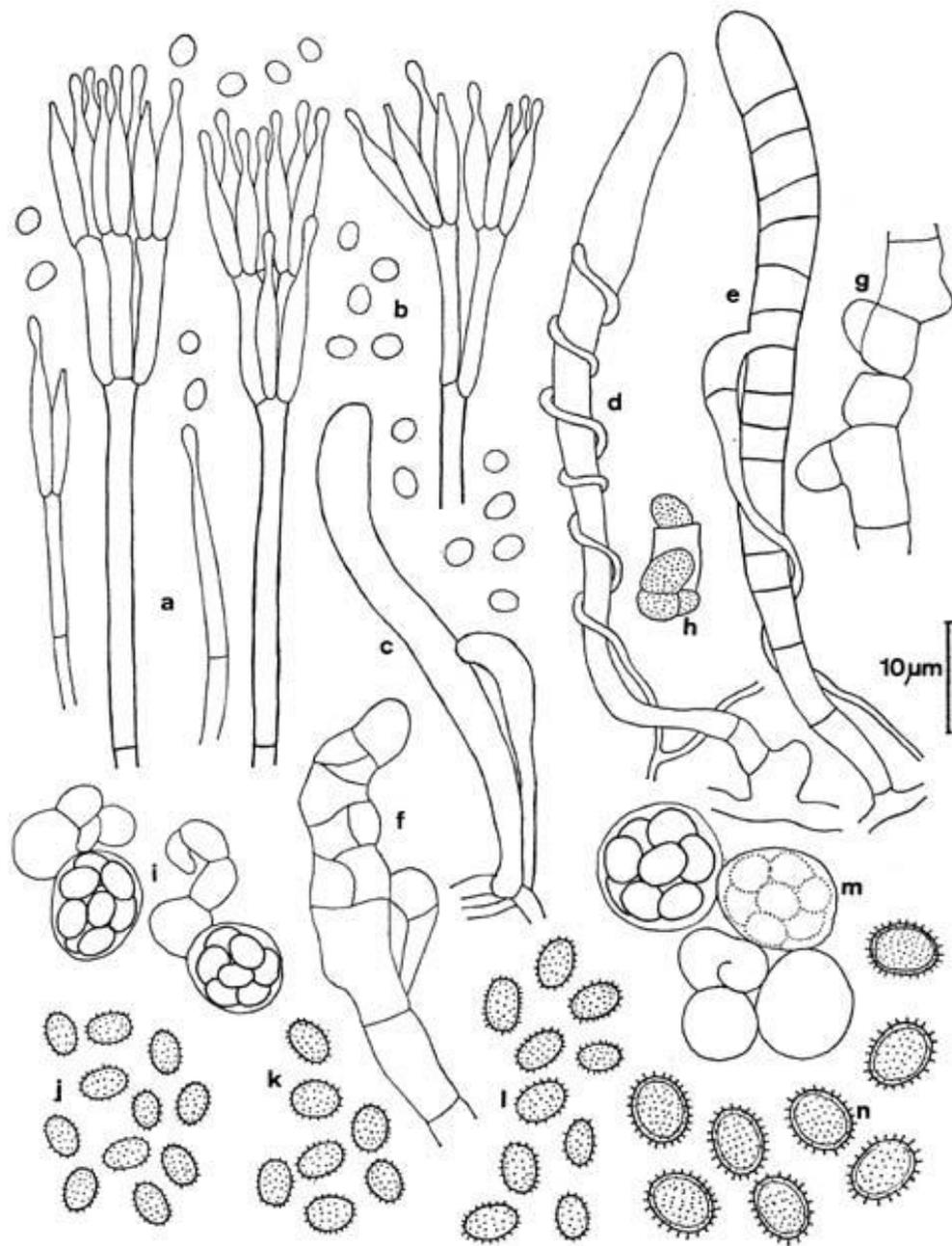
Descrito por Benjamin, em 1955, *Talaromyces* era caracterizado por acomodar espécies holomórficas que Raper e Thom (1949) haviam classificado dentro do grupo “*Penicillium luteum*”, em sua seção Biverticalada-simétrica. Benjamin (1955) determinou *Talaromyces vermiculatus* como tipo para o gênero (Figura 6). Quando descrito, *Talaromyces* abrigava espécies que apresentavam Gimnotécio branco ou amarelo, em associação com o estado anamorfo, característico de *Penicillium*, *Paecilomyces* ou ainda, de *Geosmithia*. Com isso, observa-se o caráter heterogêneo de *Talaromyces*, quando descrito, baseado apenas em caracteres fenotípicos.

A presença dos três anamorfos em um único gênero teleomórfico sugere que seus limites são amplamente definidos e que *Talaromyces* é, em certa medida, heterogêneo.

Na tentativa de resolver a heterogeneidade de *Talaromyces*, Stolk e Samson (1972) removeram as espécies que produzem ascos em cadeias para um novo gênero, denominado *Hamigera*. Entretanto, Pitt (1979), renomado taxonomista do gênero não aceitou essa modificação, mais tarde, com o advento da biologia molecular, estudos indicaram que Stolk e Samson (1972) estavam provavelmente corretos. Os autores dividiram o gênero em quatro seções baseadas nos anamorfos dos gêneros que compunham *Talaromyces*. Pitt (1979) aceitou a classificação, mas ao publicar seu livro discutiu apenas três seções, excluindo as espécies cuja fase anamorfa correspondia aos gêneros *Paecilomyces* e a *Geosmithia*. Todas as espécies descritas por Pitt (1979) compunham a seção *Talaromyces*, a qual incluía as espécies mais comuns. Esta seção foi subdividida em três séries, com base nas características das colônias. Em 1991, Pitt publica um manual para a identificação das espécies comuns de *Penicillium*, no qual, para o gênero *Talaromyces* o autor descreve seis espécies comuns: *Talaromyces flavus*, *T. luteus*, *T. macrosporum*, *T. stipitatus*, *T. trachyspermus* e *T. wortmanii*.

Segundo Pitt (1991), ecologicamente, *Talaromyces* é um gênero relativamente primitivo, com muitas espécies encontradas apenas em solos inabitados. Uma das características mais relevantes do gênero é a capacidade que muitas espécies apresentam de crescimento sob temperatura elevada. Por outro lado, outras espécies requerem maior atividade de água e podem ser encontradas em ambientes úmidos, além de colonizar folhas em decomposição. Assim como *Penicillium*, *Talaromyces* é excelente decompositor de matéria orgânica.

Figura 5 - *Talaromyces vermiculatus* (= *T. flavus* (Klöcker) Stolk & Samson, comb. nov.). *Talaromyces flavus* var. *flavus*, CBS 310.38. a. diferentes tipos de estruturas coonidiogênicas; b. conídio; c-d. desenvolvimento do ascogônio e do anterídio; e. fusão entre os dois gametângios e subsequente septação do ascogônio; f. desenvolvimento dos septos horizontal, transverso e oblíquo; g-h. production de ramos das células ascógenas, que se desenvolverão nas hifas ascógenas; i. cadeia de ascos; j-l. ascosporos, j. CBS 352.72; k. CBS 387.48; l. CBS 310.38. *Talaromyces flavus* var. *macrosporus*, CBS 317.63 m. cadeia de ascos; n. ascosporos.



Fonte: Stolk e Samson, (1972).

2.8 REORGANIZAÇÃO DA TAXONOMIA DE *PENICILLIUM* E *TALAROMYCES*

A taxonomia de *Penicillium* e de *Talaromyces* é dinâmica e vêm sofrendo alterações ao longo do tempo, sobretudo após o advento da biologia molecular.

Em 1914, Whemer estabeleceu o subgrupo informal "Verticillatae, no qual foram inseridas as espécies que apresentavam simetria dos conidióforos. Posteriormente, Thom

(1930), Raper; Thom (1949), Pitt (1980), e Ramírez (1982) reconheceram o subgrupo informal "Verticillatae como subgênero *Biverticillium*.

Em 1980, o australiano John Pitt, um dos mais renomados taxonomistas de *Penicillium*, reconhecia quatro subgêneros para *Penicillium*: *Aspergilloides*, *Biverticillium*, *Furcatum* e *Penicillium*.

Malloch (1985) provavelmente foi o primeiro taxonomista a sugerir a segregação entre o gênero *Penicillium* e o subgênero *Biverticillium*, formando assim dois gêneros distintos. Para isso, avaliou características morfológicas, ecológicas, bem como a relação entre anamorfo-teleomorfo (Samson et al., 2011). Dentre as características morfológicas que individualizam o subgênero *Biverticillium*, destacam-se o aspecto simétrico das métulas e as fiálides acerosas (Pitt, 1991).

A partir de década de 80 do século passado, surgiram estudos filogenéticos acerca de *Penicillium sensu stricto* e *Talaromyces*. Alguns destes estudos basearam-se na análise de sequências da região ITS do rDNA (Peterson 2000), outros avaliaram o gene da calmodulina (Ogawa et al., 1997; Ogawa; Sugiyama, 2000; Wang; Zhuang, 2007). Tais estudos comprovavam que *Penicillium* é polifilético e que as espécies de *Penicillium* constituintes do subgênero *Biverticillium* e as espécies pertencentes ao gênero *Talaromyces* constituíam um clado distinto de *Penicillium sensu stricto*. Com isso, Samson et al. (2011) revolucionaram a taxonomia de *Penicillium* e *Talaromyces* e transferiram posteriormente todos as espécies de *Penicillium* subgênero *Biverticillium* para o gênero *Talaromyces*. Os autores seguiram a nomenclatura prioritária e nomenclatura de nome único.

Embora *Penicillium* e *Talaromyces* apresentem alta similaridade fenotípica (macro e micromorfologia), o primeiro está mais relacionado filogeneticamente ao gênero *Aspergillus* do que o último. Outra característica divergente é que espécies de *Talaromyces* apresentam crescimento restrito em baixa atividade de água, além de ter padrão de extrólitos diferente do que as espécies de *Penicillium* apresentam. Diante deste contexto, observa-se que a identificação destes fungos ao nível de espécie, é trabalhosa e requer a aplicação de várias técnicas.

Os estudos acerca de *Talaromyces* continuaram e em 2014 Yilmaz e colaboradores aceitaram 88 espécies, distribuídas em sete seções: Bacillispori, Helici, Islandici, Purpurei, Subinflati, *Talaromyces* e Trachyspermi. Os autores realizaram essa classificação com base em abordagem polifásica, utilizando filogenia multigene, morfologia e perfil de extrólitos.

Até 2014 dentro de *Talaromyces* constavam espécies com fiálides predominantemente acerosas. As únicas espécies que apresentavam fiálides ampuliformes, porém com collula fina eram *Talaromyces verruculosus*, *T. aculeatus* e *T. apiculatus*. Entretanto, Visagie et al. (2015) também com base em abordagem polifásica, incluíram cinco espécies com fiálides ampuliformes no gênero: *Talaromyces australis*, *T. kendrickii*, *T. veerkampii*, *T. fuscoviridis* e *T. stellenboschiensis*.

Embora o solo seja o hábitat natural de espécies de fungos, nos últimos anos, espécies de *Talaromyces* têm sido relatadas também de ambientes internos, como anemófilos, inclusive novas espécies para a ciência. É o caso de *T. oumae-annae*, *T. sayulitensis* e *T. yelensis*, isoladas de amostras de poeira provenientes de nove países por Visagie et al. (2014). Em 2016, Chen e colaboradores analisando sistema de aquecimento, ventilação e ar condicionado na China isolaram e identificaram *Talaromyces rubrifaciens* como um novo táxon para a ciência (Chen et al., 2016).

Recentemente, Guevara-Suarez et al., (2017), analisando amostras clínicas nos EUA, identificaram quatro novas espécies de *Talaromyces*, sendo: *T. alveolaris*, *T. georgiensis*, *T. minnesotensis* e *T. rapidus*. Os autores realizaram filogenia da região espaçadora transcrita interna (ITS) do rDNA e β -tubulina. Antes do trabalho de Guevara-Suarez et al., (2017), a única espécie reconhecida como patogênica para o gênero era *Talaromyces marneffeii* (anteriormente *Penicillium marneffeii*). Este fungo é considerado um patógeno emergente que causa micoses sistêmicas fatais, em sua maioria, pacientes imunossuprimidos.

Atualmente, há 173 espécies aceitas para *Talaromyces*, distribuídas em sete seções: Bacillispori, Helici, Islandici, Purpurei, Subinflati, *Talaromyces* e Trachyspermi.

2.9 *PENICILLIUM* E *TALAROMYCES* PROSPECTADOS DE SOLOS DE ÁREAS DE FLORESTAS

Considerando a estimativa de 1,5 milhão de espécies de fungos na natureza, realizada por Hawksworth, e o número de espécies já descritas (cerca de 70.000) (Hawksworth, 1991), compreende-se que ainda há muito a explorar. Relatos de prospecção de espécies de *Penicillium* de solos de áreas de Mata Atlântica, ainda são escassos.

No Brasil, Souza-Motta et al., (2003) avaliando a diversidade de fungos presentes na rizosfera de girassol (*Helianthus annuus* L.), prospectaram e identificaram 49 espécies de fungos filamentosos. Dentre os gêneros encontrados, *Penicillium* foi o mais representativo, com nove espécies: *P. citreonigrum*, *P. fellutanum*, *P. janthinellum*, *P. oxalicum*, *P. restrictum*, *P.*

variabile, *P. verruculosum*, *P. vinaceum* e *P. waksmanii*. De acordo com os autores, o gênero *Penicillium* foi o mais frequente na rizosfera de girassol (*Helianthus annuus* L.) da área analisada. Posteriormente, na Turquia, Asan (2004) publicou um novo levantamento de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* reportadas no País e isoladas de diferentes substratos. De acordo com o autor, *Penicillium chrysogenum* foi a espécie mais comum dentre os trabalhos publicados por pesquisadores da Turquia.

Estudando a diversidade de espécies de Trichocomaceae no solo seco e no solo da mata da Reserva Natural Katandra, na Austrália, Markovina *et al.*, (2005) observaram maior diversidade de espécies do gênero *Penicillium* em relação ao gênero *Aspergillus*. O solo seco apresentou uma maior diversidade de espécies de *Penicillium*, em relação ao solo da mata.

No Brasil, na região de Xingó, Cavalcanti *et al.*, (2006) avaliaram a diversidade de fungos filamentosos do solo de municípios da região e observaram que os dois gêneros mais representativos foram *Penicillium* e *Aspergillus* com 31 e 17 espécies, respectivamente.

Gomez *et al.*, (2007) avaliaram a diversidade de fungos presentes em solos da Argentina impactados pelo desmatamento da vegetação nativa para a realização de diferentes manejos. Dentre os gêneros isolados, *Penicillium* e *Aspergillus* foram os mais representativos, ocorrendo em todas as coletas. Do gênero *Penicillium* apenas a espécie *P. purpurogenum* foi identificada. De acordo com os autores a predominância de espécies de *Penicillium* pode estar relacionada com o antagonismo deste gênero sobre as espécies fitopatogênicas e pela sua baixa exigência nutricional.

Avaliando as comunidades de fungos filamentosos presentes em solo da tundra ártica Kurek *et al.*, (2007) isolaram e identificaram 17 gêneros. Destes, a maioria das espécies pertenciam aos gêneros *Chrysosporium*, *Mortierella*, *Penicillium* e *Phialophora*. Do gênero *Penicillium* foram isolados e identificados *P. lanosum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. verrucosum*, *P. cyclopium* e *P. islandicum*. De acordo com os autores, alguns isolados pertencentes a algumas espécies de *Penicillium* podem ser considerados psicrófilos. Prade (2007) avaliou a diversidade de fungos do solo de ambientes ripários com diferentes formas de manejo no Rio Grande do Sul, Brasil. O autor isolou e identificou 28 espécies de fungos. Do gênero *Penicillium* foram identificadas *P. citrinum* e *P. digitatum*, sendo *P. citrinum* a espécie mais abundante.

Grishkan *et al.*, (2008) avaliaram as comunidades de fungos presentes em solos cultivados e não cultivados da Alta Galiléia, em Israel. De acordo com os autores, *P. simplicissimum* foi dominante em ambos os solos e concluíram que a atividade agrícola

prolongada na região pode diminuir a diversidade de fungos. Asan *et al.*, (2010) isolaram fungos filamentosos de solos na cidade de Luleburgaz, na província turca de Kirklareli. *Penicillium* foi o gênero com maior riqueza de espécies (15), sendo *P. citrinum* a espécie mais abundante nas amostras avaliadas.

No município de Petrolina, Estado de Pernambuco, Coutinho *et al.*, (2010) isolaram fungos filamentosos da rizosfera de meloeiros (*Cucumis melo* L. cv. Gold Mine) cultivados em solos ricos em compostos orgânicos. Os autores identificaram 78 espécies, sendo os gêneros mais abundantes *Aspergillus* e *Penicillium*, com 15 e 13 espécies, respectivamente. Foram identificados *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. decumbens*, *P. dierckxii*, *P. griseofulvum*, *P. janthinellum*, *P. pinophilum*, *P. waksmanii*, *P. restrictum*, *P. solitum* var. *crustosum*, *P. spinulosum* e *P. vinaceum*.

Em 2010, Fraga e colaboradores avaliaram a diversidade de espécies da família *Trichocomaceae* presentes em solos de dois sistemas florestais (*Pinus* e *Corymbia*) situados na cidade de Seropédica, no estado do Rio de Janeiro. Os autores prospectaram 190 isolados, distribuídos em 54 espécies. *Penicillium* foi o gênero mais representativo com 32 espécies, tanto para a área de *Pinus* quanto para a área de *Corymbia*. *P. decumbens* foi a espécie mais abundante, identificada em todas as amostragens nas diferentes condições de temperatura e umidade, independente da cobertura vegetal (Fraga *et al.*, 2010). Ainda em 2010, Fraga e colaboradores avaliaram a comunidade de fungos do solo de uma duna localizada na Restinga da Marambaia, no Rio de Janeiro, Brasil. Os gêneros mais frequentes foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*. Do gênero *Penicillium*, foram identificadas *P. arenicola*, *P. corylophilum*, *P. decumbens*, *P. echinulatum*, *P. javanicum*, *P. miczynskii*, *P. paxilli*, *P. purpurogenum*, *P. sclerotiorum* e *P. simplicissimum*. De acordo com os autores, duas espécies pertencentes a este gênero não foram puderem ser identificadas com base na morfologia (Fraga *et al.*, 2010b).

Fraga *et al.*, (2012) avaliaram a diversidade, bem como a sucessão de *Trichocomaceae* em áreas de Mata Atlântica com diferentes níveis de antropização, situadas no Parque Natural Municipal do Curió, Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil. As áreas foram classificadas pelos autores como área mais impactada e área menos impactada. Foram isoladas 87 amostras de fungos, distribuídos em quatro gêneros e 22 espécies. Do gênero *Penicillium* foram identificadas 16 espécies, sendo este o gênero mais representativo nas duas áreas estudadas.

Em 2013, Cruz e colaboradores avaliaram a comunidade de *Penicillium* presentes em solos de remanescente de Mata Atlântica, situada na capital de Pernambuco, Brasil, durante as

estações chuvosa e seca. Os autores obtiveram 445 isolados, distribuídos em 17 espécies. Na estação seca, houve maior riqueza de espécies, quando comparada à estação chuvosa. De acordo com os autores, espécies de *Penicillium* se adaptam bem à baixa disponibilidade de água de baixo do solo (Cruz *et al.*, 2013a).

Embora o solo seja o habitat natural dessas espécies, elas podem ser encontradas em todos os ecossistemas (Pitt, 1991). Além da elevada importância ecológica, muitas espécies apresentam potencial biotecnológico, por produzirem metabólitos de interesse industrial (Cruz *et al.*, 2013b). Por outro lado, algumas estirpes pertencentes a algumas espécies, podem produzir metabólitos tóxicos, denominados micotoxinas (Pitt, 1991).

2.10 MICOTOXINAS PRODUZIDAS POR ESPÉCIES DE *PENICILLIUM* E DE *TALAROMYCES*

Produtos do metabolismo secundário de algumas espécies de fungos, as micotoxinas podem atuar diretamente na proteção dos fungos que as produzem contra fatores ambientais e bióticos adversos (Frisvad *et al.*, 2005; Abunhosa, 2008; Pleadin *et al.*, 2017). Trata-se de compostos que apresentam baixo peso molecular, podendo apresentar nefrotoxicidade (Culig *et al.*, 2017), além de potencial carcinogênico a humanos e a outros animais (Hoeltz *et al.*, 2009). São produzidas a partir das vias metabólicas dos policetídeos, dos terpenoides e de alguns processos que usam aminoácidos essenciais. Sua estrutura molecular varia desde um anel heterocíclico até oito anéis associados, o que está relacionado com a diversidade de efeitos tóxicos (Abrunhosa, 2008; Abrunhosa *et al.*, 2010).

A quantidade de micotoxinas necessária para ocasionar efeitos adversos para a saúde varia amplamente entre toxinas, bem como para cada animal ou sistema imunológico do humano contaminado. Para compreender os efeitos negativos das micotoxinas em saúde humana dois conceitos são necessários: toxicidade aguda, definida como o início rápido de um efeito adverso de uma exposição única; e a toxicidade crônica, que significa o lento ou atrasado início de um efeito adverso, geralmente de múltiplas exposições de longo prazo. As micotoxinas podem ser agudas ou cronicamente tóxicas, ou ambas, dependendo do tipo de toxina e da dose. A incorporação de micotoxinas em estruturas de membrana leva a alterações nas funções da mesma. Em geral, os efeitos das micotoxinas no DNA, RNA, síntese protéica e ação pró-apoptótica ocasionam mudanças em funções fisiológicas, tais como no crescimento, no desenvolvimento e na reprodução do ser (Surai *et al.*, 2008).

Muitas espécies de *Penicillium* são reconhecidas como micotoxigênicas, apresentando efeito maléfico aos homens e a outros animais. A maioria das micotoxinas deste gênero foi isolada de produtos agrícolas, tais como milho, soja, uva, damasco, maçã, pêssigo e em produtos industrializados derivados de frutas (Frisvad *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2010). A detecção de algumas toxinas produzidas por linhagens de *Penicillium* tem sido aplicada durante a identificação, para torná-la mais robusta, compondo assim uma abordagem polifásica. Dentre as micotoxinas produzidas por espécies de *Penicillium* e utilizadas na caracterização e identificação dessas espécies, destacam-se a citrinina (CIT), a ocratoxina A (OTA), a patulina (PAT), o ácido penicílico (CPA) e o ácido ciclopiazônico (PCA) (Frisvad *et al.*, 2004).

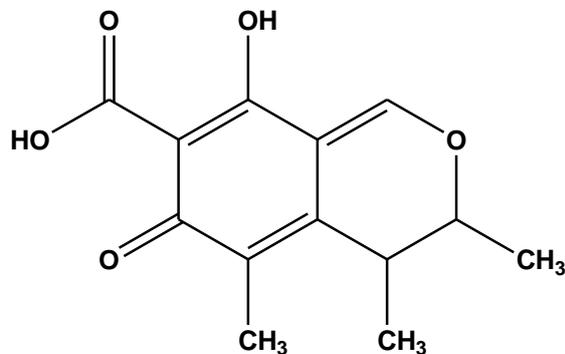
A citrinina (Figura 6) é um policetídeo, reconhecido por causar a nefropatia micotóxica, um tipo de distúrbio renal. Além de sua nefrotoxicidade, que foi comprovada por vários estudos, também há provas de que a citrinina está envolvida na indução da apoptose através do estresse oxidativo, embora o mecanismo de regulamentação preciso ainda não seja compreendido (Calug *et al.*, 2017).

Fungos produtores de citrinina geralmente contaminam cereais ou plantas fibrosas, mantidos em armazém com o aumento da umidade (Stoev *et al.*, 2010; Zadravec *et al.*, 2017). Trata-se de uma micotoxina originalmente isolada em 1931 por Hetherington e Raistrick, a partir de uma cultura de *Penicillium citrinum*. Apresenta peso molecular de 250,25 Da, e fórmula empírica C₁₃H₁₄O₅. Além de *Penicillium citrinum*, outras espécies de *Penicillium*, como *P. expansum* e *P. verrucosum*, e até mesmo de *Aspergillus* e de *Monascus*, mostraram-se capazes de produzir esta toxina (Frisvad *et al.*, 2004; 2005; Bovdisova *et al.*, 2016; Touhami *et al.*, 2018). Do gênero *Aspergillus*, *A. awentil*, *A. ostianus*, *A. fumigatus*, *A. niveus*, *A. awamori* e *A. parasiticus* foram relatadas como produtoras.

A citrinina é geralmente formada após a colheita em condições de armazenamento e ocorre principalmente em grãos armazenados, embora também possa ocorrer em outros produtos de origem vegetal, como feijões, frutas, sucos de frutas e vegetais, ervas e especiarias, além de produtos lácteos (Bovdisova *et al.*, 2016; Sánchez *et al.*, 2017). O armazenamento de produtos agrícolas sempre foi um desafio pois geralmente são contaminados com uma variedade de fungos e pragas. Consequentemente, a distribuição de micotoxinas em muitos produtos agrícolas é heterogênea. Portanto, é importante que algumas dessas toxinas, como as citrinas e suas implicações para a saúde, sejam adequadamente compreendidas com o objetivo de desenvolver medidas preventivas e de controle adequadas contra a contaminação de alimentos (Bovdisova *et al.*, 2016). Os fungos que produzem citrinina são os principais

produtores de outras micotoxinas incluindo ocratoxina A e aflatoxinas em grãos. Conseqüentemente, a co-ocorrência de citrinina com ocratoxina A e aflatoxina B é comum em grãos, particularmente em arroz. A ocorrência simultânea da toxina com patulina em sucos de maçã e compotas de maçã foi relatada (Doughari, 2015). Ostry *et al.*, (2013) também relataram a ocorrência de citrinina em uma variedade de gêneros alimentícios de origem vegetal, por exemplo, cereais e produtos de cereais, arroz, maçãs, sucos de frutas, azeitonas pretas, nozes assadas (amêndoas, amendoim, avelãs, nozes de pistache, sementes de girassol, especiarias (por exemplo, açafrão, coentro, erva, pimenta preta, cardamomo e cominho).

Figura 6 - Estrutura química da citrinina (CIT).



A ocratoxina A (OTA) (Figura 7) é uma β -fenilalanina ligada a uma isocumarina (dihidroisocumarina), reconhecida pelo seu potencial nefrotóxico, além de apresentar potencial cancerígeno. Pertence ao grupo que possui oito tipos diferentes de metabólitos aos quais lhe são dados o nome genérico de ocratoxinas, sendo: a ocratoxina A, a ocrtaoxina B, a ocratoxina α , a ocrtaoxina β , a (4*R*)- e (4*S*)-4-Hidroxi-ocratoxina A, ocratoxina B, e a ocratoxina C (Sharma; Salunkhe, 1991). Foram isolados a partir de *Aspergillus ochraceus* e, mais tarde, isolados a partir de outras espécies. No gênero *Aspergillus* 20 espécies da seção Circumdati, sete da seção Nigri e duas da seção Flavi, são reconhecidas como produtoras de OTA (Perrone *et al.*, 2017).

Algumas espécies de *Penicillium* foram reconhecidas como potenciais produtoras de OTA (Tabela 02), porém, *Penicillium verrucosum* e *P. nordicum* são as mais conhecidas. *Penicillium verrucosum* é quase exclusivamente responsável pela ocorrência de ocratoxina A em cereais e produtos derivados de cereais (Lund e Frisvad 2003; Limay-Rios *et al.*, 2017). Por outro lado, *P. nordicum* é um contaminante comum de alimentos proteicos ricos em sal, como salame e presunto. Ambas as espécies são taxonomicamente muito semelhantes e considerados

as duas maiores produtoras de OTA em climas temperados. Segundo Perrone et al., (2017), embora alguns trabalhos tenham relatado a produção de OTA por outras espécies de *Penicillium* e de *Talaromyces*, apenas *P. verrucosum*, *P. nordicum* e, mais recentemente, *P. thymicola*, são capazes de produzir OTA. De acordo com os referidos autores, para afirmar a produção de OTA por uma espécie, é necessário cumprir algumas etapas:

1. Deve assegurar-se que o isolado é uma cultura pura, por exemplo, através de cultura monospórica ou realizando suspensão de esporos em meio de ágar;
2. O meio de cultura adequada e as condições de incubação devem ser usadas para a produção de micotoxinas;
3. Deve garantir-se que o isolado esteja devidamente identificado. Muitas vezes, a sua sequência não é suficiente para identificação adequada;
4. O isolado deve ser preservado em uma, ou preferencialmente duas coleções de Culturas Internacionais, garantindo a identidade e a pureza da amostra, além do acesso à mesma por outros pesquisadores;
5. A presença da toxina deve ser confirmada por pelo menos três métodos diferentes, utilizando o padrão adequado. Isto é especialmente importante quando novos registros estão sendo fornecidos na produção inesperada de micotoxinas por espécies que não foram relatadas para produzi-las anteriormente;
6. A presença de precursores biossintéticos ou produtos relacionados à biosíntese ajudará a confirmar a presença de micotoxina. No caso da OTA, a presença de ocratoxina B, ajudará a confirmar a probabilidade de que a OTA possa ser produzida;
7. Frequentemente, espécies filogeneticamente estreitamente relacionadas produzem uma micotoxina dada, então se uma micotoxina é relatada por uma espécie não relacionada com os produtores já conhecidos, deve-se ter extremo cuidado para confirmar que é realmente um novo registro sobre um novo produtor;
8. Sempre que possível e quando conhecido, verifique a presença e expressão de aglomerados de genes envolvidos na via biossintética das micotoxinas.

A produção de micotoxinas geralmente ocorre em resposta à estresses ambientais, tais como alterações no pH, temperatura, atividade de água ou luz (Khoury e Atoui, 2010).

De acordo com Paterson e Lima (2010), as condições climáticas de um país geralmente determinam, em grande parte, as classes de fungos que irão crescer e os tipos de micotoxinas que podem produzir. No Brasil, existem condições propícias para o crescimento de fungos

micotoxigênicos (Maziero e Bersot, 2010). A OTA já foi relatada tanto em países de climas temperados, quanto em tropicais principalmente sobre cereais e seus produtos, com destaque para o milho e o trigo. No entanto, também é encontrado em uma variedade de alimentos e bebidas comuns, incluindo pão, cerveja, chocolate, café, frutas secas, suco de uva, carne de porco, aves e vinho, entre outros (Welke e Noll, 2009; Cabañes *et al.*, 2010).

De todos os compostos do grupo das ocratoxinas, a OTA é o mais tóxico, sendo um contaminante frequente de cereais estocados. Apresenta peso molecular de 403,81 Da e fórmula empírica $C_{20}H_{18}O_6NCl$, sendo considerada citotóxica, nefrotóxica, carcinogênica, teratogênica e imunossupressora, apresentando efeitos tóxicos como danos ao DNA, inibindo síntese proteica, induzindo a peroxidação de lipídios e causando estresse oxidativo (Abrunhosa, 2008). De acordo com Brown *et al.*, 2007, esta micotoxina foi associada à nefropatia endêmica dos Balcãs, nos quais foi observada redução progressiva das funções renais. Ainda de acordo com os autores, a OTA tem demonstrado efeitos carcinogênicos em animais. Após comprovação da carcinogenicidade em animais, a OTA foi classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) no grupo 2B, ou seja, como possivelmente carcinogênica para humanos (IARC, 1993). A OTA foi encontrada em sangue humano em todos os países onde foi investigada, frequentemente em alta incidência, como, por exemplo, em Portugal (Lino *et al.*, 2008) e na Tunísia (Hassen *et al.*, 2004).

Além da carcinogenicidade, foram evidenciados outros graves efeitos em animais, tais como mutagênicos (Palma *et al.*, 2007), teratogênicos (Balasaheb *et al.*, 2007), imunossupressores (Rossiello *et al.*, 2008), genotóxicos (Tozlovanu *et al.*, 2006) e neurotóxicos (Sava *et al.*, 2006).

Assim como a patulina a OTA é um metabolito termotolerante.

Figura 7 - Estrutura química da ocratoxina A (OTA).

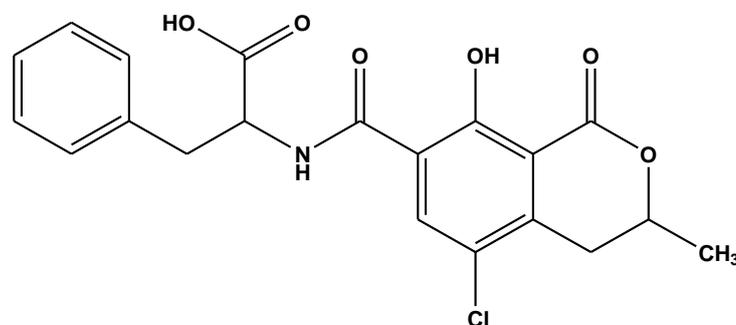


Tabela 2 - Espécies de *Penicillium* relatadas como produtoras de Ocratoxina A (OTA).

Espécie produtora	Referências
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	Ciegler et al., 1972
<i>Penicillium commune</i> Thom	Scott et al., 1972
<i>Penicillium cyclopium</i>	Turner and Aldridge, 1983
<i>P. funiculosum</i> (<i>Talaromyces funiculosus</i>)	Betina, 1989
<i>Penicillium palitans</i> Westling (<i>P. commune</i> Thom)	Betina, 1989
<i>P. pinophilum</i> (<i>Talaromyces pinophilus</i>)	Perrone et al., 2017
<i>P. purpurencens</i>	Betina, 1989
<i>P. purpurogenum</i> (= <i>T. purpurogenous</i>)	Perrone et al., 2017
<i>P. radiucm</i> = (<i>T. radicus</i>)	Betina, 1989
<i>P. rugulosum</i> = (<i>T. rugulosus</i>)	Perrone et al., 2017
<i>Penicillium thymicola</i>	Perrone et al., 2017
<i>P. variabile</i> Sopp = (<i>T. wortmanii</i>)	Perrone et al., 2017
<i>P. verrucosum</i> chemotype I, II (= <i>P. viridicatum</i> Westling)	Nguyen et al., 2017
<i>P. verruculosum</i> Peyronel = (<i>T. verruculosus</i>)	Betina, 1989; Perrone et al., 2017
<i>P. viridicatum</i> Westling	Frisvad and Thrane, 1993; Frisvad & Samson., 2004; Limay-Rios et al., 2017

A patulina (Figura 8) é um metabólito secundário produzido por diversas espécies de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Gymnoascus* e *Paecilomyces*. *Penicillium expansum* é reconhecido como o maior produtor desta micotoxina (Celli *et al.*, 2009; Torovic *et al.*, 2017). *P. expansum* é uma espécie comum em solo (Çolakoğlu 2002; Demirel *et al.*, 2013) e até mesmo no ar interior (Gutarowska *et al.*, 2012). Além disso, essa espécie pode infestar uma ampla gama de produtos agrícolas no campo, durante a colheita, no armazenamento e durante a processamento (Siddique 2012). Maçãs, uvas, peras, cerejas, pêssegos, ameixas, feijão, amendoim) e grãos de cereais (como milho, cevada, soja, e sorgo) são considerados altamente favoráveis para a colonização de *P. expansum* (Frank *et al.*, 1977; Machinski Jr e Mídio, 1996; Tangni *et al.*, 2003). Além disso, essa espécie pode crescer em substratos não consumíveis, tais como materiais de construção contendo celulose,

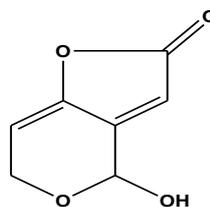
especialmente papel de parede, drywall (Gutarowska *et al.*, 2012) e blocos de madeira úmida (Land and Hult, 1987).

Segundo Ji *et al.*, (2017), níveis altos de patulina já foram encontrados em produtos industrializados, como em sucos de uva e de maçã, além de produtos à base de maçãs para as crianças.

Pertencente à classe hidroxifuropiranona, também conhecida como clavicina, claviformina ou expansina, apresenta fórmula empírica $C_7H_6O_4$, cujo peso molecular é de 154,12. Este metabólito apresenta efeitos tóxicos agudos e crônicos. Os efeitos agudos da patulina incluem agitação, convulsões, e inflamação intestinal (Zaied *et al.*, 2013; Hammami *et al.*, 2017). De acordo com Yang *et al.*, (2017), a patulina foi referenciada como capaz de causar danos graves em vários sistemas de órgãos como rim, tecido intestinal e sistema imunológico. Além disso, foi classificado como um agente genotóxico (Glaser e Stopper 2012; Sarubbi *et al.*, 2016) e relatada por muitos autores como promotor de efeitos mutagênicos (Kirsch, 1990; Sarubbi *et al.*, 2016), carcinogênicos (Becci *et al.*, 1981; Sarubbi *et al.*, 2016), neurológicos (Turovic *et al.*, 2017; Sarubbi *et al.*, 2016) e teratogênicos (Ciegler *et al.*, 1976; Smith *et al.*, 1993; Sarubbi *et al.*, 2016). Considerando a toxicidade aguda e potencialmente prejudicial efeitos genotóxicos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) fez uma recomendação de que o nível máximo permitido de patulina no suco de maçã é de 50 $\mu\text{g/L}$ (WHO, 2003), que foi adotado pela China. Recomenda-se a Comissão Europeia (CE) que o limite máximo de patulina em alimentos para bebês e lactentes fórmula seja 10 $\mu\text{g/kg}$ (EC 2003).

De acordo com Bullerman (1985), os principais fatores responsáveis pelo crescimento do *Penicillium expansum*, bem como pela sua produção de patulina em frutas são a atividade de água superior a 0,82 e temperatura entre 20 a 25°C. Em 1995, o Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), da Organização Mundial da Saúde (WHO) e da Organização de Alimentos e Agricultura (FAO), alterou a Ingestão Semanal Tolerável Provisória (PTWI) de 7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo/semana de patulina para uma Ingestão Diária Tolerável Máxima Provisória (PMTDI) de 0,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo/dia (WHO, 1995).

Figura 8 - Estrutura química da patulina (PAT).

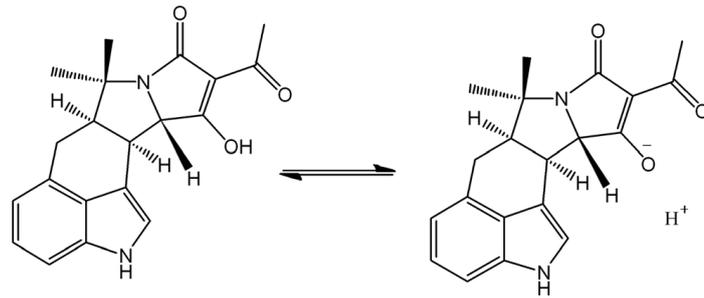


Outra relevante micotoxina produzida por algumas espécies de *Penicillium* é o ácido ciclopiazônico que apresenta fórmula química C₈H₁₀O₄ (Figura 9) e peso molecular 170,16 g/mol.

De acordo com Holzapfel (1967) é uma micotoxina produzida principalmente por *P. cyclopium* Westling. Trata-se de uma espécie com distribuição mundial e é frequentemente isolada de grãos armazenados e produtos de cereais. Holzapfel (1967) isolou vários espécimens desta espécie, a partir de amostras de produtos domésticos de cereais, causaram toxicosas agudas em patos e ratos. O autor utilizou farinha de milho como meio de cultura para o *P. cyclopium* no intuito de identificar o composto que causava efeitos tóxicos aos patos e ratos. Após extração o novo composto foi identificado como Ácido Ciclopiazônico (α -CPA). Trata-se de um ácido indol tetramico, com peso molecular de 336,38 (Figura 07). Esse ácido é produzido por algumas espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* isoladas de vários produtos agrícolas (Sosa *et al.*, 2003). Algumas espécies aflatoxigênicas, como *Aspergillus flavus* Link, produzem também CPA (Maragos *et al.*, 2017). Além de *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* e *A. phoenicis* já foram identificadas como produtoras (Vinokurova *et al.*, 2007). A toxina foi encontrada como um contaminante natural em queijos, figos, milho, arroz, amendoim, milheto e alimentos (Lansden e Davidson 1983; Rao e Husain 1985; Urano *et al.*, 1992; Burdock e Flamm 2000; Hayashi e Yoshizawa 2005; Heperkan *et al.*, 2012). No Brasil, além de amendoim (Zorzete *et al.*, 2012; 2013), há relatos de CPA em produtos derivados de tomates e em leite comercial, coletados no estado de São Paulo (Motta e Soares, 2000; 2001; Oliveira *et al.*, 2006).

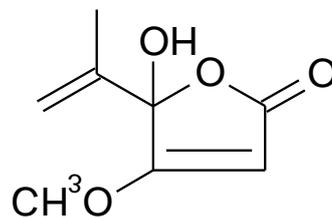
Segundo Maragos *et al.* (2017), animais quando alimentados com α -CPA, apresentaram perda de peso, diarreia, pirexia, desidratação, ataxia, imobilidade e, finalmente, espasmo na morte (Richard e Payne, 2003). Segundo Miller *et al.* (2011), perus e galinhas podem ser afetados por α -CPA. Acredita-se que a toxicidade de α -CPA é ocasionado pela interrupção da homeostase do cálcio (Riley *et al.*, 1995). A toxina está disponível comercialmente como um inibidor do retículo sarcoplásmico Ca²⁺ -ATPase (Maragos *et al.*, 2017).

Figura 9 - Ácido Ciclopiazônico (α -CPA).



Além do ácido ciclopiazônico, outra importante micotoxina é o ácido penicílico (CPA) ou ácido 3-metoxi-5-metil-4-oxi-2,5-hexadienoico (Figura 10) (Diniz, 2015). Trata-se de um composto isolado no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América por Alsberg e Black em 1913, a partir de milho infectado por *Penicillium puberulum*. Posteriormente foi reconhecido como produzido por outras espécies de *Penicillium* e por *Aspergillus ochraceus*. É considerada uma micotoxina potencialmente caarcinogênica, citotóxica e hepatotóxica, embora também apresente elevado potencial antimicrobiano. O ácido penicílico, cuja estrutura é apresentada na Figura 10, tem propriedades biológicas similares às da patulina. É produzido por um grande número de fungos, incluindo os do gênero *Penicillium* (*P. puberulum*, por exemplo), assim como por *Aspergillus ochraceus*. Um dos maiores produtores dessa toxina é o *P. aurantiogriseum*. Essa micotoxina tem sido encontrada no milho, feijão e outros produtos agrícolas, além de ter sido produzida experimentalmente em queijo suíço (Diniz, 2005). É uma micotoxina comprovadamente carcinogênica (Diniz, 2007; Diniz, 2015).

Figura 10 - Ácido Penicílico (CPA).



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado em área agrícola da Usina Trapiche (8° 35' 21" S, 35° 6' 55" W), situada no município de Sirinhaém, Litoral Sul de Pernambuco, em solo classificado como Latossolo Amarelo coeso distrófico, textura argilosa/muito argilosa (Saldanha et al., 2007). Segundo o sistema de Köppen, predominam na área o clima Ams', tropical chuvoso de monção com verão seco, com precipitação pluvial média anual da ordem de 2.295,5 mm (Koffler *et al.*, 1986). A usina tem como prática a aplicação de vinhaça em solos que estão em pousio (descanso), para elevar a fertilidade dos mesmos.

3.2 COLETAS E ISOLAMENTO DE ESPÉCIES DE *PENICILLIUM* E DE *TALAROMYCES* PRESENTES EM SOLOS DE CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR, NO MUNICÍPIO DE SIRINHAÉM, PERNAMBUCO, BRASIL

Foram realizadas seis coletas de amostras de solo, em áreas cultivadas e em áreas em pousio (sem cana plantada). As coletas foram realizadas nos meses de novembro e dezembro de 2014, janeiro, abril, maio e junho de 2015. Para cada área, as amostras de solo foram coletadas dentro de três transectos de 4x25 m, na profundidade de 0-20 cm, perfazendo um total de três amostras por área estudada. Em seguida, foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados, mantidas à temperatura ambiente e transportadas para o Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e Biocontroladores do Departamento de Micologia, do Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), para manipulação.

3.3 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DO SOLO

As análises de pH, teores disponíveis de Al, Ca, Mg, K, Na, P, acidez ativa (H), C e de matéria orgânica, foram realizadas pelo Instituto de Pesquisas Agropecuárias de Pernambuco - IPA.

3.4 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS CULTURAS DE *PENICILLIUM* E DE *TALAROMYCES*

O isolamento das culturas dos fungos em estudo foi procedido de acordo com o método de suspensão, proposto por Clark (1965). Todas as 36 amostras de solo compostas foram suspensas em água destilada esterilizada e diluições sucessivas foram realizadas. Foram obtidas

suspensões na concentração de 1:1000 g·mL⁻¹. Cada uma das amostras de solo em suspensão aquosa composta foi inoculada em 5 diferentes placas de Petri contendo ágar Sabouraud suplementado com 50 mg·L⁻¹ de Cloranfenicol (SA-C), e 5 placas de Petri contendo ágar Dicloran com Rosa de Bengala suplementado com 50 mg L⁻¹ de Cloranfenicol (DRB-C). No total, 360 placas de Petri foram inoculadas e mantidas a 28 °C (± 2 °C) durante 72 h (Cruz *et al.*, 2013).

Após a purificação dos isoaldos, fragmentos das colônias de fungos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura ágar Sabouraud suplementado com Cloranfenicol. Após a confirmação da pureza, as culturas foram mantidas em meio Ágar Extrato de Malte (MEA) a 25 °C (± 2 °C).

3.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Para análise morfológica, os isolados foram cultivados em três pontos ágar Czapek levedura (CYA), ágar extrato de malte (MEA) e 25% ágar glicerol (G25N). A incubação ocorreu a 5°C, 25°C e 37°C para CYA e a 25°C para MEA e G25N. Para a identificação das espécies foram observadas características macroscópicas e microscópicas (Pitt, 1991; Samson e Frisvad, 2004). Um representante de cada espécie obtida foi incorporado ao acervo da Coleção de Culturas - Micoteca URM (WDCM604), do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco.

3.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES

Para análise molecular, os isolados de *Penicillium* e *Talaromyces* que apresentaram divergência morfológica e identificação inconclusiva (47 isolados), foram cultivados em Ágar Extrato de Malte (MEA) à 25 °C por 7 dias para posterior identificação molecular. A extração de DNA genômico foi realizada utilizando o UltraClean Microbial DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA) seguindo as recomendações do fabricante.

A região gênica β -tubulin (BenA) foi amplificada para todos os isolados utilizando os primers Bt2a e Bt2b (Glass e Donaldson, 1995) e as condições de PCR descritas por Visagie *et al.* (2014). Os produtos de PCR foram purificados utilizando a enzima Exosap illustra™ ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences) e sequenciados na plataforma de sequenciamento do LABCEN/CCB na Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brazil). Os eletroferogramas foram analisados utilizando o software BioEdit (Hall, 2014) a

partir do qual obteve-se as sequências de nucleotídeos consenso. Todas as sequências obtidas foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (MG452803 até MG452849).

Para a análise filogenética, as sequências de BenA obtidas foram adicionadas a um conjunto de sequências de referência ou quando possível, dos tipos das espécies de *Penicillium* e *Talaromyces*, obtidas no Genbank e alinhadas no programa ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) implementado no MEGA v. 7 (Kumar *et al.*, 2015).

Os alinhamentos gerados foram depositados no TreeBASE (<http://www.treebase.org/>) sob o número de acesso S21877.

As análises filogenéticas foram realizadas por Inferência Bayesiana no programa Mr. Bayes v.3.2.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) implementado na plataforma online CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010). Os modelos de substituição de nucleotídeos foram buscados através do Mr. MODELTEST 2.3 (Posada & Buckley, 2004), sendo estimados separadamente para cada alinhamento e selecionados de acordo com Akaike Information Criterion (AIC). O modelo GTR+I+G foi selecionado para *Penicillium* e HKY+I+G para *Talaromyces*. Quatro cadeias MCMC foram iniciadas simultaneamente até 10 milhões de gerações, sendo amostrada uma árvore a cada 1000 gerações. Das 10 mil árvores amostradas, 25% foram descartadas da análise e os valores de probabilidade posterior (Rannala e Yang, 1996) foram determinados da árvore consenso através das 7500 árvores remanescentes. A árvore resultante foi visualizada e editada no software FigTree (Rambaut, 2009) e em seguida exportada para programas gráficos.

3.7 ANÁLISES ECOLÓGICAS DA COMUNIDADE DE *PENICILLIUM* E DE *TALAROMYCES* ENCONTRADAS

A análise estatística da diversidade de espécies dos gêneros avaliados, presentes em solos de áreas de cultivo de cana-de-açúcar, foi realizada utilizando o índice de Shannon. A equitabilidade quantificada através do índice de Pielou (Pinto-Coelho, 2002). A abundância foi calculada de acordo com Magurran (1988) e a dominância relativa foi estabelecida pela equação $DA = NA / NA + NB + NC \dots NN \times 100$, onde DA significa dominância das espécies, e NA + NB + NC ... NN significa o número de indivíduos de espécies A, B, C... N. Foram consideradas dominantes as espécies cujos percentuais forem superiores a 50 % (Magurran, 1988). Frequência das espécies durante o estudo foi calculada pela equação $FA = PA / P \times 100$, onde F significa frequência de espécies A; PA significa o número de amostras em que a espécie A

está presente e P significa o número total de amostras. De acordo com Magurran (1988), $F \geq 50\%$ = espécies constantes, $10\% < 49\% F \leq$ = espécies comuns e $F \leq 10\%$ = espécies raras.

A similaridade-dissimilaridade de espécies de *Penicillium*, bem como de *Talaromyces* entre as áreas cultivadas e em pousio foi testada com base na distância de Bray-Curtis que varia de 0 (similaridade) a 1 (dissimilaridade), utilizando-se a matriz de densidade das espécies (Pinto-Coelho, 2002). A análise foi realizada entre as coletas. O método de ligação do dendrograma foi o do peso proporcional (WPGMA – Weight Pair Group Mathematical Average) (Rohlf e Fisher, 1968). Estes cálculos foram realizados utilizando o programa computacional NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) da Exeter Software – USA (Rohlf, 1993).

3.8 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS PELAS ESPÉCIES DE *PENICILLIUM* E DE *TALAROMYCES* ATRAVÉ DE CROMATOGRAFIA LIQUÍDA DE ULTRA PERFORMANCE ACQUITY UPLC M-CLASS

Um representante de cada espécie isolado foi analisado quanto a produção de Ocratoxina A (OTA), Patulina (PAT), Citrinina (CIT), Ácido Ciclopiazônico (CPA) e Ácido Penicílico (APA), em meio Ágar Extrato de Malte (malte 20 g·L⁻¹, glicose 20 g·L⁻¹, peptona 1 g·L⁻¹, agar 20 g·L⁻¹). Os isolados foram inoculados em placas de 6 cm de diâmetro e incubados a 25° C por 7 dias, no escuro. Após o crescimento, de cada colônia foram removidos 7 discos de 5 mm e colocados em frascos de vidro borosilicato âmbar de 4 mL e adicionados 2 mL de metanol. Em seguida, Os frascos foram vigorosamente misturados em vortex e colocados em banho de ultrasons (Sonicor) durante 60 minutos para melhorar a extração das micotoxinas. Após esse período, os extratos foram filtrados através de filtros de seringa de PTFE com poros de 0,45 µm (Merck) em colocado em frascos âmbar de 1 mL de vidro de borosilicato, em seguida o material foi concentrado utilizando um concentrador de amostras. As amostras foram analisadas utilizando o sistema de cromatografia líquida de ultra performance ACQUITY UPLC M-Class, (Waters Corporation), utilizando uma coluna C18 como fase estacionária e a associação de solventes como fase móvel. O sistema é acoplado a um espectrômetro de massas ACQUITY SQ Detector 2 (Waters Corporation), um single quadrupole, com o sistema de ionização por eletronspray. As análises dos dados foram realizadas pelo software Masslinx (WATERS). Os padrões das micotoxinas CIT, PAT, OTA, CPA, APA) foram obtidos da Sigma-Aldrich. As amostras foram consideradas positivas quando forem detectadas no

espectrômetro de massas, e sua concentração confirmada a partir de uma curva analítica gerada pela associação de concentrações conhecidas dos padrões de micotoxinas com o sinal detectado pelo equipamento.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DO SOLO

Os valores obtidos para as análises físico-químicas das amostras de solo estão apresentados na Tabela 01. Para a área de pousio, pode-se observar valores mais elevados de pH, teores de C, P, K e matéria orgânica além de temperaturas mais elevadas, quando comparadas à área cultivada.

Tabela 3 - Análise de fatores abióticos das amostras de solo de área Cultivada com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e de solo de área em pousio, de uma usina situada no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil.

Fatores	Área Cultivada						Área em Pousio					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Temperatura	28	29	30	30	29	30	30	30	32	32	34	33
pH	5,4	5,3	5,2	5,3	5,2	5,2	5,8	5,8	5,6	5,7	5,6	5,6
P (mg kg⁻¹)	13,0	15,0	17,0	27,0	28,0	30,0	68,0	3,0	23,0	65,0	60,0	10,0
Al (cmolc kg⁻¹)	0,15	0,20	0,25	0,15	0,23	0,15	0,0	0,0	0,0	0,05	0,0	0,05
Na (cmolc kg⁻¹)	0,50	0,25	0,20	0,18	0,20	0,23	0,04	0,04	0,08	0,03	0,04	0,05
K (cmolc kg⁻¹)	0,14	0,12	0,14	0,13	0,14	0,14	0,20	0,14	0,17	0,18	0,17	0,20
Ca (cmolc kg⁻¹)	2,0	2,70 0	2,80	2,60	2,40	2,00	2,30	3,40	0,75	0,83	0,90	3,00
Mg (cmolc dm⁻³)	1,10	1,30	1,10	1,10	1,10	1,30	0,90	0,80	0,75	0,90	0,80	0,70
H (cmolc dm⁻³)	4,71	5,11	4,10	5,20	4,20	5,30	4,90	2,25	4,80	4,70	2,45	4,60
Matéria Orgânica (%)	2,17	2,27	2,72	2,17	2,27	2,60	2,29	2,44	2,58	2,30	2,45	2,60
Carbono (%)	1,26	1,32	1,58	1,20	1,27	1,30	1,33	1,42	1,50	1,37	1,40	1,53

C1=coleta 1; C2=coleta 2; C3=coleta 3; C4=coleta 4; C5=coleta 5; C6=coleta 6.

Fonte: Próprio autor.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Ao final das seis coletas realizadas foram obtidas 1.344 UFC's, das quais 674 foram provenientes da área cultivada e 670 da área em pousio. Ao todo, 16 espécies foram prospectadas, 13 pertencentes ao gênero *Penicillium* e três ao *Talaromyces*. Onze espécies (nove de *Penicillium* e duas de *Talaromyces*) ocorreram na área cultivada, sendo sete exclusivas para área (*Penicillium javanicum*, *P. limosum*, *Penicillium* sp. 1, *Penicillium* sp. 3, *Penicillium* sp. 6, *Talaromyces muroii* e *Talaromyces* sp. 1. Na área de pousio, foram encontradas nove

espécies (oito de *Penicillium* e uma de *Talaromyces*), sendo seis restritas à área (*Penicillium paxilii*, *P. rubens*, *P. sanshaense*, *P. sp. 5* e *Talaromyces verruculosus*) (Tabela 2, Figura 11).

Tabela 4 - Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC's) de espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* por coleta, nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar e área em pousio (Mata Atlântica), de uma usina situada no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil e Dominância Relativa, de acordo com Magurran (1988).

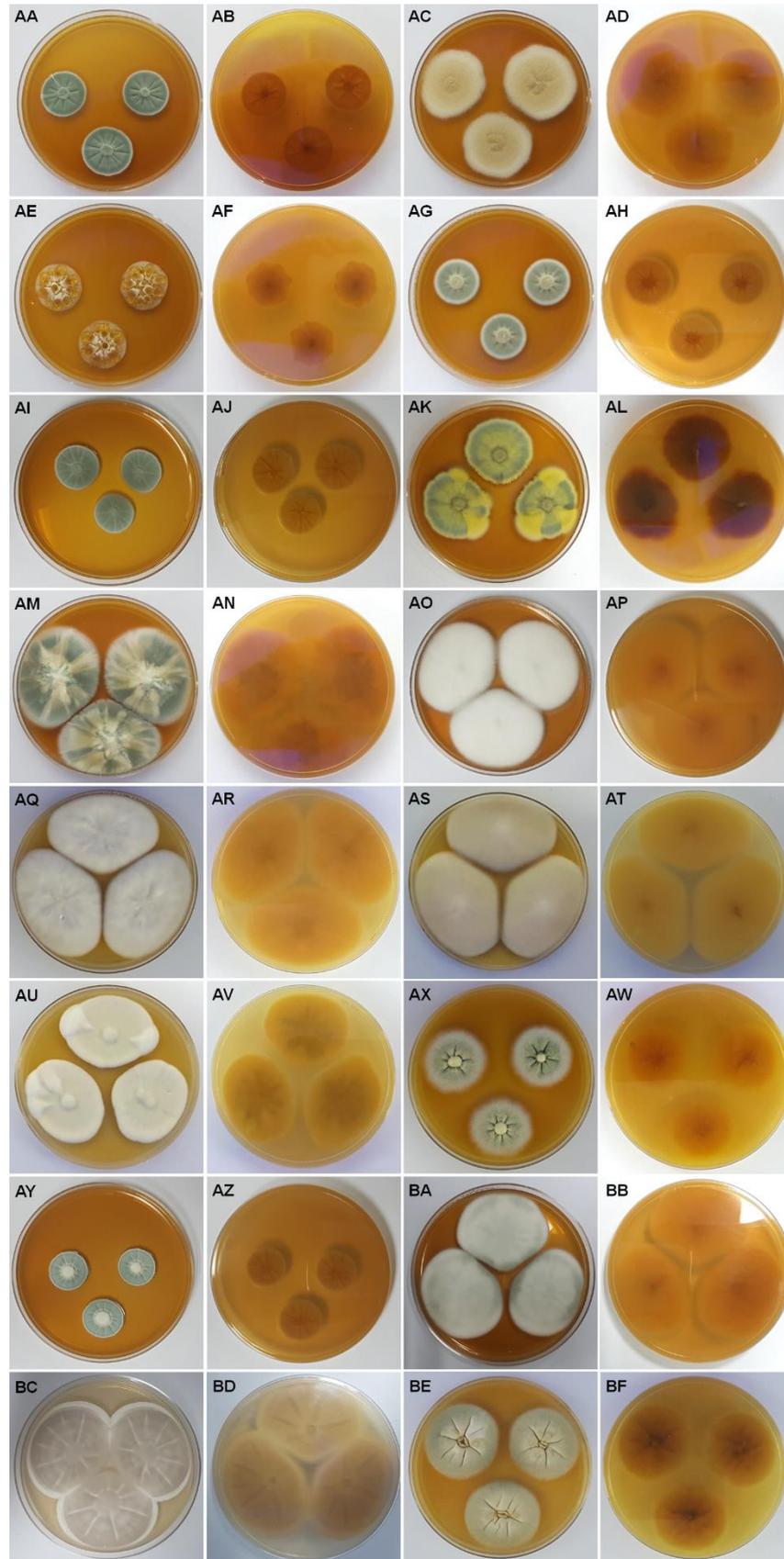
Espécie	Nº URM	Área Cultivada									Área em Pousio									TOTAL GERAL
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	T	DR (%)	FR (%)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	T	DR (%)	FR (%)	
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	7720	10	07	05	12	08	08	50	7,4	100	15	20	21	15	05	12	88	13,1	100	138
<i>P. javanicum</i> J.F.H. Beyma	7719	10	05	03	13	04	03	38	5,6	100	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	38
<i>P. limosum</i> S. Ueda	7822	13	17	25	22	25	27	129	19,1	100	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	129
<i>P. paxilli</i> Bainier	7699	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	13	15	15	6	6	5	60	9,0	100	60
<i>P. rubens</i> Biourge	7700	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	15	20	13	09	14	10	81	12,1	100	81
<i>P. sanshaense</i>	7681	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	3	5	6	7	2	1	24	3,6	100	24
<i>P. wotroi</i> Houbraken, López-Quint., Frisvad & Samson	7717	22	17	13	12	10	09	83	12,3	100	17	25	23	22	22	22	131	19,6	100	214
<i>Penicillium</i> sp. 1	7805	04	03	03	03	10	09	32	4,7	100	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	32
<i>Penicillium</i> sp. 2	7807	04	07	09	10	13	10	53	7,9	100	09	10	13	07	08	07	54	8,1	100	107
<i>Penicillium</i> sp. 3	7722	10	9	8	7	8	7	49	7,3	100	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	49
<i>Penicillium</i> sp. 4	7721	4	3	0	0	0	0	7	1,0	33,3	10	13	15	12	12	13	75	11,2	100	82
<i>Penicillium</i> sp.5	7705	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	14	13	15	13	14	12	81	12,1	100	81
<i>Penicillium</i> sp. 6	7708	10	10	18	17	09	09	73	10,8	100	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	73

Tabela 4 - (Cont.) Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC's) de espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* por coleta, nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar e área em pousio (Mata Atlântica), de uma usina situada no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil e Dominância Relativa, de acordo com Magurran (1988).

Espécie	Nº URM	Área Cultivada								Área em Pousio								TOTAL GERAL		
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	T	DR (%)	FR (%)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	T		DR (%)	FR (%)
<i>Talaromyces muroii</i> Yaguchi, Someya & Udagawa	7821	13	13	14	15	16	17	88	13,1	100	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	88
<i>T. verruculosus</i> (Peyronel) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert	7721	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	12	13	12	12	13	14	76	11,3	100	76
<i>Talaromyces</i> sp. 1	7706	13	12	11	12	12	12	72	10,7	100	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	72
Total de espécies: 16		113	103	109	123	115	111	674	100	-	108	134	133	103	96	96	670	100	-	1344

Fonte: Próprio Autor.

Figura 11 - Culturas de um representante de cada espécie, incubadas durante 7 dias a 25 °C, A. Verso e reverso sobre MEA: (AA) = *Penicillium citrinum* Thom (verso), (AB) = *P. citrinum* Thom (reverso); (AC) = *P. javanicum* J.F.H. Beyma (verso), (AD) - *P. javanicum* J.F.H. Beyma (reverso); (AE) = *P. limosum* S. Ueda (verso); (AF) = *P. limosum* S. Ueda (verso); (AG) = *P. paxilli* Bainier (verso), (AH) = *P. paxilli* Bainier (reverso), (AI) = *P. rubens* Biourge (verso), (AJ) - *P. rubens* Biourge (reverso), (AK) - *P. sanshaense* Wang & Zhuang (verso), (AL) = *P. sanshaense* Wang & Zhuang (reverso); (AM) - *P. wotroi* Houbraken, López-Quint., Frisvad & Samson (verso), (NA) - *P. wotroi* Houbraken, López-Quint., Frisvad & Samson (reverso); (AO) = *P. sp. 1 (P. mimosum)* (verso), (AP) - *P. sp. 1 (P. mimosum)* (reverso); (AQ) = *P. sp. 2 (P. barbosa)* (verso), (AR) = *P. sp. 2 (P. barbosa)* (reverso); (AS) = *P. sp. 3 (P. tinta)* (verso), (AT) = *P. sp. 3 (P. tinta)* (reverso); (AU) = *P. sp. 4 (P. fenandae)* (verso), (AV) = *P. sp. 4 (P. fenandae)* (reverso); (AX) = *P. sp. 5 (P. cruzzi)* (verso), (AW) = *P. sp. 5 (P. cruzzi)* (reverso); (AY) = *P. sp. 6 (P. mottae)* (verso), (AZ) - *P. sp. 6 (P. mottae)* (reverso); (BA) = *Talaromyces muroii* Yaguchi, Someya & Udagawa (verso), = (BB) *T. muroii* Yaguchi, Someya & Udagawa (reverso); (BC) = *T. verruculosus* (Peyronel) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert (verso), (BD) = *T. verruculosus* (Peyronel) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert (reverso); (BE) = *T. sp. 1 (T. trapichae)* (verso), (BF) = *T. sp. 1 (T. trapichae)* (reverso).

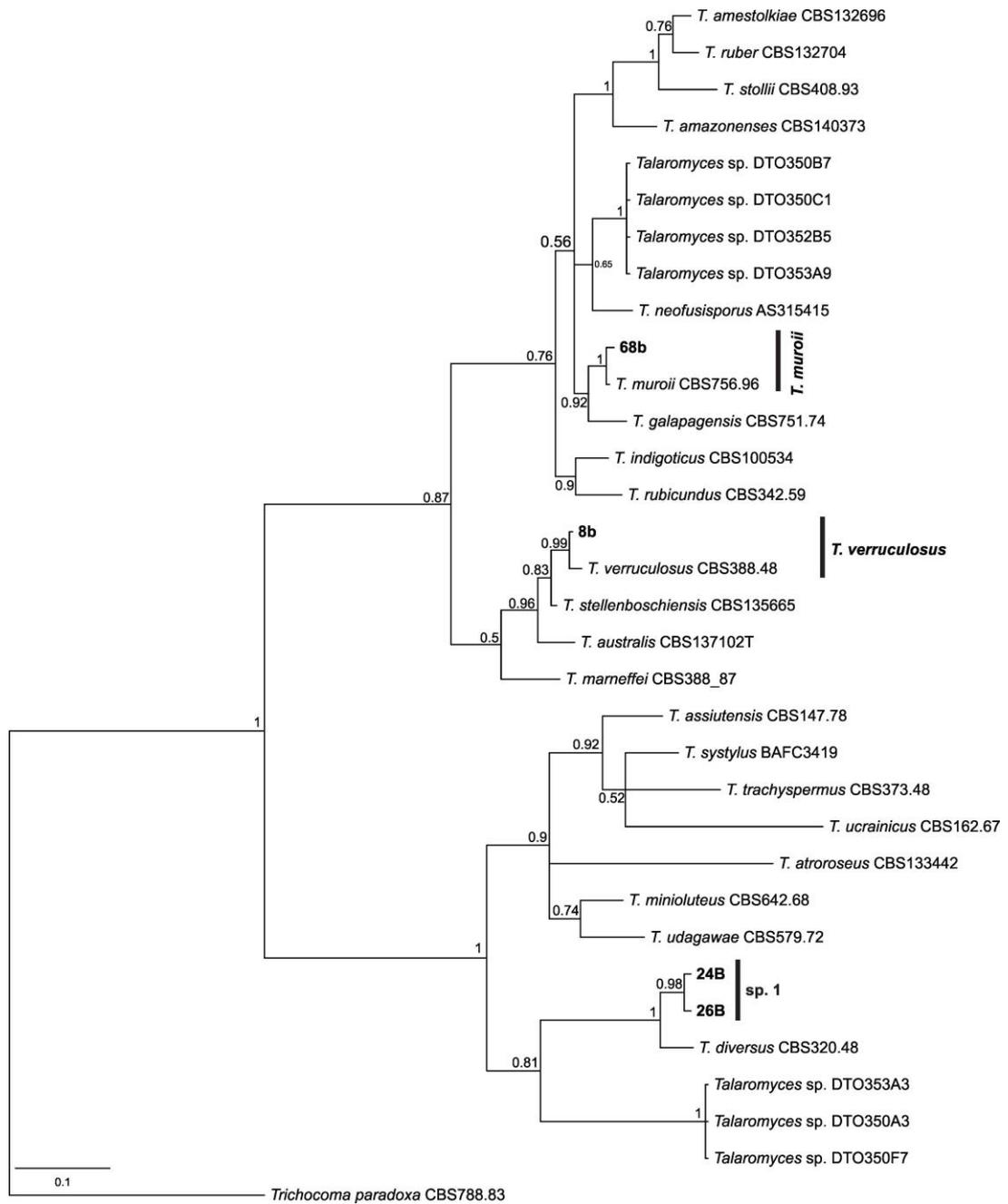


Após análise filogenética, dos 47 isolados analisados, sete isolados (sete clados) não agruparam com nenhuma espécie conhecida, sendo tratadas aqui como *Penicillium* sp. e *Talaromyces* sp. (Tabela 4; Figuras 12 e 13) e descritas como novas espécies para a ciência.

Figura 12 - Árvore filogenética das espécies de *Penicillium* deduzidas da análise bayesiana com base nas seqüências de β -tubulina. As probabilidades posteriores de Bayesian são indicadas acima dos nós. A árvore foi enraizada em *Talaromyces flavus* NRRL2098 e *Talaromyces loliensis* CBS643.80. As espécies obtidas neste estudo são destacadas em negrito.



Figura 13 - Árvore filogenética das espécies de *Talaromyces* inferida a partir de análises bayesianas com base nas sequências de β -tubulina. As probabilidades posteriores de Bayesian são indicadas acima dos nós. A árvore foi enraizada em *Trichocoma paradoxa* CBS788.83. As espécies obtidas neste estudo são destacadas em negrito.



4.2.1 Descrição de *Talaromyces trapichae* nova espécie de *Talaromyces* para a seção Trachyspermi

Taxonomia

Talaromyces trapichae S. Ramos, R. Cruz, C. Souza-Motta, N. Tinti, sp. nov.

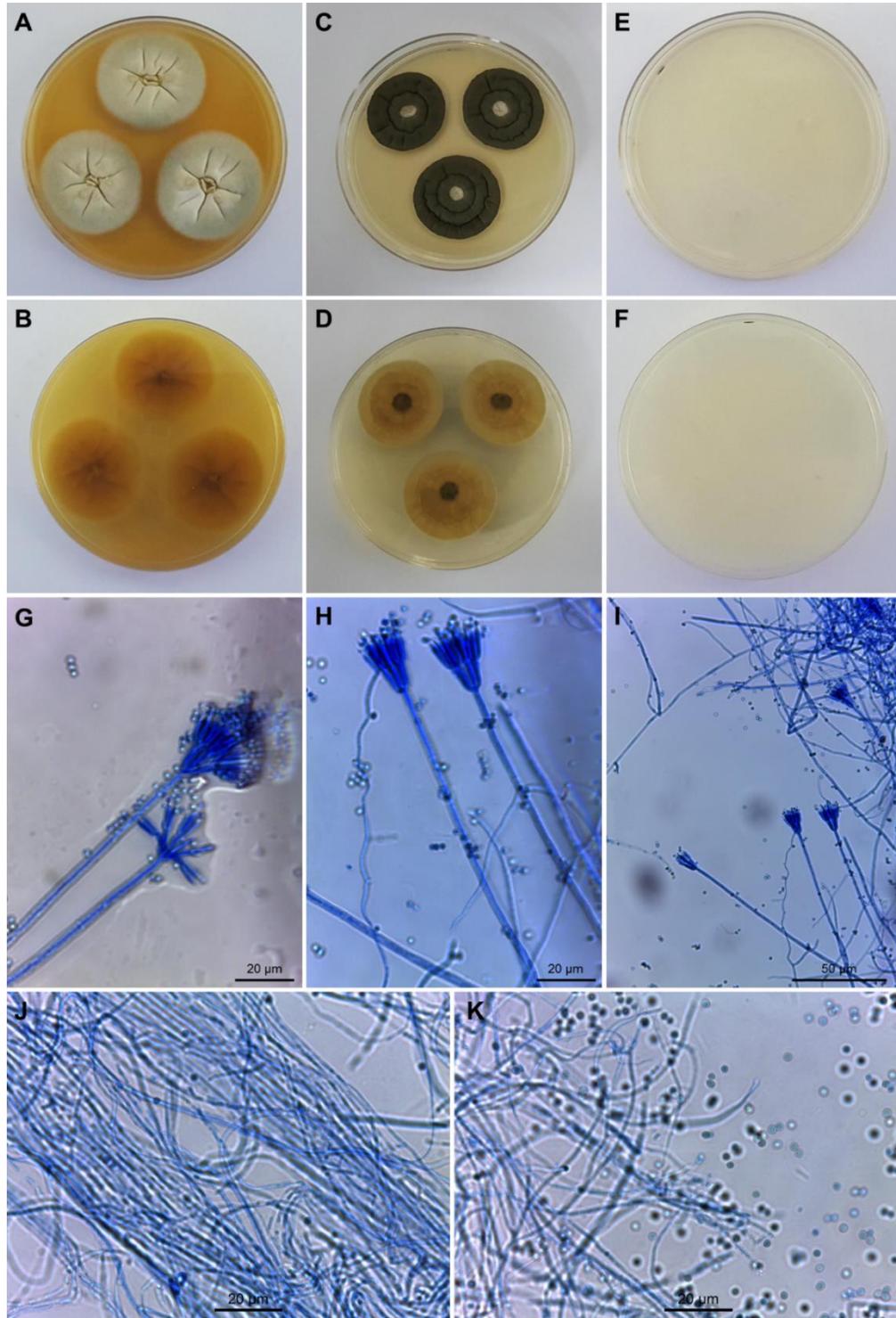
Etimologia: Latim *trapichae* refere-se à usina Trapiche, local do isolamento da espécie.

Tipo. Holótipo: aqui designado, crescido sobre MEA durante 7 dias a 25 °C; isolado a partir de amostra de solo de cultivo com cana-de-açúcar, situada na usina Trapiche, município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil (8° 35' 21" S, 35° 6' 55"W), coletada durante os meses de novembro e dezembro de 2014. Depositado na Coleção de Culturas Micoteca URM (URM7702).

Descrição. Colônias sobre MEA medindo 25-32 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 14 A e B), plana, velutínea; micélio cinza esverdeado; conidiogênese moderada a intensa; conídios azuis em massa; exudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso amarelo alaranjado; esclerócio ausente. Colônias sobre CYA medindo 27-35 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 14 C e D), plana, velutínea; micélio verde acinzentado; conidiogênese moderada a intensa; conídios azuis em massa; exudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso amarelo claro; esclerócio ausente. Cresce a 37 °C, não cresce a 5°C. Não cresce sobre G25N (Figura 14 E e F).

Conidióforos similares em ambos os meios, biverticilados simétricos (Figura 14 G e H); estipes medindo 7,8-12 µm de comprimento, parede lisa; métulas geralmente em número de cinco, medindo 7,8-12 µm de comprimento; fiálides acerosas medindo 10.0-21.0 µm de comprimento; conídios levemente rugosos à rugosos, subglobosos a globosos, medindo 2.3-2.7 µm de diâmetro (Figura 14 I).

Figura 14 - *Talaromyces trapichae*, culturas incubadas durante 7 días a 25 °C, A. Verso sobre MEA, B. Reverso sobre MEA, C. Verso sobre CYA, D. Reverso sobre CYA, E. Verso sobre G25N, F. Reverso sobre G25N, G, H e I. Conidióforo biverticilado, J. Micélio sinematoso, K. Conídios.



4.2.2 Descrição de seis novas espécies de *Penicillium* provenientes de solos de cultivo de cana-de-açúcar em Pernambuco, Brasil

Penicillium mimosum sp. nova

Taxonomia

Penicillium mimosum S. Ramos, R. Cruz, C. Souza-Motta, N. Tinti, sp. nov.

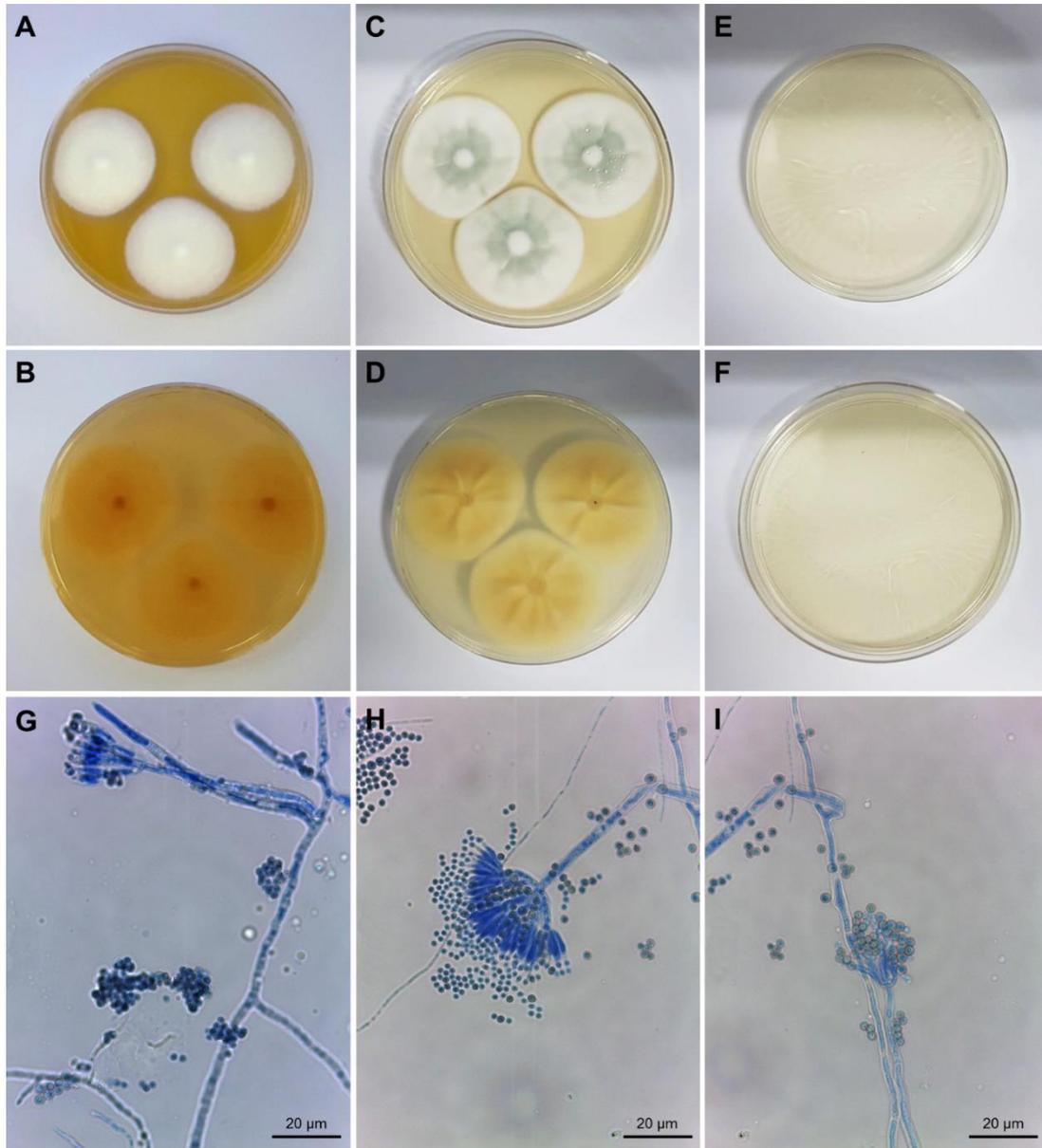
Etimologia: Latim *mimosum* refere-se à mimoso, em português, adjetivo que significa delicado.

Tipo. Holótipo: aqui designado, crescido sobre MEA durante 7 dias a 25 °C; isolado a partir de amostra de solo de cultivo com cana-de-açúcar, situada na usina Trapiche, município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil (8° 35' 21" S, 35° 6' 55"W), coletada durante os meses de novembro e dezembro de 2014. Depositado na Coleção de Culturas Micoteca - URM (URM7804).

Descrição. Colônias sobre MEA medindo 27-35 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 15 A e B), plana, levemente flocosa; micélio branco; conidiogênese leve à moderada intensa; conídios verde-acinzentados; exudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso amarelo; esclerócio ausente. Colônias sobre CYA medindo 37-43 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 15 C e D), radialmente sulcada, velutínea; micélio branco à creme; conidiogênese moderada a intensa, verde-acinzentado; exudato incolor presente; pigmento solúvel ausente; reverso amarelo claro; esclerócio ausente. Cresce a 37 °C, não cresce a 5°C. Não cresce sobre G25N (Figura 15 E e F).

Conidióforos similares em ambos os meios, predominantemente biverticilados assimétricos, com alguns conidióforos monoverticilados isolados (Figura 15 G e H); estipes medindo 100,0-180,0 µm de comprimento, parede lisa; métulas geralmente em número de cinco, medindo 6,5-7,8 µm de comprimento; fiálides ampuliformes medindo 6,5-7,8 µm de comprimento; conídios levemente rugosos à rugosos, subglobosos a globosos, medindo 2,0-2,6 µm de diâmetro (Figura 15 I).

Figura 15 - *Penicillium mimosum*, culturas incubadas durante 7 días a 25 °C, A. Verso sobre MEA, B. Reverso sobre MEA, C. Verso sobre CYA, D. Reverso sobre CYA, E. Verso sobre G25N, F. Reverso sobre G25N, G e H. Conidióforo biverticilado, I. Conídios.



Penicillium barbosae sp. nova

Taxonomia

Penicillium barbosae S. Ramos, R. Cruz, C. Souza-Motta, N. Tinti, sp. nov.

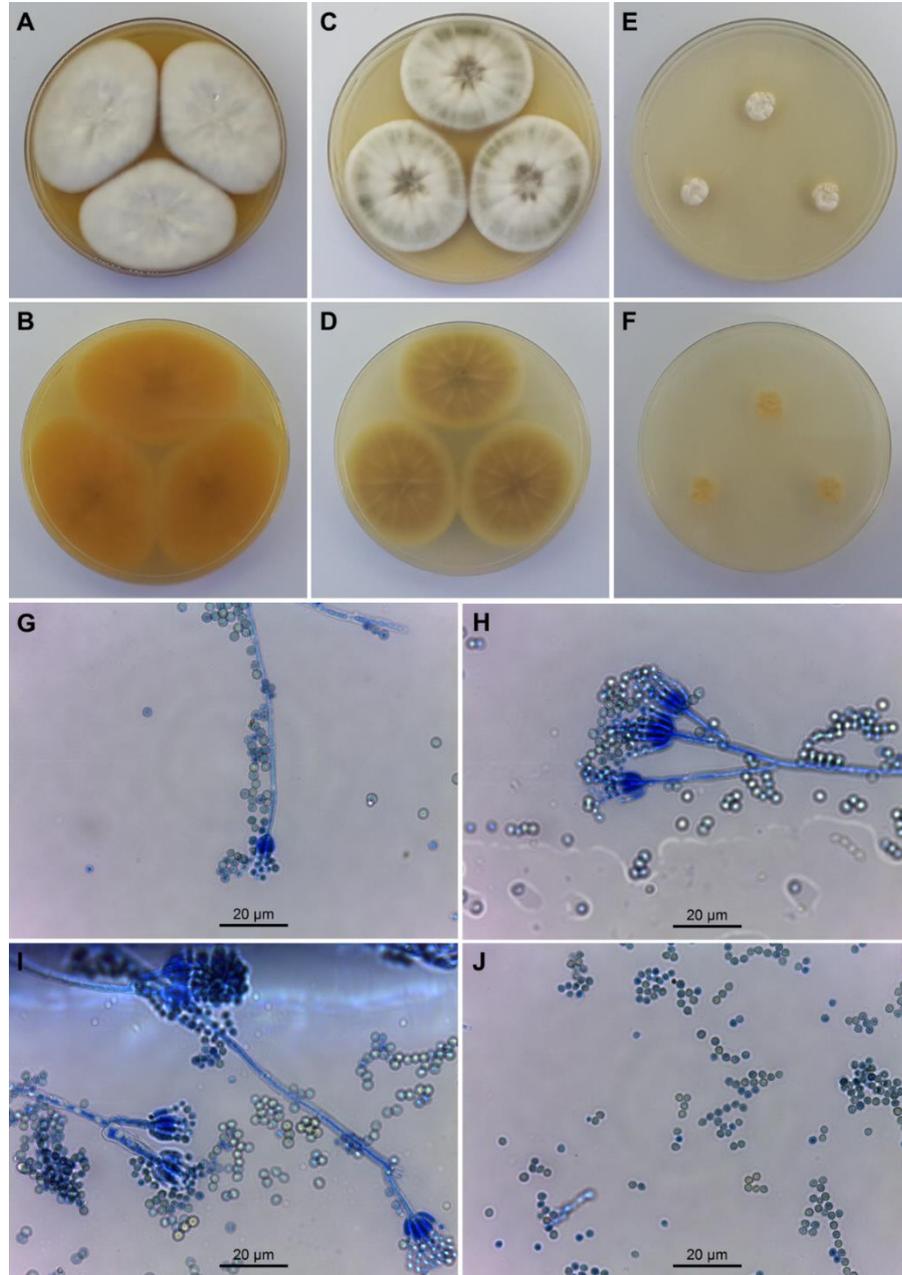
Etimologia: Latim *barbosae* refere-se à Barbosa, em homenagem à Prof^a Eliane Barbosa da Silva Nogueira, micologista, que há anos se dedica à taxonomia e à preservação de fungos, sendo responsável técnica pela Coleção de Culturas Micoteca – URM, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Tipo. Holótipo: aqui designado, crescido sobre MEA durante 7 dias a 25 °C; isolado a partir de amostra de solo de cultivo com cana-de-açúcar, situada na usina Trapiche, município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil (8° 35' 21" S, 35° 6' 55"W), coletada durante os meses de novembro e dezembro de 2014. Depositado na Coleção de Culturas Micoteca - URM (URM7683; URM7700; URM7807).

Descrição. Colônias sobre MEA medindo 45-50 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 16 A e B), plana, velutínea à levemente flocosa; micélio branco; conidiogênese moderada a intensa; conídios cinza-azulados; exudato incolor presente; pigmento solúvel ausente; reverso amarelo alaranjado; esclerócio ausente. Colônias sobre CYA medindo 38-47 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 16 C e D), radialmente sulcada, velutínea à levemente flocosa; micélio branco à creme; conidiogênese moderada a intensa; conídios cinza-azulados; exudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso amarelo escuro; esclerócio ausente. Cresce a 37 °C, não cresce a 5°C. Colônias sobre G25N medindo 09-12 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 16 E e F), sulcada, velutínea à levemente flocosa e umbonada no centro; micélio branco à creme; exudato ausente; pigmento solúvel amarelo presente; reverso amarelo; esclerócio ausente.

Conidióforos similares em ambos os meios, predominantemente biverticilados assimétricos (Figura 16 G), com alguns conidióforos monoverticilados vesiculados isolados (Figura 16 H e I); estipes medindo 50,0-230,0 µm de comprimento, parede lisa; métulas geralmente em número de duas, medindo 13,0-17,0 µm de comprimento; fiálides ampuliformes medindo 6,5-7,8 µm de comprimento; conídios levemente rugosos à rugosos, subglobosos a globosos, medindo 2,3-2,6 µm de diâmetro (Figura 16 J).

Figura 16 - *Penicillium barbosa*, culturas incubadas durante 7 dias a 25 °C, A. Verso sobre MEA, B. Reverso sobre MEA, C. Verso sobre CYA, D. Reverso sobre CYA, E. Verso sobre G25N, F. Reverso sobre G25N, G. Conidióforo monoverticilado, H. conidióforo biverticilado, I. conidióforos monoverticilado e biverticilado, J. Conídios.



Penicillium tintae sp. nova

Taxonomia

Penicillium tintae S. Ramos, R. Cruz, C. Souza-Motta, N. Tinti, sp. nov.

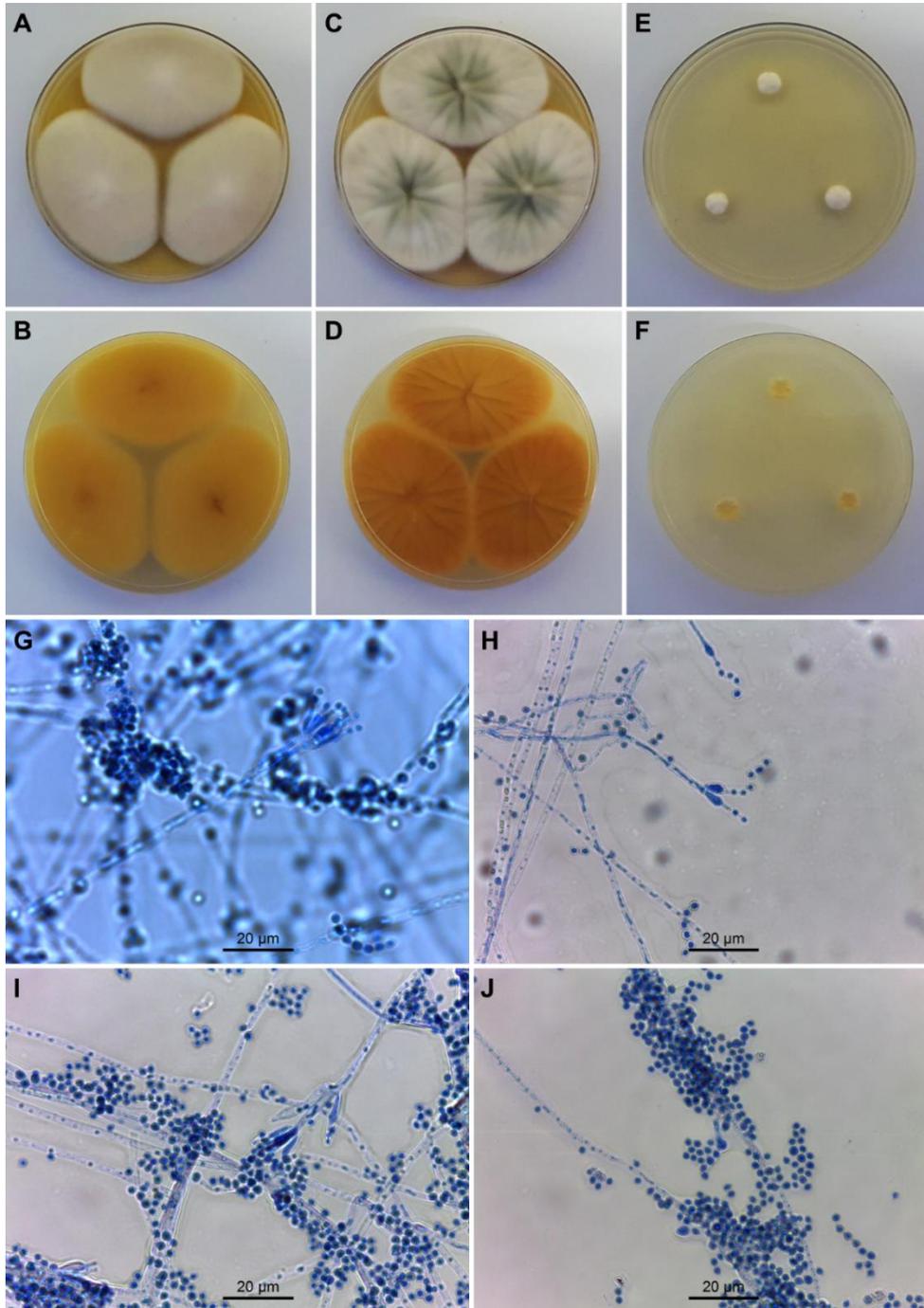
Etimologia: Latim *tintii* refere-se à Tinti, em homenagem à Prof^a Dr^a Neiva Tinti de Oliveira, micologista e Prof^a titular do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Tipo. Holótipo: aqui designado, crescido sobre MEA durante 7 dias a 25 °C; isolado a partir de amostra de solo de cultivo com cana-de-açúcar, situada na usina Trapiche, município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil (8° 35' 21" S, 35° 6' 55"W), coletada durante os meses de novembro e dezembro de 2014. Depositado na Coleção de Culturas Micoteca - URM (URM7722).

Descrição. Colônias sobre MEA medindo 45-55 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 17 A e B), plana, flocosa; micélio branco; conidiogênese moderada a intensa; conídios cinza-esverdeados; exudato incolor presente; pigmento solúvel ausente; reverso amarelo; esclerócio ausente. Colônias sobre CYA medindo 48-55 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 17 C e D), radialmente sulcada, velutínea; micélio branco à creme; conidiogênese moderada a intensa; conídios cinza-esverdeados; exudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso laranja; esclerócio ausente. Cresce a 37 °C, não cresce a 5°C. Colônias sobre G25N medindo 08-13 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 17 E e F), sulcada, velutínea à levemente flocosa e umbonada no centro; micélio branco à creme; exudato ausente; pigmento solúvel amarelo presente; reverso amarelo; esclerócio ausente.

Conidióforos similares em ambos os meios, predominantemente biverticilados assimétricos (Figura 17 G), com alguns conidióforos monoverticilados vesiculados isolados (Figura 17 H e I); estipes medindo 50,0-230,0 µm de comprimento, parede lisa; métulas geralmente em número de duas, medindo 13,0-17,0 µm de comprimento; fiálides ampuliformes medindo 6,5-7,8 µm de comprimento; conídios levemente rugosos à rugosos, subglobosos a globosos, medindo 2,3-2,6 µm de diâmetro (Figura 17 J).

Figura 17 - *Penicillium tintae*, culturas incubadas durante 7 días a 25 °C, A. Verso sobre MEA, B. Reverso sobre MEA, C. Verso sobre CYA, D. Reverso sobre CYA, E. Verso sobre G25N, F. Reverso sobre G25N, G e H. Conidióforo monovérticilado, I. conidióforo bivérticilado, J. Conídios.



Penicillium fernandae sp. nova

Taxonomia

Penicillium fernandae S. Ramos, R. Cruz, C. Souza-Motta, N. Tinti, sp. nov.

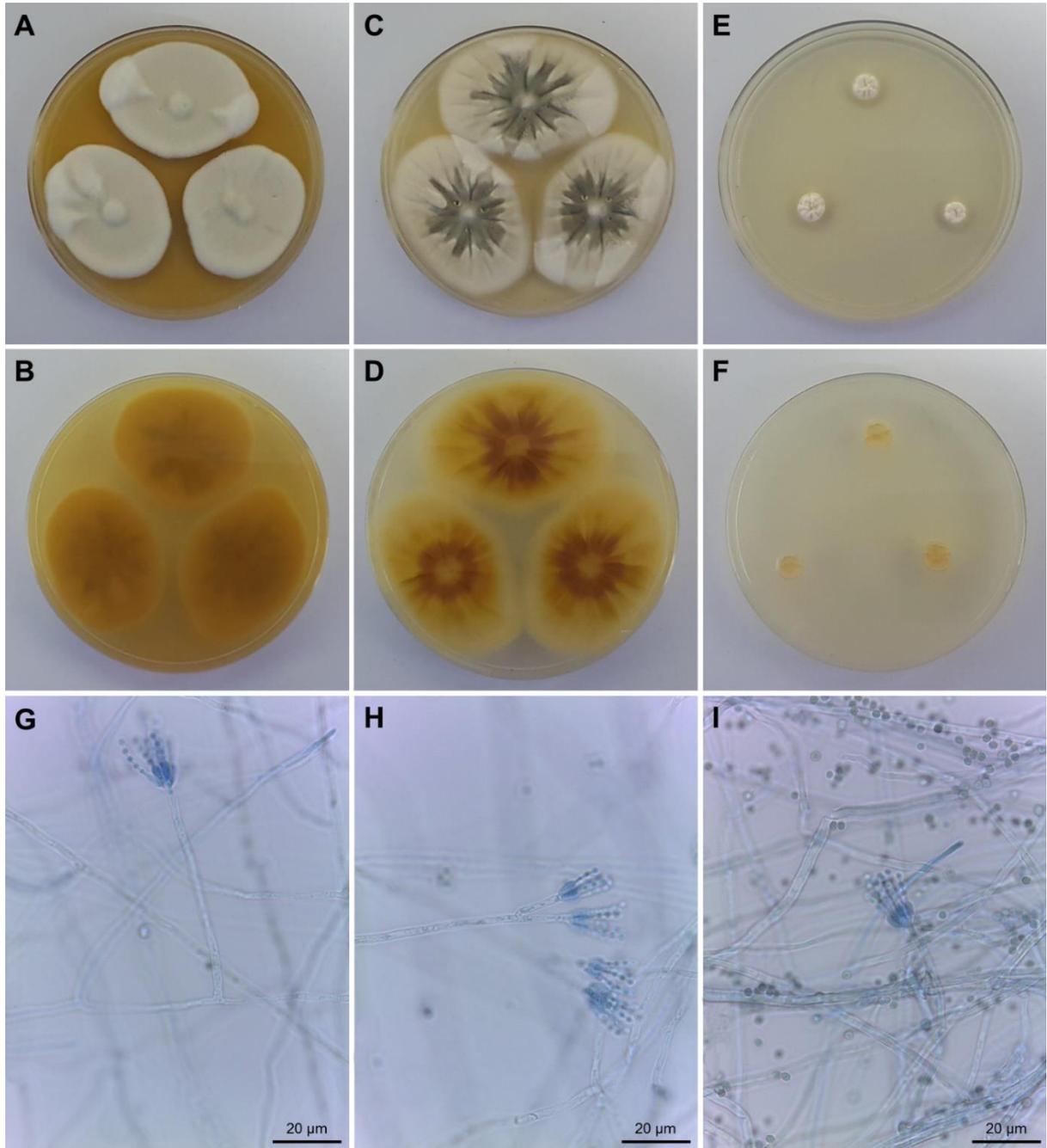
Etimologia: Latim *fernandae* refere-se à Fernandes, em homenagem à Prof^a aposentada do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, Maria José dos Santos Fernandes. A Prof^a Maria José Fernandes é uma ilustre taxonomista com décadas de experiência na taxonomia de *Penicillium*.

Tipo. Holótipo: aqui designado, crescido sobre MEA durante 7 dias a 25 °C; isolado a partir de amostra de solo de cultivo com cana-de-açúcar, situada na usina Trapiche, município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil (8° 35' 21" S, 35° 6' 55"W), coletada durante os meses de novembro e dezembro de 2014. Depositado na Coleção de Culturas Micoteca - URM (URM7682; URM7688; URM7703; URM7704; URM7716; URM7804; URM7806).

Descrição. Colônias sobre MEA medindo 37-45 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 18 A e B), plana, velutínea à levemente flocosa; micélio branco à bege; conidiogênese moderada a intensa; conídios cinza-esverdeados; exudato incolor presente; pigmento solúvel ausente; reverso amarelo alaranjado; esclerócio ausente. Colônias sobre CYA medindo 49-53 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 18 C e D), radialmente sulcada, velutínea; micélio branco à bege; conidiogênese moderada a intensa; conídios cinza-esverdeados; exudato claro presente; pigmento solúvel ausente; reverso laranja; esclerócio ausente. Cresce a 37 °C, não cresce a 5°C. Colônias sobre G25N medindo 07-12 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 18 E e F), sulcada, velutínea à levemente flocosa e umbonada no centro; micélio branco à creme; exudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso amarelo; esclerócio ausente.

Conidióforos similares em ambos os meios, predominantemente biverticilados assimétricos, com alguns conidióforos monoverticilados vesiculados (Figura 18 G e H); estipes medindo 130,0-25,0 µm de comprimento, parede lisa; métulas geralmente em número de duas, medindo 08,0-13,0 µm de comprimento; fiálides ampuliformes medindo 6,5-7,8 µm de comprimento; conídios levemente rugosos à rugosos, subglobosos a globosos, medindo 2,3-2,7 µm de diâmetro (Figura 18 I).

Figura 18 - *Penicillium fernandae*, culturas incubadas durante 7 dias a 25 °C, A. Verso sobre MEA, B. Reverso sobre MEA, C. Verso sobre CYA, D. Reverso sobre CYA, E. Verso sobre G25N, F. Reverso sobre G25N, G e H. Conidióforo monoverticilado, I. conidióforo biverticilado, J. Conídios e conidióforo monoverticilado.



Penicillium cruzii sp. nova

Taxonomia

Penicillium cruzii S. Ramos, R. Cruz, C. Souza-Motta, N. Tinti, sp. nov.

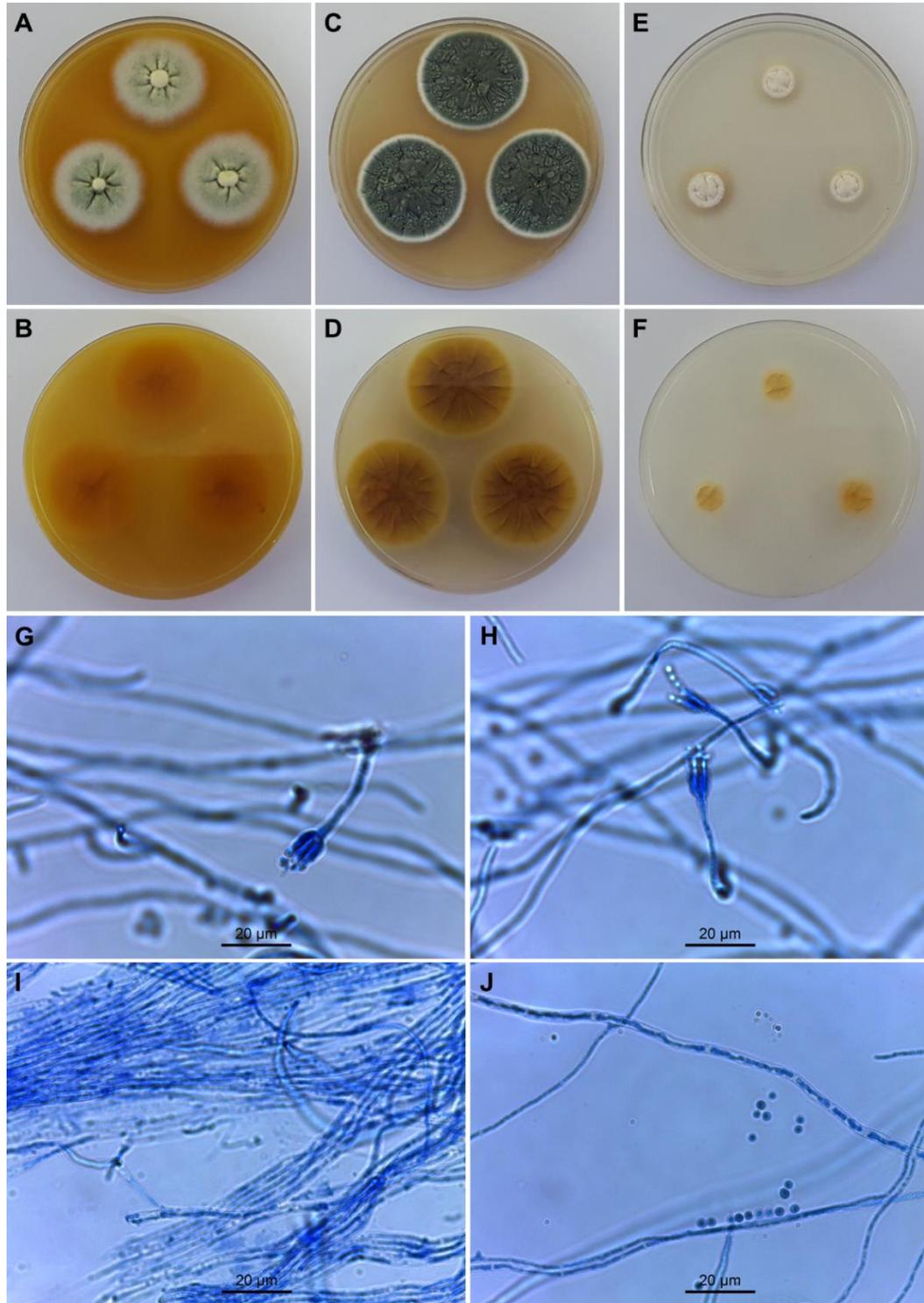
Etimologia: Latim *cruzii* refere-se à Cruz. em homenagem à Dr^a Roberta Cruz, micologista, especialista em taxonomia de *Penicillium*, formada pela Universidade Federal de Pernambuco.

Tipo. Holótipo: aqui designado, crescido sobre MEA durante 7 dias a 25 °C; isolado a partir de amostra de solo de cultivo com cana-de-açúcar, situada na usina Trapiche, município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil (8° 35' 21" S, 35° 6' 55"W), coletada durante os meses de novembro e dezembro de 2014. Depositado na Coleção de Culturas Micoteca URM (URM7705).

Descrição. Colônias sobre MEA medindo 27-32 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 19 A e B), verde acinzentada, plana, velutínea à levemente flocosa; micélio branco à bege; conidiogênese moderada a intensa; conídios verde acinzentados; exudato incolor presente; pigmento solúvel ausente; reverso amarelo alaranjado; esclerócio ausente. Colônias sobre CYA medindo 29-35 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 19 C e D), verde escuro, velutínea radialmente sulcada, micélio branco; conidiogênese moderada a intensa; conídios verde escuros; presença de exudato amarelo e abundante; pigmento solúvel ausente; reverso laranja; esclerócio ausente. Não cresce a 37 °C, não cresce a 5°C. Colônias sobre G25N medindo 08-12 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 19 E e F), sulcada, velutínea à levemente flocosa e umbonada no centro; micélio branco à creme; exudato ausente; pigmento solúvel amarelo presente; reverso amarelo; esclerócio ausente.

Conidióforos similares em ambos os meios, exclusivamente monoverticilados, a maioria não vesiculado (Figura 19 G e H); estipes medindo 20,0-100,0 µm de comprimento, parede lisa; fiálides ampuliformes medindo (4)6,5-7,8 µm de comprimento; micélio sinematoso (Figura 19 I); conídios levemente rugosos à rugosos, subglobosos a globosos, medindo 2,3-3,0 µm de diâmetro (Figura 19 J).

Figura 19 - *Penicillium cruzii*, culturas incubadas durante 7 días a 25 °C, A. Verso sobre MEA, B. Reverso sobre MEA, C. Verso sobre CYA, D. Reverso sobre CYA, E. Verso sobre G25N, F. Reverso sobre G25N, G e H. Conidióforo monoverticilado, I. Micélio sinematoso, J. Conídios.



Penicillium mottae sp. nova

Taxonomia

Penicillium mottae S. Ramos, R. Cruz, C. Souza-Motta, N. Tinti, sp. nov.

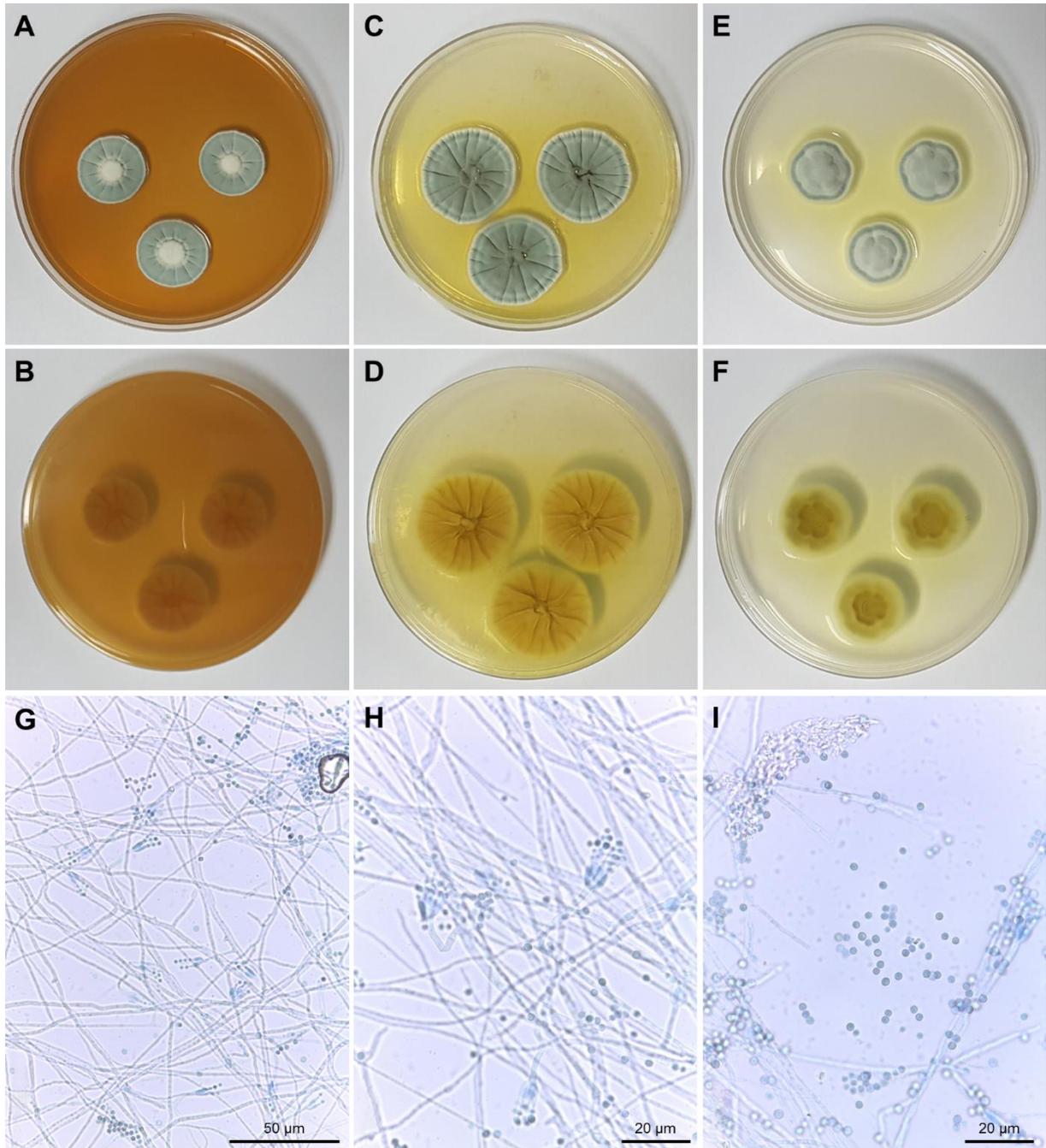
Etimologia: Latim *mottae* refere-se à Motta. Em homenagem à Prof^a Cristina Motta, renomada micologista, especialista em taxonomia de fungos filamentosos, Prof^a do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e há anos, curadora da Coleção de Culturas Micoteca - URM, do Centro de Biociências da UFPE.

Tipo. Holótipo: aqui designado, crescido sobre MEA durante 7 dias a 25 °C; isolado a partir de amostra de solo de cultivo com cana-de-açúcar, situada na usina Trapiche, município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil (8° 35' 21" S, 35° 6' 55"W), coletada durante os meses de novembro e dezembro de 2014. Depositado na Coleção de Culturas Micoteca URM (URM7708).

Descrição. Colônias sobre MEA medindo 27-32 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 20 A e B), plana, levemente flocosa; micélio branco; conidiogênese moderada a intensa; conídios verde-acinzentados; exudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso amarelo alaranjado; esclerócio ausente. Colônias sobre CYA medindo 25-32 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 20 C e D), velútinea, sulcada, micélio branco; conidiogênese moderada a intensa, conídios verde-acinzentados; exudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso amarelo claro; esclerócio ausente. Cresce a 37 °C, não cresce a 5°C. Colônias sobre G25N medindo 10-16 mm de diâmetro após 7 dias a 25 °C (Figura 20 E e F), sulcada, velútinea à levemente flocosa e umbonada no centro; micélio branco à creme; exudato ausente; pigmento solúvel amarelo presente; reverso amarelo; esclerócio ausente, conídios verde-acinzentados.

Conidióforos similares em ambos os meios, exclusivamente monoverticilados, a maioria vesiculado (Figura 20 G e H); estipes medindo 20,0-70,0 µm de comprimento, parede lisa; fiálides ampuliformes medindo 4,0-5,2 µm de comprimento; conídios, levemente rugosos à rugosos, subglobosos a globosos, medindo 2,3-3,0 µm de diâmetro (Figura 20 I).

Figura 20 - *Penicillium mottae* culturas incubadas durante 7 días a 25 °C, A. Verso sobre MEA, B. Reverso sobre MEA, C. Verso sobre CYA, D. Reverso sobre CYA, E. Verso sobre G25N, F. Reverso sobre G25N, G e H. Conidióforo monoverticilado, I. Conídios.



4.3 ANÁLISES ECOLÓGICAS

Os índices de diversidade de espécies e equitabilidade foram similares e elevados para as duas áreas analisadas, com um discreto aumento para a área cultivada (Figura 21). As amostras da área cultivada apresentaram maior riqueza de espécies (Figura 22). A área de pousio apresentou, durante as duas primeiras coletas, maior abundância (Figura 23).

Com base no índice de dominância relativa, as espécies dominantes na área cultivada foram *Penicillium limosum*, *P. wotroi*, *Penicillium* sp. 6, *Talaromyces muroii* e *Talaromyces* sp.1. Enquanto na área em pousio, seis espécies dominaram, sendo: *Penicillium citrinum*, *P. rubens*, *P. wotroi*, *Talaromyces* sp. 4, *Talaromyces* sp. 5 e *Talaromyces verruculosus* (Tabela 4). *Penicillium wotroi* foi dominante nas duas áreas avaliadas, além de apresentar 100% de frequência de ocorrência em ambas as áreas (Tabela 4, Figura 24).

Todas as espécies encontradas apresentaram frequência igual ou superior à 50%, sendo consideradas constantes (Figura 24).

A análise de similaridade das amostras apresentou um $r=0,73$, demonstrando dados bem ajustados. Foram registrados dois grupos, o grupo 1 caracterizou a área cultivada (Culti) enquanto o Grupo 2 associou todas amostras do Pousio (Figura 25).

Em relação a análise de similaridade das espécies, a análise cofenética apresentou um $r=0,84$ indicando que existem grupos distintos. Foram evidenciados dois grandes grupos, cada um subdividido em dois subgrupos (Figura 26).

A análise dos Componentes Principais foi significativa, com os três primeiros componentes explicando 78,97% da variação dos dados. O componente 1 explicou 61,46%, o segundo componente explicou 9,09% e o terceiro componente, 8,42% (Tabela 5).

A projeção bidimensional evidenciou 2 grupos: o grupo da área de Pousio (lado direito) e o grupo associado à área cultivada (lado esquerdo). O Pousio associou *Penicillium citrinum*, *P. paxilli*, *P. rubens*, *P. sanshaense*, *P. wotroi*, *Penicillium* sp. 4 e *Penicillium* sp. 5 e *T. verruculosus* à temperatura, teor de carbono, pH e ao teor de P. Enquanto o grupo da área cultivada associou entre si *Penicillium javanicum*, *P. limosum*, *Penicillium* sp1, *Penicillium* sp. 3, *Penicillium* sp. 6, *Talaromyces murroi* e *Talaromyces* sp. 1 aos teores de Al, Na, K, Ca, Mg e H. No grupo da área de Pousio destacaram-se as espécies *Talaromyces verruculosus* e *Penicillium* sp. 5, influenciados pelo pH. No grupo da área cultivada cultivada, *Talaromyces* sp.1 foi importante, sendo os teores de Al e Mg os fatores de maior influência (Figura 27; Tabela 5).

Figura 21 - Diversidade (bits.ind^{-1}) e Equitabilidade de Pielou das espécies de *Penicillium* e de *Talaromyces* de solos cultivados com cana-de-açúcar (Culti) e em pousio (Pousio), em seis coletas (C1, C2, C3, C4, C5 e C6). Análise estatística com base nos índices de Shannon e de Pielou.

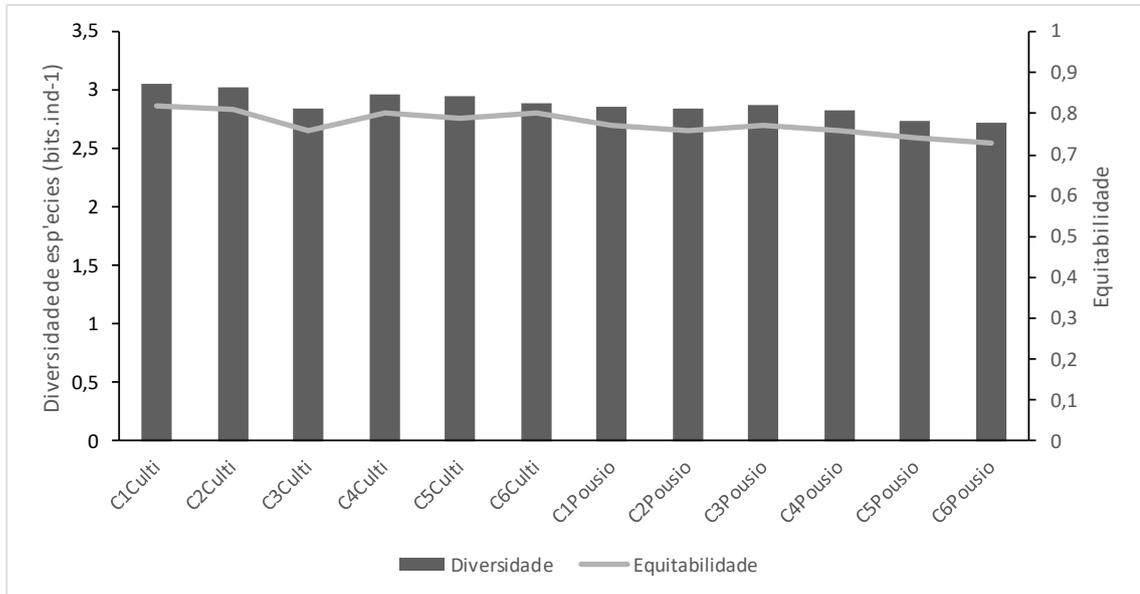


Figura 22 - Riqueza de espécies de *Penicillium* e de *Talaromyces* de solos cultivados com cana-de-açúcar (Culti) e em pousio (Pousio), em seis coletas (C1, C2, C3, C4, C5 e C6).

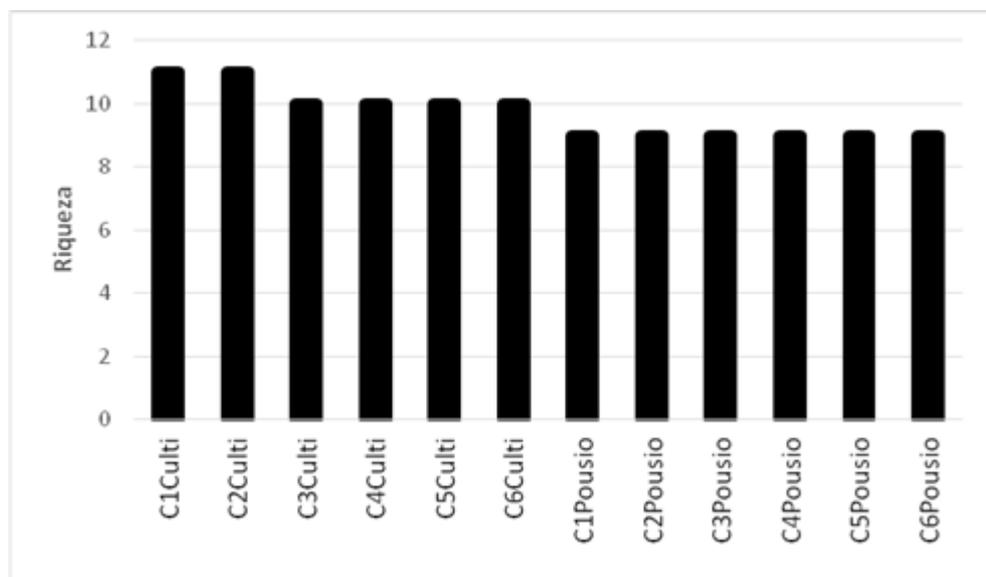


Figura 23 - Abundância de *Penicillium* e de *Talaromyces* de solos cultivados com cana-de-açúcar (Culti) e em pousio (Pousio), em seis coletas (C1, C2, C3, C4, C5 e C6).

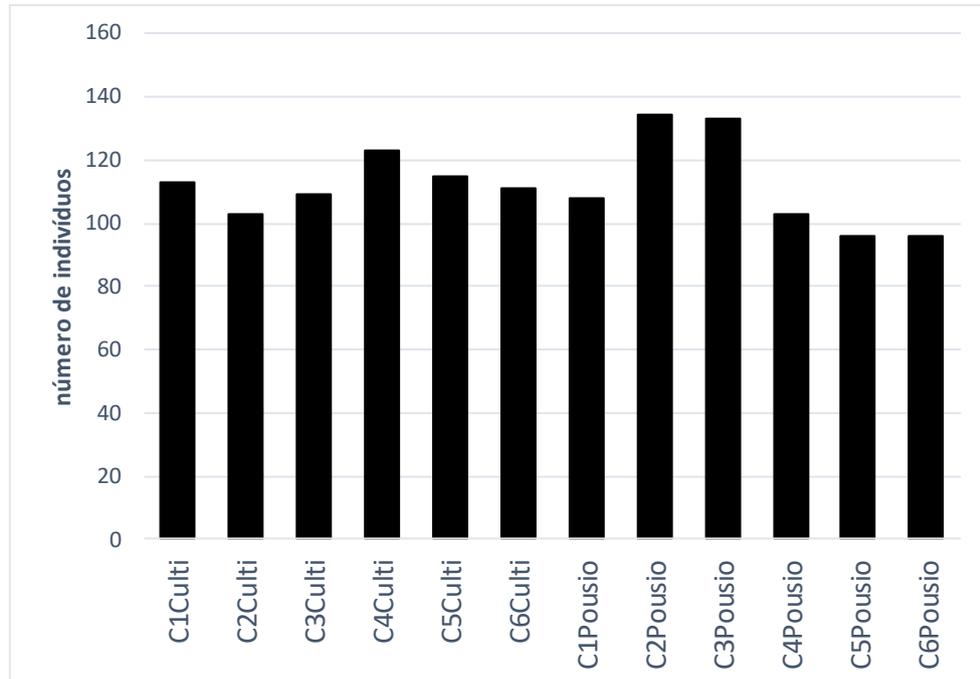


Figura 24 - Frequência de ocorrência 9%) das espécies de *Penicillium* e de *Talaromyces* provenientes de solos cultivados com cana-de-açúcar (Culti) e em pousio (Pousio), em seis coletas (C1, C2, C3, C4, C5 e C6). (Psp2) = *Penicillium* sp. 2; (Pwotr) = *P. Wotroi*; (Pcitrin) = *P. citrinum*; (Psp4) = *Penicillium* sp 4; (Tsp1) = *Talaromyces* sp. 1; (Tverru) = *Talaromyces verruculosus*; (Tmurr) = *T. murroi*; (Psp6) = *Penicillium* sp 6; (Psp5) = *Penicillium* sp 5; (Psp3) = *Penicillium* sp 3; (Psp1) = *Penicillium* sp 1; (Psansh) = *P. sanshaense*; (Pruben) = *P. rubens*; (Ppaxil) = *P. paxilli*; (Plimos) = *P. limosum*; (Pjavan) = *P. javanicum*.

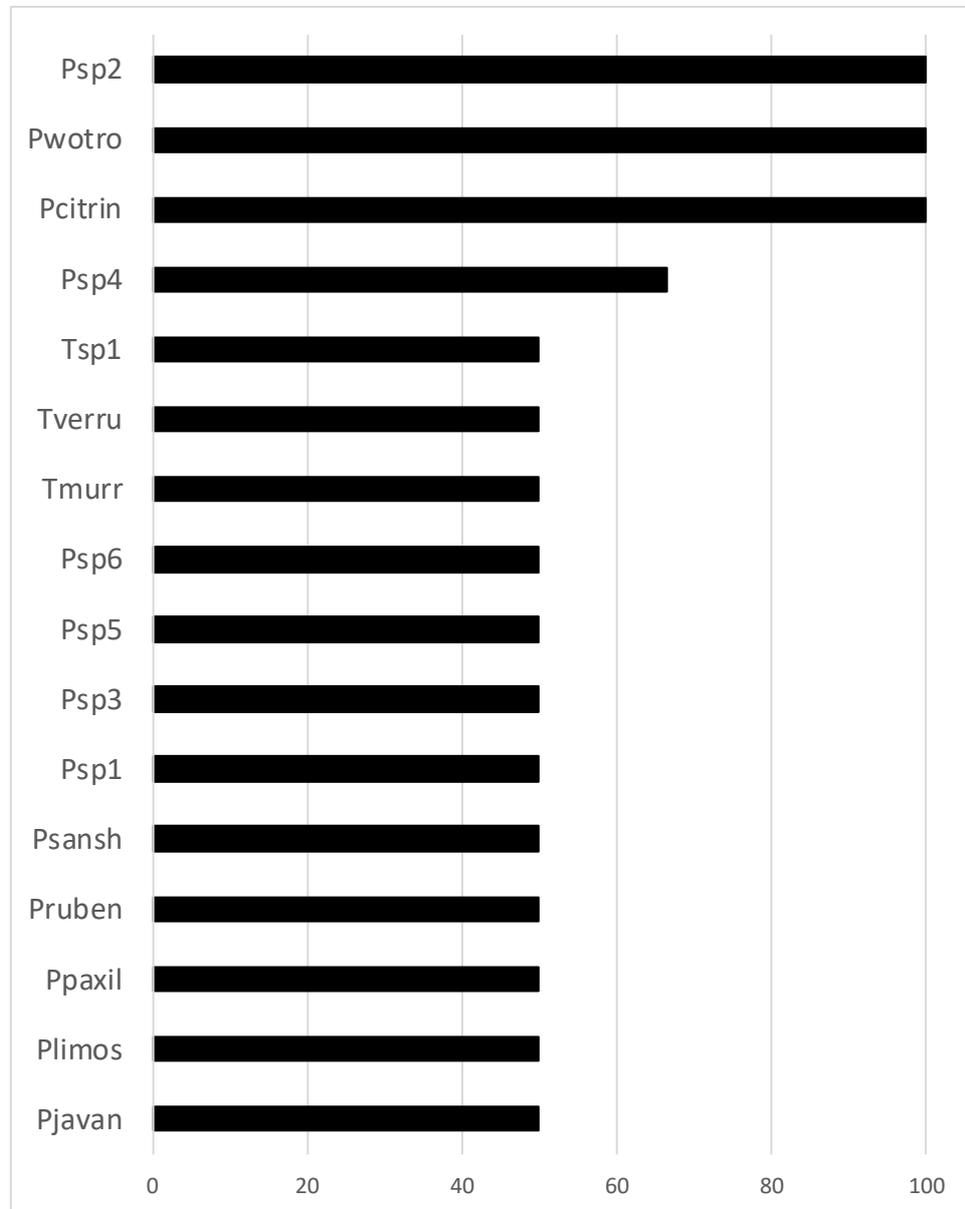


Figura 25 - Dendrograma de proximidade entre as amostras (seis coletas: C1, C2, C3, C4, C5 e C6) provenientes de solos de área cultivada com cana-de-açúcar e de área em pousio (sem cana) de uma usina situada no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil. Análise estatística com base no índice de Bray-Curtis; método de ligação do peso proporcional (WPGM, Weighted Pair-Group Method, Arithmetic Average). Análise cofenética: $r > 0,73$.

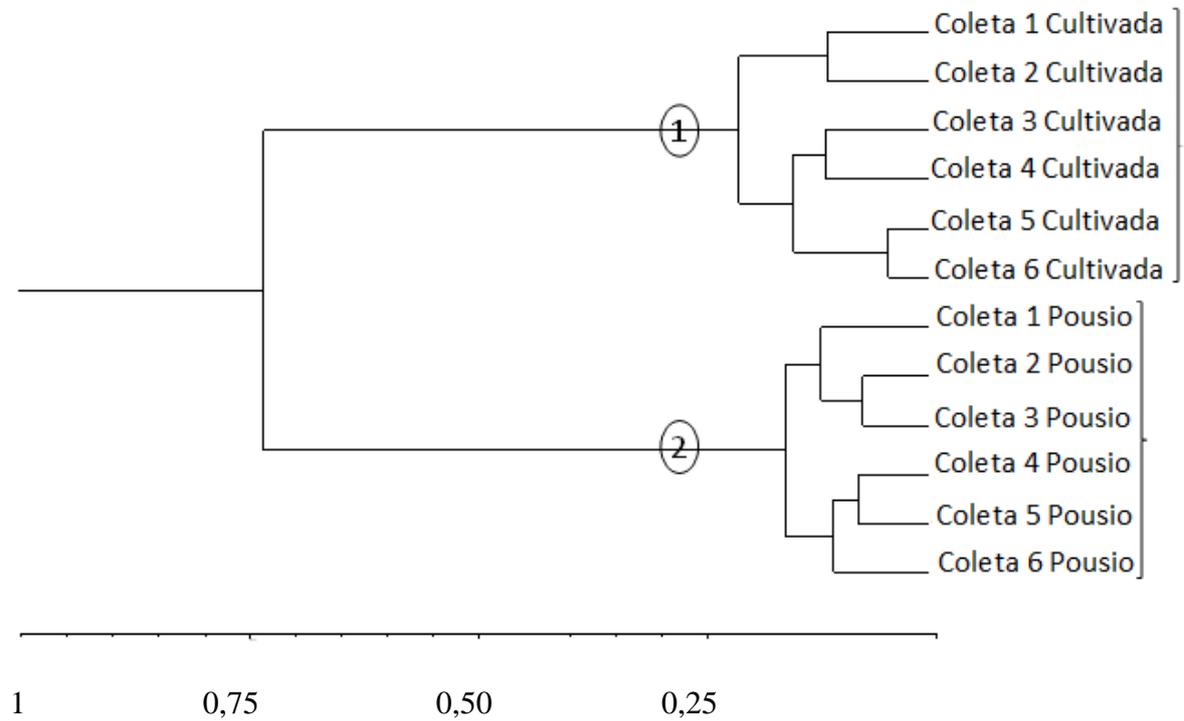


Figura 26 - Dendrograma de proximidade entre as espécies de *Penicillium* e de *Talaromyces* provenientes de solos de cultivo de cana-de-açúcar, de uma usina situada no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil. Análise estatística com base no índice de Bray-Curtis; método de ligação do peso proporcional (WPGM, Weighted Pair-Group Method, Arithmetic Average). Análise cofenética: $r > 0,84$.

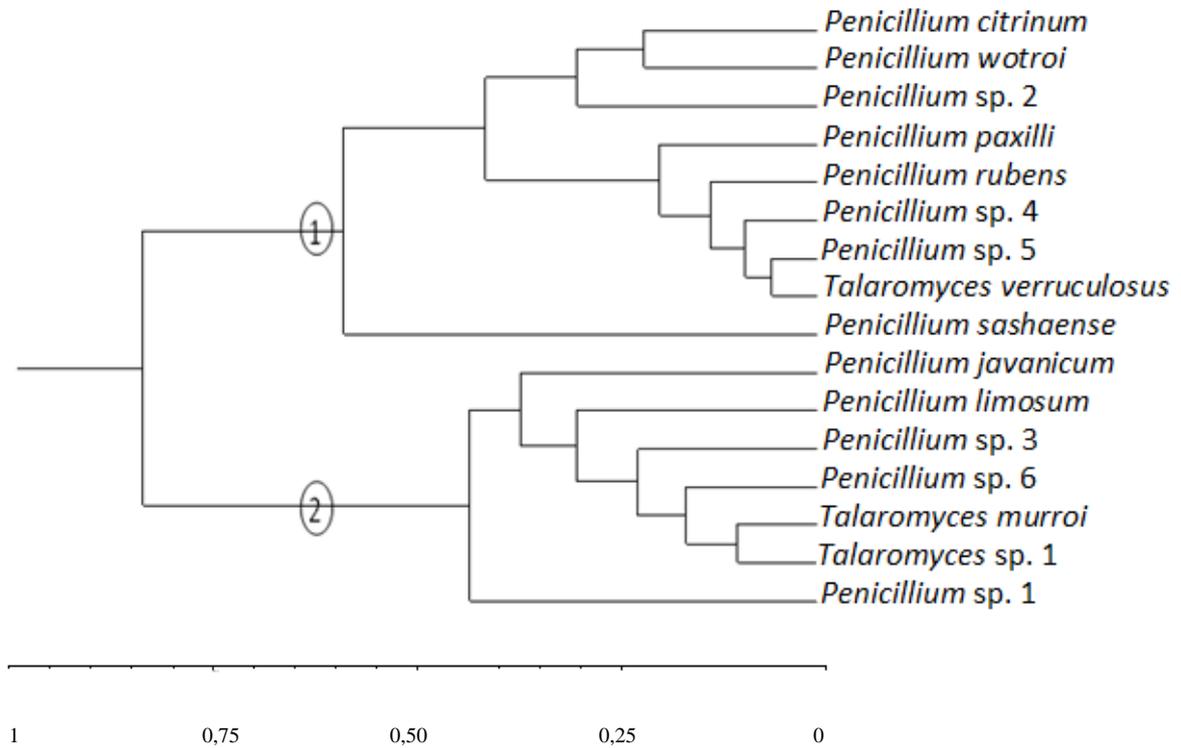


Tabela 5 - Análise dos 3 primeiros componentes principais.

Espécies e parâmetros (abreviados)	Componente 1 (61,46%)	Componente 2 (9,09%)	Componente 3 (8,42%)
<i>Penicillium citrinum</i>	0,6412	0,4369	0,4922
<i>P. javanicum</i>	-0,7539	0,4364	-0,1527
<i>P. limosum</i>	-0,9548	-0,1929	0,1657
<i>P. paxilli</i>	0,8728	0,1883	0,4276
<i>P. rubens</i>	0,9467	0,0646	0,1659
<i>P. sanshaense</i>	0,8225	0,1970	0,1667
<i>P. wotroi</i>	0,7829	0,2276	-0,2552
<i>Penicillium</i> sp 1	-0,8050	-0,1197	0,2124
<i>Penicillium</i> sp 2	0,0438	-0,2257	0,7927
<i>Penicillium</i> sp 3	-0,9732	0,0810	-0,0422
<i>Penicillium</i> sp 4	0,9749	0,0587	-0,0610
<i>Penicillium</i> sp 5	0,9942	0,0113	0,0112
<i>Penicillium</i> sp 6	-0,9032	-0,0802	0,0386
<i>Taloromyces murroi</i>	-0,9908	-0,0385	0,0805
<i>T. verruculosus</i>	0,9898	-0,0463	-0,0495
<i>Talaromyces</i> sp 1	-0,9929	0,0568	0,0046
Temperatura	0,7185	-0,4784	-0,3211
pH	0,9298	0,2989	-0,0184
P	0,3414	0,1282	-0,2889
Al	-0,9330	-0,1918	-0,0011
Na	-0,7871	0,2935	-0,1585
K	-0,2515	0,3750	0,7769
Ca	-0,3359	-0,0583	0,2826
Mg	-0,9055	0,0782	0,0060
H	-0,4592	0,2304	0,0287
Matéria Orgânica	0,1577	-0,8377	0,2809
Carbono	0,4862	-0,6742	0,1170

4.4 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS

A detecção da produção de micotoxinas por um representante de cada espécie, está apresentada na tabela 6. Dentre as cinco micotoxinas avaliadas, apenas a citrinina e a patulina foram detectadas. *Penicillium citrinum*, *P. paxilli*, e *P. wotroi* foram produtoras de citrinina. Quanto à patulina, apenas *P. mimosum* foi produtora.

Tabela 6. Detecção da produção das micotoxinas Ácido Ciclopiazônico (APA), Ácido Penicílico (CPA), Citrinina (CIT), Ocratoxina A (OTA) e Patulina, através da técnica de cromatografia líquida de ultra performance ACQUITY UPLC M-Class, (Waters Corporation) por espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* solo de área Cultivada com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e de solo de área em pousio, de uma usina situada no município de Sirinhaém, Pernambuco, Brasil.

Nº URM	Espécie	ÁREA DO ISOLAMENTO	APA	CPA	CIT	OTA	PAT
7720	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	Pousio	-	-	+	-	-
7719	<i>P. javanicum</i> J.F.H. Beyma	Cultivada	-	-	-	-	-
7822	<i>P. limosum</i> S. Ueda	Cultivada	-	-	-	-	-
7699	<i>P. paxilli</i> Bainier	Pousio	-	-	+	-	-
7700	<i>P. rubens</i> Biourge	Pousio	-	-	-	-	-
7681	<i>P. sanshaense</i>	Pousio	-	-	-	-	-
7717	<i>P. wotroi</i> Houbraken, López-Quint., Frisvad & Samson	Cultivada	-	-	+	-	-
7805	<i>P. sp. 1</i>	Cultivada	-	-	-	-	+
7807	<i>P. sp. 2</i>	Cultivada	-	-	-	-	-
7722	<i>P. sp. 3</i>	Cultivada	-	-	-	-	-
7721	<i>P. sp. 4</i>	Pousio	-	-	-	-	-
7705	<i>P. sp.5</i>	Pousio	-	-	-	-	-
7708	<i>P. sp. 6</i>	Cultivada	-	-	-	-	-
7821	<i>Talaromyces muroii</i> Yaguchi, Someya & Udagawa	Cultivada	-	-	-	-	-
7721	<i>T. verruculosus</i> (Peyronel) Samson, N.	Pousio	-	-	-	-	-

	Yilmaz, Frisvad & Seifert							
7706	<i>T. sp. 1</i>	Pousio	-	-	-	-	-	-

6 DISCUSSÃO

Dentre os recursos naturais fundamentais para o funcionamento dos ecossistemas terrestres, destaca-se o solo (Lourente *et al.*, 2011). Segundo Melloni *et al.* (2008), o solo representa um balanço entre os fatores físicos, químicos e biológicos, cuja fração biológica é composta, principalmente, por micro-organismos. Neste contexto, destacam-se fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Penicillium* e *Talaromyces*. Estes fungos apresentam papel de destaque no solo, por serem excelentes decompositores de matéria orgânica (Schimel *et al.*, 2007; Taniwaki *et al.*, 2015). Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, acredita-se que muitas espécies destes gêneros ainda não tenham sido prospectadas nem descritas (Pitt, 1991).

No presente estudo uma nova espécie de *Talaromyces* e seis novas espécies de *Penicillium* foram encontradas em solos das áreas analisadas. *Talaromyces trapichae*, está sendo proposta como nova espécie para a seção Trachyspermi. Nesta seção estão incluídas espécies que geralmente crescem de forma restrita em CYA e um pouco mais rápido no MEA. Conidióforos são geralmente biverticilados e o ascoma, quando produzido, apresenta cor creme branca ou amarela. Segundo Ylmaz *et al.* (2014) 12 espécies eram aceitas para a seção (*Talaromyces albobiverticillius*, *T. assiutensis*, *T. atroroseus*, *T. austrocalifornicus*, *T. convolutus*, *T. diversus*, *T. erythromellis*, *T. minioluteus*, *T. solicola*, *T. trachyspermus*, *T. ucrainicus*, e *T. udagawae*).

Penicillium mimosum, *P. barbosa*, *P. tintae* e *P. fernandae* estão sendo propostas como novas integrantes para a seção Lanata-divaricata. Essa seção abriga espécies que apresentam rápido crescimento sobre os meios de cultura padrão para o gênero. Poucas são as que apresentam crescimento lento. A maioria dessas espécies são fortemente divaricadas, com métulas surgindo terminalmente, subterminalmente e em posições intercalares, e no último caso, interagindo com conidióforos monoverticilados. Além disso, o ramo terminal geralmente consiste em um prolongamento do eixo principal. Espécies pertencentes à seção Lanata-divaricata são principalmente habitantes do solo, mas também podem ocorrer em folhas em decomposição (Raper e Thom 1949, Houbraken *et al.*, 2011). Muitas espécies desta seção são tolerantes à metais pesados e algumas espécies foram propostas como agentes bioquímicos eficientes na biolixiviação de óxido de zinco, cobre, chumbo e níquel (Burgstaller *et al.*, 1992, Valix *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2008).

A seção Funiculosa (Tom, 1930) foi sinonimizada com a seção Lanata-divaricata, por Houbraken *et al.* (2011). Thom (1930) já havia observado que a seção Funiculosa tem afinidade

com os membros da seção Lanata-típica, sendo a separação destas, uma tarefa difícil. A partir de análise polifásica, realizada por Houbraken *et al.* (2011), pode-se concluir que muitas espécies mencionadas por Thom como integrantes da seção Funiculosa pertencem à seção Lanata-divaricata. De acordo com os autores, a subseção Divaricata, estabelecida por Raper e Thom (1949), corresponde em grande parte à seção Lanata-divaricata.

Penicillium cruzae está sendo proposto como nova espécie para a seção Sclerotiora. Esta seção tem como espécie tipo *Penicillium sclerotiorum* van Beyma. A maioria das espécies que integram essa seção apresentam conidióforos monoverticilados (Houbraken *et al.*, 2011). Entretanto, há exceções. *P. malachitum*, *P. nodositatum* e *P. herquei*, formam conidióforos simetricamente biverticilados. A maioria das espécies apresenta micélio de coloração amarelo à laranja, reverso em tons de amarelo, laranja ou vermelho. Algumas apresentam esclerócios e/ou cleistotécio, de cor brilhante Houbraken *et al.* (2011). *Penicillium cruzae*, apresenta micélio branco e reverso amarelo-alaranjado tanto sobre MEA, quanto sobre CYA.

Penicillium mottae, está sendo proposta como nova espécie para a seção Aspergilloides Houbraken *et al.* (2011). A maioria dos membros desta seção apresenta crescimento acelerado em meios de agar, formando colônias velutíneas. Embora também tenha formado colônias velutíneas, *P. mottae* não apresentou crescimento acelerado, atingindo 27 mm sobre MEA. A maioria das espécies é predominantemente monoverticilada, apresentando vesícula evidente. A espécie proposta no presente trabalho é exclusivamente monoverticilada e vesiculada. Na seção Aspergilloides estão incluídas duas espécies teleomorfas, sendo *P. fuscum* e *P. saturniforme* Houbraken *et al.* (2011).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das principais culturas agrícolas da economia brasileira (Moraes *et al.*, 2016), no entanto estudos sobre as comunidades de fungos presentes em sua rizosfera são escassos.

No presente estudo foi observada alta diversidade de *Penicillium* e *Talaromyces* encontradas nas amostras de solo tanto na área cultivada quanto em pousio. Nesta última, ocorre a prática do derramamento de vinhaça no solo. A vinhaça é o mais importante resíduo gerado pela indústria sucroalcooleira, sobretudo devido ao grande volume produzido. Para a produção de um litro de álcool são gerados cerca de 13 litros de vinhaça. Este resíduo apresenta elevada concentração de nutrientes, principalmente potássio (K), e de matéria orgânica, evidenciando, portanto, alto potencial poluidor. A alternativa mais viável para descarte do resíduo é a aplicação da vinhaça aos solos cultivados com cana-de-açúcar (Barros, 2010). Como efeitos associados à adição de vinhaça ao solo, pode-se destacar a elevação do pH, bem como dos

teores de macronutrientes no solo (Glória e Orlando Filho 1983; Silva *et al.* 2007). Esta prática tem sido associada ao aumento da fertilidade do solo, devido ao fornecimento de nutrientes e incremento de matéria orgânica propiciado pelo resíduo. De fato, no presente estudo observou-se um ligeiro aumento tanto nos valores de pH, quanto na disponibilidade de K, Carbono e matéria orgânica das amostras de solo de pousio. Além disso, a maior oferta de nutrientes neste solo, pode justificar tanto a elevada diversidade de espécies, sobretudo de *Penicillium*, quanto a maior abundância, já que, segundo Glória e Orlando Filho (1983) a vinhaça pode ser o agente causador do aumento da população de micro-organismos no solo.

A teoria do tempo, elaborada por Simpson (1964), afirma que as comunidades tendem a diversificar-se com o tempo. Segundo o autor, as comunidades mais velhas são mais diversas que as mais jovens. Com base nesta teoria pode-se justificar a elevada diversidade de *Penicillium* e *Talaromyces* encontrada nos solos das áreas avaliadas, uma vez que não há rotatividade de culturas, sendo plantada apenas a cana-de-açúcar, desde 1887. A hipótese de Menge e Sutherland (1976), corrobora a teoria do tempo, ao afirmar que as comunidades com alta diversidade surgem de ambientes que são estáveis por longos períodos de tempo. Entretanto, vai além ao afirmar que a elevação da diversidade é o resultado de uma diversificação de nichos, mantidas pela competição (especialização). Em resumo, uma alta diversidade é atribuída a competição intensa que induz à ampliação dos nichos.

Para ambas as áreas (cultivada e em pousio), o índice de equitabilidade de Pielou foi elevado, indicando que as populações das duas comunidades avaliadas estão bem distribuídas entre as amostras analisadas, não havendo desequilíbrio. Entretanto, em ambas as comunidades, há espécies dominantes, com destaque para *Penicillium wotroi*, que foi dominante nas duas áreas. A dominância por *P. wotroi*, indica boa adaptação da espécie aos solos de cultivo de cana-de-açúcar.

De acordo com Alves *et al.* (2011), a fração biológica do solo é dinâmica e facilmente afetada pelo manejo agrícola. Este fato pode ser comprovado para as áreas analisadas, após aplicação da distância de Bray-Curtis (Magurram, 1988), utilizada para visualizar graficamente a proximidade entre as duas comunidades analisadas. Quando aplicada às amostras por coleta, observou-se a formação de dois grandes grupos (área cultivada e área em pousio), indicando a individualidade de cada comunidade. Este fato pode ser observado no dendrograma apresentado na Figura 25. Quando a mesma análise foi aplicada para as espécies, também pode-se observar a formação de dois grandes grupos (área cultivada e área em pousio) e dentro de cada um, a formação de dois subgrupos (Figura 26). Tais agrupamentos podem indicar que as espécies que

estão agrupadas apresentam nichos ecológicos similares na comunidade, estando, portanto, intimamente relacionadas. Provavelmente tais espécies apresentam padrão de exigência nutricional similar.

A análise de componentes principais (ACP) facilita a detecção e interpretação de atributos biológicos em comunidades (Blackith e Reymont, 1971; Reis, 1997), permitindo a verificação da capacidade discriminatória de variáveis originais no processo de formação dos agrupamentos e a interpretação dos resultados expressos pelo valor da correlação entre os atributos (Pimentel *et al.*, 1992). A viabilidade de uma análise de componentes principais pode ser visualizada pela quantidade de informação das variáveis originais retidas pelos três primeiros componentes principais (porcentagem da explicação total das variáveis acumuladas pelos três primeiros componentes).

De acordo com a ACP, na área comunidade do pousio, os principais fatores que exercem influência direta sobre algumas populações são a temperatura, o pH e os teores de carbono e de fósforo, ou seja, a elevação destes fatores contribuem para a elevação das populações influenciadas. Entretanto, as populações de *Talaromyces verruculosum* e *Penicillium* sp. 5 mostraram-se ainda mais sensíveis ao pH. Para a comunidade da área cultivada, os fatores que influenciam a dinâmica populacional são outros. Os teores de Al, Na e Mg apresentaram maior influência sobre algumas populações. Entretanto, a análise destacou a população de *Talaromyces* sp. 1 sob elevada influência dos teores de Al e Mg.

Nos dez últimos anos, espécies do gênero *Penicillium* têm sido relatadas como endofíticas de cana-de-açúcar, bem como isoladas da rizosfera dessa cultura (Stuart, 2006; Mendes, 2008; Fávaro, 2009). Entretanto, no Brasil, estudos taxonômicos e ecológicos sobre as comunidades deste gênero em solos de cultivo de cana-de-açúcar ainda são escassos.

Souza-Motta *et al.* (2003) avaliando a diversidade de fungos presentes na rizosfera de girassol (*Helianthus annuus* L.), cultivado em área de Mata Atlântica, prospectaram e identificaram 49 espécies de fungos filamentosos. Dentre os gêneros encontrados, *Penicillium* foi o mais representativo, com nove espécies *P. citreonigrum*, *P. fellutanum*, *P. janthinellum*, *P. oxalicum*, *P. restrictum*, *P. variabile*, *P. verruculosum*, *P. vinaceum* e *P. waksmanii*. De acordo com os autores, o gênero *Penicillium* é o mais frequente na rizosfera de girassol (*Helianthus annuus* L.) da área analisada. Ao isolarem fungos de rizosfera de meloeiros (*Cucumis melo* L. cv. Gold Mine) cultivados em solos ricos em compostos orgânicos Coutinho *et al.* (2010) identificaram 78 espécies, sendo os gêneros mais abundantes *Aspergillus* e *Penicillium*, com 15 e 13 espécies, respectivamente. Foram identificados *P. citrinum*, *P.*

corylophilum, *P. decumbens*, *P. dierckxii*, *P. griseofulvum*, *P. janthinellum*, *P. pinophilum*, *P. waksmanii*, *P. restrictum*, *P. solitum*, *P. spinulosum* e *P. vinaceum*. Não houve similaridade entre as espécies encontradas no presente estudo e as encontradas nos estudos de Souza-Motta *et al.* (2003) e de Coutinho *et al.* (2010), sugerindo que a cultivar pode selecionar a comunidade de fungos filamentosos presentes no solo.

Em 2007, Gomez e colaboradores avaliaram a diversidade de fungos presentes em solos da Argentina impactados pelo desmatamento da vegetação nativa para a realização de diferentes manejos (Gomez *et al.*, 2007). Os autores encontraram uma maior representatividade de isolados pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, e sugerem que esse resultado esteja relacionado com o antagonismo frente às espécies fitopatogênicas e pela sua baixa exigência nutricional.

Em 2010, Fraga e colaboradores avaliaram a diversidade de espécies da família *Trichocomaceae* presentes em solos de dois sistemas florestais (*Pinus* e *Corymbia*), no Brasil. Os autores obtiveram 190 isolados, distribuídos em 54 espécies. *Penicillium* foi o gênero mais representativo com 32 espécies, tanto para a área plantada com indivíduos do gênero *Pinus* quanto para a área de *Corymbia*. *Penicillium decumbens* foi a espécie de fungo mais abundante, identificada em todas as amostragens nas diferentes condições de temperatura e umidade, independente da cobertura vegetal (Fraga *et al.*, 2010a). Ainda em 2010, Fraga e colaboradores avaliaram a comunidade de fungos do solo de uma duna localizada no Brasil. Os gêneros mais frequentes foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*. Do gênero *Penicillium*, foram identificadas *P. arenicola*, *P. corylophilum*, *P. decumbens*, *P. echinulatum*, *P. javanicum*, *P. miczynskii*, *P. paxilli*, *P. purpurogenum*, *P. sclerotiorum* e *P. simplicissimum*. De acordo com os autores, duas espécies pertencentes a este gênero não foram puderem ser identificadas com base na morfologia (Fraga *et al.*, 2010b). No presente estudo, quando comparado ao trabalho de Fraga *et al.* (2010b), apenas *Penicillium javanicum* e *P. paxilli* foram isolados de solos do cultivo de cana-de-açúcar.

Borges *et al.*, (2011) avaliaram a diversidade de fungos filamentosos que ocorrem em monocultivo de erva-mate, no município de Campo Alegre, SC, Brasil. De acordo com os autores os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram mais frequentes e os únicos que persistiram no solo do erval em todas as estações do ano. Ainda de acordo com autores, *Penicillium* é um gênero cosmopolita envolvido na decomposição de matéria orgânica no solo e antagonista de espécies de fitopatógenos. A predominância desse gênero em solos de tanto de cultivo de erva-mate, quanto em cultivo de cana-de-açúcar pode estar diretamente relacionada à produção de

metabólitos secundários, ou indiretamente, pela competição nutricional e maior produção de esporos.

Fraga *et al.* (2012) avaliaram a diversidade, bem como a sucessão de *Trichocomaceae* em áreas de Mata Atlântica com diferentes níveis de antropização, situadas no Parque Natural no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. As áreas foram classificadas pelos autores como área mais impactada e área menos impactada. Foram isoladas 87 amostras de fungos, distribuídos em quatro gêneros e 22 espécies. Do gênero *Penicillium* foram identificadas 16 espécies, sendo este o gênero mais representativo nas duas áreas estudadas. No presente estudo, foi encontrado o mesmo número de espécies, porém com seis novas para a ciência.

Em 2013, Cruz e colaboradores avaliaram a comunidade de *Penicillium* presentes em solos de remanescente de Mata Atlântica, situada na capital de Pernambuco, Brasil, durante as estações chuvosa e seca. Os autores obtiveram 445 isolados, distribuídos em 17 espécies (Cruz *et al.*, 2013). Comparando com os resultados obtidos neste trabalho para solos de cultivo de cana-de-açúcar, embora com uma riqueza inferior (16 espécies), novas espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* foram encontradas, fato que comprova a relevância da realização de estudos de diversidade microbiana em ambientes pouco ou não estudados, como os solos de cultivo-de-cana-de-açúcar.

Radhakrishnan *et al.* (2014) investigaram a promoção do crescimento de plantas de gergelim (*Sesamum indicum* L.), por isolados de *Penicillium*. De acordo com os autores alguns isolados de fungos avaliados aumentaram significativamente o comprimento da raiz e o peso das mudas frescas e secas, devido à secreção de várias concentrações de aminoácidos (Asp, Thr, Ser, Asn, Glu, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Lys, His, Try e Arg). *Penicillium* sp. NICS01 elevou a quantidade de clorofilas, proteínas, aminoácidos e lignanas nas plantas de gergelim mais do que nos controles. O crescimento das plantas de gergelim foi atenuado pela alta salinidade do solo, e a aplicação de três isolados de *Penicillium* sp. aumentou a sobrevivência da planta. As estirpes RDA01 e NICS01 aumentaram significativamente o comprimento e o peso de mudas frescas e de mudas secas sob condições de estresse salino. Além disso, um estudo *in vitro* com *Penicillium* spp. revelaram sua atividade antagônica em direção aos fungos patogênicos *Fusarium* spp. De acordo com os autores, aplicação exógena do *Penicillium* sp. NICS01 pode atuar como biofertilizante e um agente de controle biológico para melhorar o crescimento das plantas e aumentar a sobrevivência das mesmas contra o estresse salino, bem como contra a infecção por *Fusarium* spp. Diante de tal comprovação podemos inferir que as espécies de *Penicillium* e de *Talaromyces* encontradas em solos de cana-

de-açúcar podem atuar como biofertilizantes, bem como no biocontrole contra fungos fitopatogênicos que ataquem a planta.

Estudos acerca da produção de micotoxinas por fungos isolados de solos, são escassos. De um modo geral, isolados de *Penicillium* relatados como produtores de citrinina (CIT) têm sido isolados de grãos como os de aveia, cevada, milho e trigo ou diretamente de culturas, como a de arroz (Ali *et al.*, 2016; Anjorin *et al.*, 2017). CIT foi primeiramente isolada partir de *Penicillium citrinum*, embora posteriormente, *P. expansum* e *P. verrucosum* também tenham sido reconhecidas como produtoras (Touhame *et al.*, 2018). No presente estudo, *Penicillium citrinum* foi isolado a partir de solo de área em pousio do cultivo de cana-de-açúcar e detectado como produtor de citrinina. Além do *P. citrinum*, *Penicillium wotroi* e *P. paxilli* foram positivos para essa micotoxina. *Penicillium wotroi* foi descrito em 2011 por Houbraken e colaboradores (Houbraken *et al.*, 2011). De acordo com os autores, essa espécie é produtora de ácido pulvilórico e de vários outros compostos não identificados pelos mesmos. O presente estudo, menciona, pela primeira vez a produção de citrinina para *P. wotroi*. Ainda de acordo com os resultados aqui apresentados, *Penicillium paxilli* também isolado de solo em pousio, foi produtor de CIT. Trata-se de uma espécie descrita em 1907 por Bainier. Em 2011, Houbraken e colaboradores a incluíram na seção Citrina e afirmaram que a mesma produzia paxilina e outros seis compostos, porém não relataram a produção de citrinina para a espécie (Houbraken *et al.*, 2011). O presente estudo relata pela primeira vez a produção de citrinina para um isolado de *Penicillium paxilli*.

Apenas para *Penicillium mimosum*, espécie nova, isolada de solo de área cultivada com cana-de-açúcar, a patulina (PAT) foi detectada. Trata-se de um metabólito secundário produzido por diversas espécies de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Gymnoascus* e *Paecilomyces*. Do gênero *Penicillium*, *P. expansum* é reconhecido como o seu maior produtor (Celli *et al.*, 2009; Torovic *et al.*, 2017). A patulina têm sido frequentemente isolada a partir de uma ampla gama de produtos agrícolas, sobretudo durante o armazenamento, bem como durante a processamento (Siddique, 2012). Maçãs, uvas, peras, cerejas, pêssegos, ameixas, feijão, amendoim) e grãos de cereais (como milho, cevada, soja, e sorgo) são considerados altamente favoráveis para a contaminação por PAT (Frank *et al.*, 1977; Machinski Jr e Mídio, 1996; Tangni *et al.*, 2003). Segundo Ji *et al.* (2017), níveis altos de patulina já foram encontrados em produtos industrializados, como em sucos de uva e de maçã, além de produtos à base de maçãs para as crianças. Este metabólito apresenta efeitos tóxicos agudos e crônicos,

sendo também considerado carcinogênico, mutagênico e teratogênico (Zaied *et al.*, 2013; Sarubbi *et al.*, 2016; Hammami *et al.*, 2017).

Nenhuma espécie reconhecidamente ocratoxigênica foi prospectada no presente estudo. Os isolados de espécies de *Penicillium* relatados como produtores de OTA têm sido geralmente isolados isoladas de grãos (Lund e Frisvad, 2003; Darsanaki *et al.*, 2015). Segundo Perrone *et al.*, (2017), embora alguns trabalhos tenham relatado a produção de OTA por outras espécies de *Penicillium* e de *Talaromyces*, apenas *P. verrucosum*, *P. nordicum* e, mais recentemente, *P. thymicola*, são capazes de produzir OTA. De acordo com os referidos autores, para afirmar a produção de OTA por uma espécie, é necessário cumprir algumas etapas, que incluem a detecção por, no mínimo três distintas técnicas. Limay-Rios *et al.* (2017) investigaram a ocorrência de *P. verrucosum* e de ocratoxina A (OTA) em trigo armazenado em fazendas na cidade de Ontário, Canadá, ao longo de três anos consecutivos (2011 a 2014). Foram coletadas 250 amostras de uma média de 30 fazendas durante estações de inverno. As amostras de grãos estavam contaminadas por *P. verrucosum*, quanto por CIT e OTA. De acordo com os autores a umidade elevada favoreceu tanto a contaminação pelo *P. verrucosum*, bem como a produção das micotoxinas avaliadas. Para as espécies avaliadas no também não foram detectadas a presença dos ácidos ciclopiazônico (α -CPA) e penicílico (ACP). O α -CPA é uma micotoxina produzida principalmente por *P. cyclopium* Westling, que tem sido relatada como contaminante de grãos armazenados e produtos de cereais. Já APA, produzida principalmente por *Penicillium puberulum*, também tem sido relatada como contaminante de produtos agrícolas e de queijo suíço e comprovadamente carcinogênica (Diniz, 2007; Diniz, 2015). A não produção de OTA, α -CPA e de ACP pelas linhagens avaliadas no presente estudo sugere que tanto o substrato de isolamento, quanto o clima do ambiente avaliado podem atuar na seleção das espécies de *Penicillium*, bem como nas micotoxinas produzidas pelos mesmos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no presente estudo, pode-se concluir que solos de cultivo de cana-de-açúcar representam excelentes fontes de *Penicillium* e *Talaromyces* e abrigam espécies raras e/ou ainda não descritas pela ciência. Solos cultivados com cana-de-açúcar e solos em pousio apresentam comunidades *Penicillium* e *Talaromyces* distintas, embora apresentem algumas espécies comuns. Ambas as comunidades parecem estar em equilíbrio ecológico. Em solos em pousio, que recebem vinhaça, as comunidades de *Penicillium* e *Talaromyces* são distintas das presentes em solos cultivados com cana-de-açúcar, além de apresentarem um discreto aumento na abundância. Algumas poucas espécies de *Penicillium* isoladas são produtoras de citrinina e patulina, sugerindo tanto o substrato pode atuar como selecionador das espécies dos gêneros avaliados, bem como nas micotoxinas produzidas pelos mesmos.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, dentro das condições experimentais estabelecidas, conclui-se que:

- Dada a carência de pesquisas dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces* em solos cultivados com cana-de-açúcar, abre-se um leque de possibilidades para a descoberta de espécies novas para a ciência;
- Solos de cultivo de cana-de-açúcar são ecossistemas pouco explorados na pesquisa de fungos do gênero *Penicillium* e *Talaromyces* que abrigam novas espécies para esses gêneros;
- As comunidades do gênero *Penicillium* e *Talaromyces* encontradas apresentam-se bem adaptadas em áreas antropizadas pelo cultivo da cana-de-açúcar, estando em equilíbrio ecológico;
- A adubação com vinhaça, no período de pousio, interfere nos teores de potássio e no pH do solo e como consequência favorece a abundância de algumas espécies de *Penicillium* em detrimento de outras espécies do mesmo gênero;
- A alternância entre áreas cultivadas e em pousio no cultivo da cana-de-açúcar possibilita a adaptação e a formação de comunidades dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces* distintas;
- É baixo o potencial de espécies de *Penicillium* isoladas de solos do cultivo de cana-de-açúcar para a produção de CIT, OTA, PAT, CPA, bem como de APA.

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, L. J. **Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos**. Tese de Doutorado. Universidade do Minho, Portugal, Escola de Engenharia, 236, 2008.
- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. **Toxins**, v. 2, p. 1078-1099, 2010.
- AGEITEC (**Agência Embrapa de Informação Tecnológica**). 2016. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar>>. Acesso em: 20 ago. 2016.
- ALBORCH, L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLA, G.; ABARCA, M. L.; CABANES, F. J. Mycobiota and mycotoxin contamination of maize flours and popcorn kernels for human consumption commercialized in Spain. **Food Microbiology**, v. 32, p. 97–103, 2012.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4^a Edição, New York: John Wiley & Sons, 1996. 870 p.
- ALI, N.; BLASZKEWICZ, M.; DEGEN, G. H. Occurrence of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone in urines of German adults. **Archives Toxicology**, v. 89, n. 4, p. 573-578, 2016.
- ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, v. 6, n.8, p. 769-779, 2004.
- ANDRADE, M. C. O. **Nordeste: alternativas da agricultura**. Campinas: Papirus, (Série Educando). Recife: Editora Universitária da UFPE, 1988, 76p.
- ANJORIN, S. T.; FAPOHUNDA, S.; SULYOK, M.; KRASKA, R. Natural Co-occurrence of Emerging and Minor Mycotoxins on Maize Grains from Abuja, Nigeria. **Annals of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 01, n. 1, p. 21–29, 2017.
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Biological indicators of soil quality. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007.
- ARAÚJO, E. A.; RIBEIRO, G. A. Impactos do fogo sobre a entomofauna do solo em ecossistemas florestais. **Natureza e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 75-85, 2005.
- ARAÚJO, R. A.; ARAÚJO, M. S.; GONRING, A. H. R.; GUEDES, R. N. C. Impacto da queima controlada da palhada da cana-de-açúcar sobre a comunidade de insetos locais. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 649-658, 2005.

- ASAN, A.; OKTEN, S. S.; SEN, B. Airborne and soilborne microfungi in the vicinity Hamitabat Thermic Power Plant in Kirklareli City (Turkey), their seasonal distributions and relations with climatological factors. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 164, p. 221–231, 2010.
- AUDE, M. I. S. Estágios de desenvolvimento da cana-de-açúcar e suas relações com a produtividade. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 241-248, 1993.
- AZANIA, C. A. M.; AZANIA, A. A. P. M.; PAVANI, M. C. M. D.; ALVES, P. L. C. A. Desenvolvimento da tiririca (*Cyperus rotundus*) influenciado pela presença e ausência de palha de cana-de-açúcar e herbicidas. **Planta Daninha**, v. 24, n. 1., p. 29- 35, 2006.
- BALASAHEB, W. P.; NEERAJ, S.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A. K. Teratogenic effects of ochratoxin A and aflatoxin B1 alone and in combination on postimplantation rat embryos in culture. **Journal of the Turkish German Gynecology Association**, v. 8, n. 4, p. 357- 364, 2007.
- BARBOSA, L. A. **Impacto de sistemas de cultivo orgânico e convencional da cana-de-açúcar, nos atributos do solo**. Dissertação de Mestrado– Universidade de Brasília, Brasília, 2010.
- BARROS, A. C.; COELHO, R. D.; MARIN, F. R.; MEDEIROS, P. R. F.; AGUIAR NETTO, A. O.; POLZER, D. L. Produtividade da cana-de-açúcar rb83-2847 irrigada em Paranaíba, Paraná. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 6, n. 2, p. 97-105, 2012.
- BARROS, R. P. Diversidade de fungos em um vertissolo com adição de vinhaça na cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Revista Uniabeu**, v. 5, n. 10, p. 181-196, 2012.
- BARROS, R. P.; VIÉGAS, P. R. A.; SILVA, T. L.; SOUZA, R. M.; BARBOSA, L.; VIÉGAS, R. A.; BARRETTO, M. C. V.; MELO, A. S. Alterações em atributos químicos de solo cultivado com cana-de-açúcar e adição de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 3, p. 341-346, 2010.
- BECCI, P. J.; HESS, F. G.; JOHNSON, W. D.; GALLO, M. A.; BABISH, J. G.; DAILEY, R. E. Long-term carcinogenicity and toxicity studies of Patulin in the rat. **Journal of Applied Toxicology**, v. 1, p. 256-261, 1981.
- BERBEE, M. L.; YOSHIMURA, A.; SUGIYAMA, J.; TAYLOR, J. W. Is *Penicillium* monophyletic? An evaluation of phylogeny in the family Trichocomaceae from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequence data. **Mycologia**, v. 87, p. 210–222, 1995.
- Biourge, P. Les moisissures du groupe *Penicillium* Link. **Cellule**, v. 33, p. 7–331, 1923.

- Blackithi, R. E.; Reyment, R. A. **Multivariate Morphometrics**. London: Academic Press, 1971.
- Blackwell, M. The Fungi: 1,2,3...5,1 milion species? **American Journal of Botany**, v. 98, p. 426-238, 2011.
- BORGES, L. R.; LAZZARI, S. M. N.; PIMENTEL, I. C.; NOVA, M, X. V. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 2, p. 185-194, 2011.
- BOVDISOVA, I.; ZBYNOVSKA, K.; KALAFOVA, A.; CAPCAROVA, M. Toxicological properties of mycotoxin citrinin. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science**, v. 5, n. 1, p. 10-13, 2016.
- BROWN, A. L.; ODELL, E. W.; MANTLE, P. G. DNA ploidy distribution in renal tumours induced in male rats by dietary ochratoxin A. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 59, n. 2, p. 85-95, 2007.
- BRUNNER C.; WAHNES, C.; VOGEL, V. Cargo pick-up from engineered loading stations by kinesin driven molecular shuttles. **Lab on a Chip**, v. 7, 1263–1271, 2007.
- BUGNO, A.; ALMODOVAR, A. A. B.; PEREIRA, T. C.; PINTO, T. J. A.; SABINO, M. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 47-51, 2006.
- BULLERMAN, L. B. Interactive effects of temperature and pH on mycotoxin producing molds. **Journal of Food Science**, v. 18, n. 3, p. 197-200, 1985.
- BURDOCK, G. A.; FLAMM, W. G. Safety assessment of the mycotoxin cyclopiazonic acid. **International Journal of Toxicology** 19: 195–218, 2000.
- BURGSTALLER, W.; STRASSER, H.; WÖBKING, H.; SCHINNER, F. Solubilization of zinc oxide from filter dust with *Penicillium simplicissimum*: bioreactor leaching and stoichiometry. **Environmental Science & Technology**, v. 26, p. 340–346, 1992.
- CABAÑES, F. J.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G. Review Ochratoxin A Producing Species in the Genus *Penicillium*. **Toxins**, v. 2, p. 1111-1120, 2010.
- CÂMARA, I. G. Brief history of conservation in the Atlantic Forest. In: Galindo-Leal, C. Leal, Câmara, I. G. (eds.). *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook*. Center for Applied Biodiversity Science and Island Press. Washington, D.C., pp. 31-42, 2003.
- CÂMARA, I. G. *Plano de ação para a Mata Atlântica. Roteiro para a conservação e sua biodiversidade*. Séries Cadernos da Reserva da Biosfera, 1996.

- CASTEGNARO, M.; TOZLOVANU, M.; WILD, C.; MOLINI, A.; SYLLA, A.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, p. 480- 487, 2006.
- CAVALCANTI, M. A. Q.; OLIVEIRA, L. G., FERNANDES, M. A., LIMA, D. M. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 20, n. 4, p. 831-837, 2006.
- CELLI, M. G.; COELHO, A. R.; WOSIACKI, G.; BOSCOLO, M.; CRUZ, C.H.G. Patulin determination in apples with rotten areas. **World Mycotoxin Journal**, v. 2, n. 3, p. 279-283, 2009.
- CERRI, C. C.; FELLER, C.; CHAUVEL, A. Evolução das principais propriedades de um Latossolo VermelhoEscuro após desmatamento e cultivo por doze e cinquenta anos com cana-de-açúcar. **Cah Orston Ser Pédol**, v. 26, p. 37-50, 1991.
- CHEN, A. J.; SUN, B. D.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; YILMAZ, N.; ZHOU, Y. G.; SAMSON, R. A. New *Talaromyces* species from indoor environments in China. *Studies in mycology*, v. 84, p. 119–144, 2016.
- CIEGLER, A.; BECKWITH, A. C.; JACKSON, L. K. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, p. 664-667, 1976.
- CLARK, F. E. Ágar-plate method for total microbial count. In: Black C. A.; Evans; D. D.; White J. L.; Ensminger, L. E.; Clark, F. E.; Dinaver, R. C. (Eds.). *Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties*. **Madson Inc.**, New York, pp. 1460-1466, 1965.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. *Acomp. da safra bras. de cana-de-açúcar*, v. 2 – Safra 2015/16, n. 1 - Primeiro Levantamento, Brasília, abr, 2015.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. *Séries Históricas Cana-de-açúcar Relativas às Safras 2005/06 a 2014/15 de Área Plantada, Produtividade, Produção, Açúcar, Etanol total, Etanol anidro e Etanol hidratado*, 2016.
- CONAB | ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE CANA-DE-AÇÚCAR | v. 4 - Safra 2017/18, n. 2 - Segundo levantamento, agosto de 2017.
- COUTINHO, F. P.; CAVALCANTI, M. A. Q.; YANO-MELO, A. M. Filamentous fungi isolated from the rhizosphere of melon plants (*Cucumis melo* L. cv. Gold Mine) cultivated in soil with organic amendments. **Acta Botânica Brasílica**, v. 24, n. 1, p. 292-298, 2010.

- Cruz, R.; Lima, J. S.; Fonseca, J. C.; Fernandes, M. J. S.; Lima, D. M. M.; Duda, G. P.; Moreira, K. A.; Souza-Motta, C. M. Diversity of Filamentous Fungi of Area from Brazilian Caatinga and High-Level Tannase Production Using Mango (*Mangifera indica* L.) and Surinam Cherry (*Eugenia uniflora* L.) Leaves under SSF. **Advances in Microbiology**, v. 3, p. 52-60, 2013b.
- Cruz, R.; Santos, C.; Lima, J. S.; Moreira, K. A.; Souza-Motta, C. M. Diversity of *Penicillium* in soil of Caatinga and Atlantic Forest areas of Pernambuco, Brazil: an ecological approach. **Nova Hedwigia**, v. 97, p. 543–556, 2013a.
- ČULIG, B.; BEVARDI, M.; BOŠNIR, J.; SERDAR, S.; LASIĆ, D.; RACZ, AL.; GALIĆ, A.; KUHARIĆ, Z. Presence of citrinin in grains and its possible health effects. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 14, n. 3, p. 22-30, 2017.
- DANTAS-NETO, J.; FIGUEREDO, J. L. C.; FARIAS, C. H. A.; AZEVEDO, H. M.; AZEVEDO, C. A. V. Resposta da cana-de-açúcar, primeira soca, a níveis de irrigação e adubação de cobertura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, n. 2, p. 283–288, 2006.
- DEAN, W. **A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira**. Companhia das Letras, São Paulo, 1996.
- DEMIREL, R.; SARIOZLU, N. Y.; İLHAN, S. Polymerase chain reaction (PCR) identification of terverticillate *Penicillium* species isolated from agricultural soils in eskişehir province. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 56: 980-984, 2013.
- DINIZ, S. P. S. S. Formação de micotoxinas. **Revista Grãos Brasil**, v. 12, p. 26-28, 2005.
- DINIZ, S. P. S. S. Micotoxinas. Ed. Livraria e Ed. Rural, Campinas, 189p, 2007.
- DINIZ, S. P. S. S. **Mycotoxins? Biochemical Approach**. Ed. Albatroz, Rio de Janeiro, 186 p., 2015.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. *Compendium of soil fungi*. San Francisco: IHW – Verlag, 1993.
- DOUGHARI, J. H. The Occurrence, Properties and Significance of Citrinin Mycotoxin. **Journal Plant Pathology & Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 1-6, 2015.
- EMBRAPA, 2007. **Estoques de carbono e nitrogênio num argissolo amarelo cultivado com cana-de-açúcar: influência da queima ou manutenção da palhada**. Seropédica, RJ.
- ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasse: characterization and treatments. **Waste Manage**, v. 29, p. 1235–1250, 2011.

- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Worldwide regulations for mycotoxins, 1997.
- FÁVARO, L. C. L. Diversidade e interação de *epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 291 p., 2009.
- FERRARI, J. T. **Ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar**. Documento Técnico 005. 2010. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/dt/ferrugem_cana.pdf. Acesso em 20 ago. 2016.
- FIGUEIREDO, E. B.; LA SCALA JUNIOR, N. Greenhouse gas balance due to conversion of sugarcane areas from burned to green harvest in Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 141, n. 1-2, p. 77-85, 2011.
- FONSECA, G. A. B. The vanishing Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 34, p. 17-34, 1985.
- FONSECA, G. A. B., RYLANDS A. B., PAGLIA A. P., MITTERMEIER R. A. Hotspots Revisited: Earth’s Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. In: Mittermeier, R.A., Gil, P.R., Hoffmann, M., Pilgrim, J., Brooks, C.G., Mittermeier, Lamourux, J., Fonseca, G.A.B., (Eds.). **Cemex**. Washington, DC, pp. 84-88, 2004.
- FRAGA, M. E.; PEREIRA, M. G. Diversidade de Trichocomaceae Isolada de Solo e Serrapilheira de Floresta Atlântica. **Floresta e Ambiente**, v. 19, n. 4, p. 405-413, 2012.
- FRAGA, M. E.; PEREIRA, M. G.; BARBOSA, D.J.; MELO, M. P. Diversity of isolated *Trichocomaceae* from soil in two forest ecosystems. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 1, p. 167-175, 2010a.
- FRAGA, M. E.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, F. A. Micobiota do Solo de uma Área de Duna na Restinga da Marambaia, Rio de Janeiro, RJ. **Floresta e Ambiente**, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2010b.
- FRANK, H. K. Patulin in lebensmittein pflanzlicher herkunft. 1 Kernobst und daraus hergestellte produkte. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 162, p. 149-157, 1976.
- FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba, Agropecuária, 2000.
- FRISVAD, J. C.; LUND, F.; ELMHOLT, S. Ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum* isolates from cereals reveal large AFLP fingerprinting variability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 684–692, 2005.

- FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1–173, 2004.
- FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T. O.; SAMSON, R. A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 201-242, 2004.
- FUESS, L.T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, v. 145, n. 1, p. 210-229, 2014.
- GARBEVA, P.; VEEN, J. A. V.; ELSAS, J. D. V. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42: 243–270, 2004.
- GLASER, N., STOPPER, H. Patulin: mechanism of genotoxicity. **Food Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1796–1801, 2012.
- GLÓRIA, N. A.; ORLANDO FILHO, J. **Aplicação de vinhaça como fertilizante**. São Paulo, Coopersucar, 1983.
- GOMEZ, E. R.; PIOLI, R.; CONTI, M. Fungal abundance and distribution as influenced by clearing and land use in a vertic soil of Argentina. **Biology and Fertility Soils**, v. 43, p. 373-377, 2007.
- GRISHKAN, I.; NEVO, E. Soil microfungus communities of ‘Evolution Canyons’ in Israel – extreme differences on a regional scale. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 93, n. 1, p. 157-163, 2008.
- GUEVARA-SUAREZ, M.; SUTTON, D. A.; GENÉ, J.; GARCÍA, D.; WIEDERHOLD, N.; GUARRO, J.; CANO-LIRA, J. F. Four new species of *Talaromyces* from clinical sources. **Mycoses**, v. 60, p. 651–662, 2017.
- GUTAROWSKA, B.; KOSMOWSKA, M.; WISZNIEWSKA, M.; PALCZYŃSKI, C.; WALUSIAK-SKORUPA, J. An investigation of allergenic proteins produced by moulds on building materials. **Indoor and Built Environment**, v. 21, p. 253-263, 2012.
- HAMMAMI, W.; AL THANI, R.; FIORI, S.; AL-MEER, S.; ATIA, F. A; RABAH, D.; MIGHELI, Q.; JAOUA, S. Patulin and patulin producing *Penicillium* spp. occurrence in apples and apple-based products including baby food. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n. 4, p. 343-349, 2017.

- HASSEN, W.; ABID, S.; ACHOUR, A.; CREPPY, E.; BACHA, H. Ochratoxin A and β 2-microglobulinuria in healthy individuals and in chronic interstitial nephropathy patients in the Centre of Tunisia: a hot spot of Ochratoxin A exposure. **Chemical Research in Toxicology**, v. 199, n. 2-3, p. 185-193, 2004.
- HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycology Research**, v. 95, p. 641-655, 1991.
- HAYASHI, Y.; YOSHIZAWA, T. Analysis of cyclopiazonic acid in corn and rice by a newly developed method. **Food Chemistry** v. 93, p. 215–221, 2005.
- HEATH, M. C. Nonhost resistance and non-specific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, p. 315-319, 2003
- HEPERKAN, D.; SOMUNCUOGLU, S.; KARBANCIOGLU-GÜLER, F.; MECIK, N. Natural contamination of cyclopiazonic acid in dried figs and cooccurrence of aflatoxin. **Food Control**, v. 23, p. 82–86, 2012.
- HIROTA, M. M. Monitoring the Brazilian Atlantic Forest cover. In: Galindo-Leal, C. & Câmara, I.G. (Eds.). *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook*. Washington, D.C., **Center for Applied Biodiversity Science and Island Press**. pp. 60-65, 2003.
- HOELTZ, M.; FAGUNDES, C. A.; ALCAYAGA, E. A. L.; NOLL, I. B. Micobiota e micotoxinas em amostras de arroz coletadas durante o sistema estacionário de secagem e armazenamento **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 803-808, 2009.
- HOLZAPFEL, C. W. The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* westling. **Tetrahedron**, v. 24, p. 2101-2119, 1968.
- 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.
- IARC. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans**. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Vol. 56, Lyon, World Health Organization, 1993.
- JI, X.; LI, R.; YANG, H.; QI, P.; XIAO, Y.; QIAN, M. Occurrence of patulin in various fruit products and dietary exposure assessment for consumers in China. **Food Control**, v. 78, p. 100 -107, 2017.
- KAHMANN, R., BASSE, C. Fungal expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 374-80, 2001.

- KAWASHIMA, L. M.; VIEIRA, A. P.; SOARES, L. M. V. Fumonisin B₁ and ochratoxin A in beers made in Brazil. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 2, p. 317-323, 2007.
- KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. **Toxins**, v. 2, p. 461-493, 2010.
- KIMPE, C. R.; WARKENTIN, B. P. Soil functions and the future of natural resources. In.: Blume, H.P.; Eger, H.; Fleishhauer, E.; Hebel, A.; Reij, C.; Steiner, K.G., editors. Towards sustainable land use – Furthering cooperation between people and institutions. **Advances in Geocology**, v. 31, p. 3-10, 1998.
- KIRSCH, P. F. Production of a genomic DNA library in lambda phage for *Penicillium patulum*, and isolation and partial characterization of Patulin pathway induction-phase-specific clones from the library. Dissertation Abstracts International. **Ann Arbor Journal**, v. 50, n. 8, p. 3452, 1990.
- KLEIN, V. A.; LIBARDI, P. L.; SILVA, A. P. Resistência mecânica do solo à penetração sob diferentes condições de densidade e teor de água. **Revista Engenharia Agrícola**, v. 19, p. 45-54, 1998.
- KUREK, E.; KORNİŁŁOWICZ-KOWALSKA, T.; SLOMKA, A.; MELKE, J. Characteristics of soil filamentous fungi communities isolated from various micro-relief forms in the high Arctic tundra (Bellsund region, Spitsbergen). **Polish Polar Research**, v. 28, n. 1, p. 57-73, 2007.
- LANSDEN, J. A.; DAVIDSON, J. I. Occurrence of cyclopiazonic acid in peanuts. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 45, p. 766-769, 1983.
- LASRAM, S.; BELLÍ, N.; CHEBIL, S.; NAHLA, Z.; AHMED, M.; SANCHIS, V.; GHORBEL, A. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 376-379, 2009.
- LEONG, S. L.; HIEN, L. T.; NA, T. V.; TRANG, N. T.; HOCKING, A. D.; ŠCOTY, E. S. Ochratoxin A-producing aspergilli in Vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 301-306, 2007.
- LI, X. M.; LIAO, D. X.; XU, X. Q.; YANG, Q.; ZENG, G. M.; ZHENG, W.; GUO, L. Kinetic studies for the biosorption of lead and copper ions by *Penicillium simplicissimum* immobilized within loofa sponge. **Journal of Hazardous Materials**, v. 159, p. 610-615, 2008.

- LIMAY-RIOS, V.; MILLER, J. D.; SCHAAFSMA, A. W. Occurrence of *Penicillium verrucosum*, ochratoxin A, ochratoxin B and citrinin in onfarm stored winter wheat from the Canadian Great Lakes Region. **Plos One**, v. 12, n. 7, p. 1-22, 2017.
- LINO, C. M.; BAETA, M. L.; HENRI, M.; DINIS, A. M. P.; PENA, A. S.; SILVEIRA, M. I. N. Levels of ochratoxin A in serum from urban and rural Portuguese populations and estimation of exposure degree. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 879-885, 2008.
- LOBUGLIO, K. F.; PITT, J. I.; TAYLOR, J. W. Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual *Penicillium* species in subgenus Biverticillium. **Mycologia**, v. 85, p. 592–604, 1993.
- LOBUGLIO, K. F.; TAYLOR, J. W. Molecular phylogeny of *Talaromyces* and *Penicillium* species in subgenus Biverticillium. In: The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematic (Reynolds, D.R., Taylor, J.W., eds), C.A.B., **International Surrey**, 1993.
- LOPES, F. S.; RIBEIRO, H. Mapeamento de internações hospitalares por problemas respiratórios e possíveis associações à exposição humana aos produtos da queima da palha de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, n. 2, p. 215-225, 2006.
- LUND, F., FRISVAD, J. C. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1117–1123, 2003.
- MACHINSKI, J. R. M., MÍDIO, A. F. Incidência de Patulina en jugo de manzana industrializado. **Alimentaria**, v. 276, p. 61-64, 1996.
- MACIEL, J. M. L. **Fungos filamentosos isolados do solo do Parque Nacional Serra das Confusões, Piauí, Brasil**. Dissertação de Mestrado em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 51 p., Recife, 2008.
- MAGNOLI, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L. M.; FERNÁNDEZ-JURI, G.; BARBERIS, C., DALCERO, A. M. Ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in peanut seeds at different months of storage in Córdoba, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p. 213–218, 2007.
- MAGURRAN, M. E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton, University Press, 1988.
- MARAGOS, C. M.; SIEVE, K. K.; BOBELL, J. Detection of cyclopiazonic acid (CPA) in maize by immunoassay. **Mycotoxin Research**, v. 33, n. 2, p. 157-165, 2017.

- MARKOVINA, A. L.; PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; CARTER, D. A.; MCGEE, P. A. Diversity of the Trichocomaceae in the Katandra Nature Reserve, Central Coast, NSW, Australia. **Mycological Research**, v. 109, n., p. 964–973, 2005.
- MARTINS, M. D.; CAMPOS, D. T. Qualidade Microbiológica do Solo Fertirrigado com Vinhaça. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 9, n. 2, p. 273 – 282, 2011.
- MATSUZAWA, T.; TAKAKI, G. M. C.; YAGUCHI, T.; OKADA, K.; GONOI, T.; HORIE, Y. Two new species of *Aspergillus* section Fumigati isolated from caatinga soil in the State of Pernambuco, Brazil. **Mycoscience**, v. 55, p. 79-88, 2014.
- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L.S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.
- MELLONI, R.; MELLONI, E. G. P.; VIEIRA, L. L. Uso da terra e a qualidade microbiana de agregados de um latossolo vermelho-amarelo. **Revista Brasileira Ciências do Solo**, v. 37, p. 1678-1688, 2013.
- MELO, W. J. **Matéria orgânica, nitrogênio e enxofre: curso de atualização em fertilidade do solo**. Jaboticabal: ANDA, 1978.
- MENDES, R. Diversidade e caracterização genética de comunidades endofíticas associadas à cana-de-açúcar. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 119 p, 2008.
- MENGE, B. A.; SUTHERLAND, J. P. Species Diversity Gradients: Synthesis of the Roles of Predation, Competition, and Temporal Heterogeneity. **The American Naturalist**, v. 110, n. 973, p. 351-369, 1976.
- METZGER, J. P. **Ecologia de paisagens fragmentadas**. Tese de Livre Docência, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- MILLER, C. D.; RICHARD, J. L.; OSWEILER, G. D. Cyclopiazonic acid toxicosis in young turkeys: clinical, physiological, and serological observations. **Toxin Review**, v. 30, p. 42–46, 2011.
- MITTERMEIER, R. A.; ROBLE-GIL.; P, HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOREUX, J.; FONSECA, G. A. B. **Hotspots revisited**. CEMEX and Agrupación Sierra Madre, 2004.
- MITTERMEIER, R. A.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A.; MITTERMEIER, C. G. Atlantic Forest. In: Mittermeier, R.A., Myres, N., Gil, P.R., Mittermeier, C.G. (Eds.). *Earth’s Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions*. Washington, DC., **Cemex**, pp. 136-147, 1999.

- MITTERMEIR, R. A.; WERNER, T.; AIRES, J. M.; FONSECA, G. A. B. O país da megadiversidade. **Ciência Hoje**, v. 14, n. 81, p. 20-27, 1992.
- MMA. **Diretrizes para a Política de Conservação e Desenvolvimento Sustentável da Mata Atlântica**. Brasília-DF, 1998.
- MMA. **Mata Atlântica: patrimônio nacional dos brasileiros**. Brasília-DF, 408p, 2010.
- MORAES, E. R. DOMINGUES, L. A. S.; MEDEIROS, M. H.; PEIXOTO, J. V. M.; LANA, R. M. Q. Produtividade e características agronômicas da cana-de-açúcar em diferentes sistemas de preparo do solo. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 3, n. 1, p. 27–32, 2016.
- MOTTA, S.; SOARES, L. M. V. Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acid into tomato products. **Food Chemistry**, v. 71, p. 111-116, 2000.
- MOTTA, S.; SOARES, L. M. V. Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. **Journal Food Additives & Contaminants** v. 18, n. 7, p. 630-634, 2001.
- MOUNJOUENPOU, P.; GUEULE, D.; FONTANA-TACHON, A.; GUYOT, B.; TONDJE, P.R.; GUIRAUD, J. Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 234-241, 2008.
- Moura, F.B.P. **A Mata Atlântica em Alagoas**. Maceió, EDUFAL, 88p, 2006.
- MURUGAN, K. S.; SARAVANABABU, M.; ARUNACHALAM, M. Screening of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 946-949, 2007.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, K. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-845, 2000.
- NAZIR, R.; WARMINK, J. A.; BOERSMA, H.; VAN ELSAS, J. D. Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 71, p. 169–185, 2010.
- OGAWA, H.; YOSHIMURA, A.; SUGIYAMA, J. Polyphyletic origins of species of the anamorphic genus *Geosmithia* and the relationships of the cleistothecial genera: Evidence from 18S, 5S and 28S rDNA sequence analyses. **Mycologia**, v. 89, p. 756–771, 1997.
- OLIVEIRA, A. P. P.; LIMA, E.; ANJOS, L. H.C.; ZONTA, E.; PEREIRA, M. G. Sistemas de colheita da cana-de-açúcar: Conhecimento atual sobre modificações em atributos de solos de tabuleiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 9, p. 939–947, 2014.

- OLIVEIRA, C. A.; ROSMANINHO, J.; ROSIM, R. Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 2, 196–201, 2006.
- OLIVEIRA, L. G.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S., LIMA, D. M. M. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 95, p. 49-54, 2013.
- ONIONS, A. H. S.; BRADY, B. L. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In: Peberdy, J.F. (Ed.) Biotechnology Handbooks 1 *Penicillium* and *Acremonium*. New York and London, **Plenum Press**, pp. 1-36, 1987.
- OSTRY, V.; MALIR M.; RUPRICH, J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. **Toxins** 5:1574–1586, 2013.
- PALMA, N.; CINELLI, S.; SAPORA, O.; WILSON, S. H.; DOGLIOTII, E. Ochratoxin A-Induced Mutagenesis in Mammalian Cells Is Consistent with the Production of Oxidative Stress. **Chemical Research Toxicology**, v. 20, n. 7, p. 1031–1037, 2007.
- PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research International**, v. 43, p. 1902–1914, 2010.
- PEREIRA, G. G. S. ALBRECHT, A. J. P.; FAUSTO, D. A.; MIGLIAVACCA, R. A. Cost of sugarcane production in the State of Mato Grosso do Sul. **Revista iPecege**, v. 1, n. 1, p. 81-102, 2015.
- PERRONE, G.; LOGRIECO, A. F.; FRISVAD, J. C. Comments on “Screening and Identification of Novel Ochratoxin A-Producing Fungi from Grapes. *Toxins* 2016, 8, 333” — In Reporting Ochratoxin A Production from Strains of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces*. **Toxins**, v. 9, n. 65, p. 1-5, 2017.
- PETERSON, S.W. *Phylogenetic analysis of Penicillium species based on ITS and LSU-rDNA nucleotide sequences*. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification (Samson RA, Pitt JI, Eds) New York. **Plenum Press**, 2000.
- Pimentel, M.S., Oliveira, N.G., Costa, J.R., Almeida, D.L., De-Polli, H. Atributos químicos e microbianos do solo sob diferentes manejos no município de Seropédica, RJ. **Revista Brasileira Agrocência**.v.14, n. 2, p. 307-317, 2008.
- PINTO-COELHO, R. M. **Fundamentos em Ecologia**. São Paulo, Artmed, 2002.
- PITT, J. I. **The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces***. London, Academic Press, 1979.

- 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. (Eds). *Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification*. Amsterdam, Harwood Academic Publishers, 2000.
- PITT, J.I. **A laboratory Guide to Common *Penicillium* Species**. North Wales, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing, 1991.
- PLEADIN, J.; ZADRAVEC, M.; LEŠIĆ, T.; VAHČIĆ, N.; FRECE, J.; MITAK, M.; MARKOV, K. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in unprocessed cereals established during a threeyear investigation period. **Journal Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 11, n. 1, p. 20-25, 2017.
- PRADE, C. A. **Aspectos ecológicos de comunidades fúngicas de solo em ambientes ripários com diferentes formas de manejo**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.
- RADHAKRISHNAN, R., KANG, S., BAEK, I., LEE, I. Characterization of plant growth-promoting traits of *Penicillium* species against the effects of high soil salinity and root disease. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 754-762, 2014.
- RAO, B. L.; HUSAIN, A. Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing ‘koduapoisoning’ inmanandits production by associated fungi. **Mycopathologia**, v. 89, p.177–180, 1985.
- RAPER, K. B.; ALEXANDER, D. F. Preservation of molds by lyophil process. **Mycology**, v. 37, n. 4, p. 499-525, 1945.
- RAPER, K. B.; THOM, C. **A manual of the *Penicillia***. Baltimore, USA, Williams and Wilkins, 1949.
- REDIN, M.; SANTOS, G.F.; MIGUEL, P.; DENEGA, G.L.; LUPATINI, M.; DONEDA, A.; SOUZA, E. L. Impactos da queima sobre atributos químicos, físicos e biológicos do solo. **Ciência Florestal**, v. 21, n. 2, p. 381-392, 2011.
- REIS, E. **Estatística multivariada aplicada**. Lisboa, Edições Silabo, 1997.
- RIBA, A.; MOKRANE, S.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAOU, N. Mycoflora and Ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 85-92, 2008.
- RIBEIRO, P. H. P.; LELIS NETO, J. A. L.; TEIXEIRA, M. B.; GUERRA, H. O. C.; SILVA, N.F.; CUNHA, F. N. Distribuição de potássio aplicado via vinhaça em latossolo vermelho

amarelo e nitossolo vermelho. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 8, n. 5, p. 403-410, 2014.

RICHARD, J. L.; PAYNE, G. A. (Eds). Mycotoxins risks in plant, animal, and human systems. Task Force Report 139. Council for Agricultural Science and Technology (CAST), **Ames**, 65 pp, 2003.

RILEY, R.T.; GOERGER, D. E.; NORRED, W. P. Disruption of calcium homeostasis: the cellular mechanism of cyclopiazonic acid toxicity in laboratory animals. In: Eklund M, Richard, J.L., Mise, K. (Eds) Molecular approaches to food safety issues involving toxic microorganisms. Alaken, Inc., **Fort Collins**, pp 461–480, 1995.

RODELLA, A. A.; ZAMBELLO, J. R.; ORLANDO FILHO, J. O. Calibração de análises de fósforo e potássio no solo em cana-de-açúcar: 2ª aproximação. **Saccharum**, v. 28, n. 1, p. 39-42, 1983.

RODRIGUES, J. D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu, Unesp, 1995.

ROESCH, L. F. W.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A. K. M.; KENT, A. D. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, v. 1, p. 283-290, 2007.

ROHLF, F. J.; FISHER, D. L. Test for hierarchical structure in random data sets. **Systematic Zoology**, v. 17, p. 407-412, 1968.

ROMÃO, A. S. Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar e estudo da interação *Trichoderma virens* - planta hospedeira. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 270 p, 2010.

ROSSIELLO, M. R.; ROTUNNO, C.; COLUCCIA, A.; CARRATÙ, M. R.; DI SANTO, A.; EVANGELISTA, V.; SEMERARO, N.; COLUCCI, M. Ochratoxin A inhibits the production of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 by human blood mononuclear cells: another potential mechanism of immune-suppression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 229, n. 2, p. 227-231, 2008.

SAITO, C. H. **Educação Ambiental Probio: Livro do Professor**. Brasília: MMA, Departamento de Ecologia da UnB, 2006.

SAMSON, R. A.; SEIFERT, K. A. The ascomycete genus *Penicillium* and its anamorphs. In: Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematic (Samson RA, Pitt JI, Eds.) New York, **Plenum Press**, 1985.

- SAMSON, R. A.; VARGA, J.; WITIAK, S. M.; GEISER, D. M. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 71-73, 2007.
- SAMSON, R. A.; YILMAZ, N.; HOUBRAKEN, J.; SPIERENBURG, H.; SEIFERT, K. A.; PETERSON, S.W.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 159–183, 2011.
- SÁNCHEZ, P. L.; NIJS, M.; SPANJER, M.; PIETRIC, A.; BERTUZZI, T.; STARSKI, A.; POSTUPOLSKI, J.; CASTELLARI, M.; HORTÓS, M. Generation of occurrence data on citrinin in food. **External Scientific Report**, p. 1-47, 2017.
- SARUBBI, F.; FORMISANO, G.; AURIEMMA, G.; ARRICHIELLO, A.; PALOMBA, R. Patulin in homogenized fruit's and tomato products. **Food Control**, v. 59, p. 420-423, 2016.
- SAVA, V.; REUNOVA, O.; VELASQUEZ, A.; SANCHEZ-RAMOS, J. Can low level exposure to ochratoxin-A cause parkinsonism? **Journal of the Neurological Sciences**, v. 249, p. 68-75, 2006.
- SCHIMEL, J.; BALSER, T. C.; WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. **Ecology**, v. 6, n. 88, p. 1386-1394, 2007.
- SEKIYAMA, B. L.; RIBEIRO, A. B.; MACHINSKI, P. A.; MACHINSKI JUNIOR, M. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em produtos alimentícios à base de milho. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 289-294, 2005.
- SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. Mycotoxins and Phytoalexins. **Boca Raton, FL: CRC Press**. Smith, J.E., and R.S. Henderson (Eds.), 1991.
- SHIH, S. F., GASCHO, G. J. Sugarcane stalk distribution in two row spacings. In: *Congress of the international society of sugar cane technologists*, 17. Manila, *Proceedings. ISSCT*. p.38-51,1980.
- SIDDIQUE, M. H. **Study of the biosynthesis pathway of the geosmin in *Penicillium expansum***, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2012.
- SILVA, A. A.; NANNI, M. R.; SILVA JUNIOR, C. A.; ROMAGNOLI, F. CHICATI, M. L., GASPAROTTO, A. C. Diferentes grades de amostragem para avaliação de atributos químicos do solo na distribuição espacial em áreas de cana-de-açúcar. **Agrarian Academy**, v. 1, n. 1, p. 159-171, 2014.

- SILVA, A. P. M.; BONO, J. A. M.; PEREIRA, F. A. R. Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* v. 18, n. 1, p. 38-43, 2014.
- SILVA, M. A. A.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* v. 11, n. 1, p. 108–114, 2007.
- SIMPSON, G. G. Species density of North American recent mammals. *Systematic Zoology*, v. 13, p. 57-73, 1964.
- SMITH, E. E.; DUFFUS, E. A.; SMALL, M. H. Effects of patulin on postimplantation rat embryos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 25, p. 267-270, 1993.
- SOUZA, A. M. O. Atributos de solos sob uso de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar em Pernambuco Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2014.
- SOUZA, Z. M.; PRADO, R. M.; PAIXÃO, A. C. S.; CESARIN, L. G. Sistemas de colheita e manejo da palhada de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 40, n. 3, p. 271-278, 2005.
- SOUZA-MOTTA, C. M.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M.; NASCIMENTO, J. P.; LARANJEIRA, D. Identification and Characterization of filamentous fungi isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolyse inulin. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 273-280, 2003.
- STOEV, S. D.; DENEV, S.; DUTTON, M. F.; NJOBEH, P. B.; MOSONIK, J. S.; STEENKAMP, P. A. PETKOV, I. Complex etiology and pathology of mycotoxic nephropathy in South African pigs. *Mycotoxin Research*, v. 26, p. 31–46, 2010b.
- STOLK, A. C.; SAMSON, R.A. The genus *Talaromyces* – studies on *Talaromyces* and related genera II. *Studies in Mycology*, v. 2, p. 1–65, 1972.
- STOLK, A. C.; SAMSON, R. A. A new taxonomic scheme for *Penicillium* anamorphs. In: *Advances in Penicillium and Aspergillus systematic* (Samson RA, Pitt JI, eds) New York **Plenum Press**, 1985.
- STOTZ, H. U.; LONG, S. R. Expression of the pea (*Pisum sativum* L) alpha-tubulin gene is correlated with cell division activity. *Plant Molecular Biology*, 41, p. 1-14, 1999.

- STUART, R. M. *Comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 66 p, 2006.
- STUART, R. M.; ROMAO, A. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Culturable endophytic filamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinonetolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. *Archives Microbiology*, v. 192, p. 307–313, 2010.
- SURAI, P. F.; MEZES, M.; MELNICHUK, S. D.; FOTINA, T. I. Mycotoxins and animal health: from oxidative stress to gene expression. *KRMIVA*, v. 1, p. 35-43, 2008.
- TANGNI, E. K.; THEYS, R.; MIGNOLET, E.; MAUDOUX, M., MICHELET, J. Y., LARONDELLE, Y. Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Additives and Contaminants*, v. 20, n. 5, p. 482-489, 2003.
- TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; IAMANAKA, B. T.; MASSI, F. P.; FUNGARO, M. H. P.; FRISVAD, J. C. *Penicillium excelsum* sp. nov from the Brazil Nut Tree Ecosystem in the Amazon Basin’. *PLoS ONE*, v. 10, n. 12, p. 1-11, 2015.
- TAVARES, O. C. H.; LIMA, E.; ZONTA, E. Crescimento e produtividade da cana planta cultivada em diferentes sistemas de preparo do solo e de colheita. *Acta Scientiarum: Agronomy*, v. 32, n. 1, p. 61-68, 2010.
- Thom, C. *The Penicillia*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1930.
- TOLJANDER, J. F.; PAUL, L.; LINDAHL, B. D.; ELFSTRAND, M.; FINLAY, R. D. Influence of AM fungal exudates on bacterial community structure. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 61, p. 295-304, 2007.
- TOROVIĆ, L.; DIMITROVA, N.; ASSUNÇÃO, R.; ALVITOC, P. Risk assessment of patulin intake through apple-based food by infants and preschool children in Serbia. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 34, n. 11, p. 1-10, 2017.
- TORSVIK, V.; OVERAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in Microbiology*, v. 5, p. 240-245, 2002.
- TOUHAMI, N.; SOUKUP, S. T.; SCHMIDT-HEYDT, M.; KULLING, S. E., GEISEN, R. 2018. Citrinin as an accessory establishment factor of *P. expansum* for the colonization of apples. *International Journal of Food Microbiology*, v. 266, p. 224–233, 2018.

- TOUHAMI, N.; SOUKUP, S. T.; SCHMIDT-HEYDT, M.; KULLING, S. E.; GEISEN, R. Citrinin as an accessory establishment factor of *P. expansum* for the colonization of apples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 224-233, 2018.
- TOZLOVANU, M.; FAUCET-MARQUIS, V.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R. A. Genotoxicity of the hydroquinone metabolite of ochratoxin A: Structure-activity relationships for covalent DNA adduction. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, p. 1241–1247, 2006.
- TUSZYNSKI, J. A.; CARPENTER, E. J.; HUZIL, J. T.; MALINSKI, W.; LUCHKO, T.; LUDUEÑA, D. F. The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 50, p. 341-358, 2006.
- ÚNICA. Revisão de safra 2013/2014. Disponível em: <file:///C:/Users/usuario/Downloads/bb4122e0e20824d051103cd9f3064eba.pdf>. Acesso em 20 ago 2016.
- URANO, T.; TRUCKSESS, M. W.; MATUSIK, J.; DORNER, J. W. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts. **Journal of AOAC International**, v. 75, p. 319–322, 1992.
- VALIX, M.; TANG, J. Y.; MALIK, R. Heavy metal tolerance of fungi. *Minerals Engineering*, v. 14, p. 499–505, 2001.
- VALLADARES-PADUA, C. B.; MARTINS C. S.; RUDRAN, R. *Manejo integrado de espécies ameaçadas*. In: Cullen Jr., L., Rudran R., Valladares-Padua, C. (Orgs.). Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre. Curitiba, **Editora da UFPR**, pp. 647-664, 2003.
- VEZZANI, F. M.; MIELNICZUK, J. Agregação e estoque de carbono em argissolo submetido a diferentes práticas de manejo agrícola. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 35, p. 213-223, 2009.
- VINOKUROVA, N. G.; IVANUSHKINA, N. E.; KHMEL'NITSKAYA II, ARINBASAROV, M.U. Synthesis of α -cyclopiazonic acid by fungi of the genus *Aspergillus*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, p. 435–438, 2007.
- VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S. B.; KLASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCH, T.; SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.

- WAKELIN, S. A.; MACDONALD, L. M.; ROGERS, S. L.; GREGG, A. L.; BOLGER, T. P.; BALDOCK, J. A. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 803–813, 2008.
- WANG, L.; ZHUANG, W-Y. Phylogenetic analyses of penicillia based on partial calmodulin gene sequences. **Biosystems**, 88, p. 113–126, 2007.
- WANGIKAR, P. B.; SINHA, N.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A. K. Teratogenic Effects of Ochratoxin A and Aflatoxin B1 Alone and in Combination on Post-Implantation Rat Embryos in Culture. **Journal of Turkish-German Gynecological**, v. 8, n. 4, p. 357-36, 2007.
- WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; DOTTORI, H. A.; NOLL, I. B. Determination of ochratoxin A in wine by high-performance thin-layer chromatography using charged coupled device. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 3, p. 441-446, 2010.
- WELKEI, J. E.; HOELTZI, M.; NOLL, I. B. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e ocratoxina A em vinhos. **Ciência Rural Santa Maria**, v. 39, n. 8, p. 2567-2575, 2009.
- WHO. World Health Organization. Evaluation of certain food additives and contaminants. In: *Report of the Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives*, 44. Geneva: p.36-38, (**Technical Report Series 859**), 1995.
- YANG, S. D; LIU, J.X.; WU, J.; TAN, H. W.; LI, Y. R. Effects of Vinasse and Press Mud Application on the Biological Properties of Soils and Productivity of Sugarcane. **Sugar Technology**, v. 15, n. 2, p. 152-158, 2013.
- YANG, Y.; YANG, Y.; SHAO, B.; ZHANG, J. A Simple and Rapid Method for Determination of Patulin in Juice by High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v.10, n. 9, p. 2913–2918, 2017.
- YILMAZ, N.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 175–341, 2014.
- YU, J. H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 437–458, 2005.
- ZAIED C.; ABID S.; HLEL, W.; BACHA, H. Occurrence of patulin in applebased-foods largely consumed in Tunisia. **Food Control**, v. 31, p. 263–267, 2013.
- ZHOU, S.; JIANG, L.; GENG, C.; CAO, J.; ZHONG, L. Patulin-induced oxidative DNA damage and p53 modulation in HepG2 cells. **Toxicon**, v. 55, p. 390–395, 2010.

ZORZETE, P.; BAQUIÃO, A. C.; ATAYDE, D. D.; REIS, T. A.; GONÇALEZ, E.; CORREA, B. Mycobiota, aflatoxins and cyclopiazonic acid in stored peanut cultivars. **Food Research International**, v. 52, p. 380-386, 2013.

ZORZETE, P.; REIS, T. A.; FELICIO, J. D.; BAQUIÃO, A.C.; MAKIMOTO, P.; CORREA, B. Fungi, mycotoxins and phytoalexin in peanut varieties, during plant growth in the field. **Food Chemistry**, v.129, p. 957-964, 2011.

ANEXO A- *Penicillium* and *Talaromyces* Communities of Sugarcane Soils (*Saccharum officinarum* L.): Ecological and Phylogenetic Aspects, a ser publicado online no dia 15 de março de 2018 pelo periódico Journal of Agricultural Science.

Journal of Agricultural Science; Vol. 10, No. 4; 2018
ISSN 1916-9752 E-ISSN 1916-9760
Published by Canadian Center of Science and Education

Penicillium and *Talaromyces* Communities of Sugarcane Soils
(*Saccharum officinarum* L.): Ecological and Phylogenetic Aspects

Sérgio Murilo Sousa Ramos¹, Roberta Cruz², Renan do Nascimento Barbosa¹, Alexandre Reis Machado¹,
Antônio Félix da Costa³, Cristina Maria de Souza Motta¹ & Neiva Tinti de Oliveira¹

¹ Mycology Department, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco State, Brazil

² Academic Unit of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco, Garanhuns, Pernambuco, Brazil

³ Agronomic Institute of Pernambuco, Recife, Pernambuco State, Brazil

Correspondence: Sérgio Murilo Sousa Ramos, Mycology Department, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Nelson Chaves, s/n, 50670-420, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco State, Brazil. Tel: 55-81-2126-8948. Fax: 55-81-2126-8480. E-mail: sergio.ramos@barreiros.ifpe.edu.br

Received: January 2, 2018

Accepted: February 11, 2018

Online Published: March 15, 2018

doi:10.5539/jas.v10n4p335

URL: <https://doi.org/10.5539/jas.v10n4p335>

Abstract

Penicillium and *Talaromyces* are fungal genera with high ecological and biotechnological importance. However, studies on exploration and ecology of these fungi in soils are scarce. The objectives of this study were to evaluate the species diversity of these genera in soils of sugarcane and fallow. Identification of the isolates was