

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

Taxonomia polifásica de *Neurospora* produtoras de aroma

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Argentina Sampaio Costa, aprovada pela Comissão Julgadora em 21 de dezembro de 1999.

ARGENTINA SAMPAIO COSTA

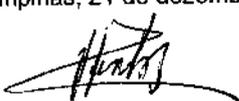
Mestre em Ciências de Alimentos

Química Industrial

Campinas, 21 de dezembro de 1999.

Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos

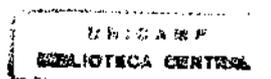
Orientador


Profa. Dra. Vanderlei Perez Canhos
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos

Campinas-SP

1999



UNIDADE	Be		
N.º CHAMADA	110107		
V.	Ex.		
TRANSO BC	40485		
PROC.	278100		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	\$ 11,00		
DATA	14/03/00		
N.º CPD			

CM-00139078-1

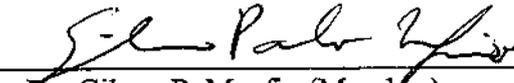
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

C823t	Costa, Argentina Sampaio	Taxonomia polifásica de <i>Neurospora</i> produtoras de aroma / Argentina Sampaio Costa. Campinas, SP: [s.n.], 1999.
	Canhos	Orientador: Vanderlei Perez Tese (doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
		1. Polimorfismo. 2. <i>Neurospora</i> . 3. Fungos. 4. Aromas. I. Perez Canhos, Vanderlei. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

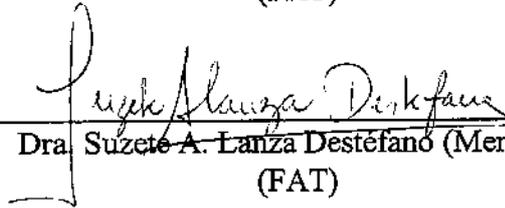
Banca Examinadora



Prof. Dr. Vanderlei P. Canhos (Orientador)
(UNICAMP)



Dr. Gilson P. Manfio (Membro)
(FAT)



Dra. Suzete A. Lanza Destéfano (Membro)
(FAT)

Profa. Dra. Gláucia Pastore (Membro)
(UNICAMP)



Profa. Dra. Hélia H. Sato (Membro)
(UNICAMP)

Prof. Dr. Ludwig Pfenning (Suplente)
(UFLA)



Profa. Dra. Lúcia R. Durrant (Suplente)
(UNICAMP)

Campinas, _____ de _____ de 1999

Agradecimentos

Em especial ao Dr. Vanderlei Perez Canhos, pela orientação, amizade e confiança.

Ao Pepe, pelo incentivo, carinho especial e pelos momentos compartilhados.

Ao Dr. Gilson, pela amizade, orientação, sugestões, correção do trabalho e por todo o apoio técnico necessário para o desenvolvimento da tese.

À Dra. Suzete L. Destéfano, agradeço a paciência, as sugestões e a constante atenção.

Ao Dr. Ludwig Pfenning pelo exame prévio do manuscrito e sugestões críticas da tese.

Às Profas. Gláucia Pastore, Hélia Sato e Lúcia Durrant pelas correções da tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal do Maranhão, em especial à Profa. Adenilde Ribeiro e Silvia Caldas pelo acompanhamento e empréstimo do laboratório durante a coleta de material.

A todos os funcionários da Fundação André Tosello pela amizade e pela alta qualidade dos seus serviços. Agradeço em especial à Simone, pela atenção prestada.

À Profa. Maria Aparecida Azevedo e às amigas Nilda e Natália pelo apoio e sugestões na análise sensorial.

À equipe que participou da análise sensorial, pela boa vontade e dedicação: Cáthia, Edna, Maria, Marianne, Mônica, Patrícia, Paty, Rita, Sabrina, Suzete, Teresa e Valéria.

À Daniela pela amizade e apoio técnico prestado com eficiência.

Aos amigos que fizeram o difícil ficar fácil, o complicado ficar simples, nestes quatro anos: Ana Cláudia, Ana Lúcia, Cáthia, Déborah, Dong, Edilsa, Eider, Eli, Fabiana, Jorge, Lyriam, Márcia, Marianne, Suzy e Val.

À minha família, tão longe e tão perto, sempre com uma palavra amiga, carinhosa e verdadeira, fundamental desde o início.

À todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Ciências de Alimentos da FEA-UNICAMP e à Fundação André Tosello pela oportunidade de realização deste trabalho.

Sumário

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

	Páginas
Sumário	i
Abreviaturas	iv
Índice de Tabelas	v
Índice de Figuras	vii
Resumo	x
Abstract	xii
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 Métodos fenotípicos e genotípicos na identificação e tipagem de fungos	3
2.1.1 Análise da morfologia.....	6
2.1.2 Análise de perfil de proteínas	11
2.1.3 Análise de ácidos nucléicos	14
2.2 Produção de aroma por microrganismos	19
2.3 Análise sensorial	22

3. Objetivos	25
4. Material e Métodos	26
4.1 Linhagens utilizadas	26
4.2 Isolamento e condições de cultivo	26
4.3 Caracterização Morfológica	29
4.3.1 Observação dos esporos assexuados	31
4.3.2 Observação dos esporos sexuados	31
4.3.3 Dimensão dos micélios reprodutíveis	32
4.4 Extração de proteínas totais	34
4.5 Eletroforese de proteínas totais em gel de SDS-PAGE	34
4.5.1 Montagem do gel SDS-PAGE	34
4.5.2 Impregnação dos géis de proteínas totais com prata.....	35
4.5.3 Impregnação dos géis de proteínas totais com coomassie-blue	36
4.5.4 Análise computacional dos géis de SDS-PAGE	38
4.6 Extração do DNA genômico em pequena escala.....	38
4.7 Eletroforese de DNA em gel de agarose	40
4.8 Amplificação de DNA por PCR	41
4.8.1 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na	
amplificação do DNA	41
4.8.2 Reação de PCR	42
4.9 Digestão dos DNAs com enzimas de restrição	44
4.10 Análise sensorial	45

4.10.1 Preparo das amostras	45
4.10.2 Avaliação das amostras e análise dos resultados	45
5. Resultados	47
5.1 Análise da Morfologia	47
5.2 Perfil de proteínas totais	59
5.3 Polimorfismo do rDNA 18S, 28S, 18S-28S e H3-1.....	64
5.4 Análise sensorial	75
6. Discussão	79
7. Conclusões	93
8. Referências Bibliográficas	95

Abreviaturas

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ATCC American Type Culture Collection

CBS Centraalbureau voor Schimmelcultures

CCT Coleção de Culturas Tropical

CMA Corn Meal Agar

EDTA Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid

IGS Intergenic Spacer

ITS Internal Transcribed Spacer

NRRL (ARS) Agricultural Research Service

PCR Polymerase Chain Reaction

RAPD Randomly Amplified Polymorphic DNA

RFLP Restriction Fragment Length Polymorphisms

SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

TBE Tris, Boric acid, EDTA

UPGMA Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages

Índice de Tabelas

BIBLIOTECA CENTRAL
UNICAMP
SEÇÃO CIRCULANTE

Tabela I.	Resolução taxonômica de algumas técnicas fenotípicas e genotípicas.....	14
Tabela II.	Designação das linhagens referência de <i>Neurospora</i>	27
Tabela III.	Designação e origem dos isolados de <i>Neurospora</i>	28
Tabela IV.	Chave de identificação para o gênero <i>Neurospora</i> elaborado por Frederick <i>et al.</i> (1969).....	30
Tabela V.	Volume das soluções utilizadas no preparo do gel de SDS-PAGE	36
Tabela VI.	Soluções para impregnação com prata	37
Tabela VII.	Soluções para impregnação com coomassie-blue	38
Tabela VIII.	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo	42
Tabela IX.	Características morfológicas dos isolados de <i>Neurospora</i> Homotálicas provenientes do Estado de São Paulo	56
Tabela X.	Ensaio de cruzamento dos isolados de <i>Neurospora</i> sp. com linhagens de referência	57
Tabela XI.	Análise de RFLP dos fragmentos rDNA 18S, histona-3, rDNA 18S-28S e rDNA 28S amplificados com os <i>primers</i> NS1-NS8	

	H31a-H31b, ITS1-ITS4 e LR0-LR7.....	73
Tabela XII.	Classificação polifásica de <i>Neurospora</i> isoladas de beiju de mandioca e vegetação queimada.....	74
Tabela XIII.	Termos descritivos desenvolvidos individualmente pelos provadores.....	76
Tabela XIV.	Termos descritivos gerados a partir dos termos desenvolvidos individualmente pelos provadores.....	77
Tabela XV.	Média dos atributos sensoriais das linhagens de <i>Neurospora</i> por teste de Dunnet	78

Índice de Figuras

Figura 1.	Representação genérica de genes codificando para a subunidade ribossomal nuclear.....	15
Figura 2.	Ficha de registro de dados morfológicos	33
Figura 3.	Ficha de avaliação sensorial	46
Figura 4.	Micélios, hifas septadas e conídios de <i>Neurospora</i>	49
Figura 5.	Peritécio e ascósporos de <i>Neurospora tetrasperma</i> , AC4, em microscopia óptica.....	50
Figura 6.	Peritécio, ascos e ascósporos de <i>Neurospora africana</i> , AC5, em microscopia óptica.....	51
Figura 7.	Ascospores e ascos de <i>Neurospora lineolata</i> , AC14, em microscopia óptica.....	52
Figura 8.	Peritécio e ascósporos de <i>Neurospora dodgei</i> , AC15, em microscopia óptica.....	53
Figura 9.	Peritécio e ascósporos de <i>Neurospora galapagonensis</i> , AC19, em microscopia óptica.....	54
Figura 10.	Peritécio e ascósporos de <i>Neurospora</i> sp., AC20, em microscopia óptica.....	55

Figura 11.	Crescimento em superfície de papel de filtro do isolado AC6 e linhagens de referência <i>N. sitophila</i> 2884 e <i>N. crassa</i> NRRL 2223	58
Figura 12.	Perfil eletroforético de proteínas totais das linhagens de referência de <i>Neurospora</i>	61
Figura 13.	Dendrograma representando a relação das linhagens de referências de <i>Neurospora</i> com os isolados de <i>Neurospora</i> baseado no perfil de proteínas totais	62
Figura 14.	Perfil eletroforético de proteínas totais das linhagens de <i>Neurospora</i> isoladas no Estado do Maranhão	63
Figura 15.	DNA genômico extraído a partir de massa celular de linhagens de <i>Neurospora sitophila</i> ATCC 46892.....	67
Figura 16.	Amplificação de DNA de linhagens de <i>Neurospora</i> com os primers NS1-NS8, LR0R-LR7, ITS1-ITS4 e H31a-H31b.....	68
Figura 17.	Perfil de RFLP do fragmento de rDNA 18S das linhagens de <i>Neurospora</i> amplificado com os primers NS1 e NS8 por PCR e digeridos com a enzima <i>Hae</i> III.....	69
Figura 18.	Perfil de RFLP do gene his-3 da proteína histona das linhagens de <i>Neurospora</i> amplificado com os primers H31-a e H31-b por PCR e digeridos com a enzima <i>Dde</i> I.....	70
Figura 19.	Perfil de RFLP do gene his-3 da proteína histona das linhagens de <i>Neurospora</i> amplificados com os primers H31-a e H31-b	

	por PCR e digeridos com a enzima <i>Hae</i> III.....	71
Figura 20.	Perfil de RFLP da região espaçadora 18S-28S das linhagens de <i>Neurospora</i> amplificada com os <i>primers</i> ITS1 e ITS4 por PCR e digeridos com a enzima <i>Ava</i> II.....	72

Resumo

Foi efetuado um estudo taxonômico de vinte e duas linhagens de *Neurospora* isoladas de beiju de mandioca e vegetação queimada nos Estados do Maranhão e São Paulo. As linhagens estudadas foram caracterizadas quanto à sua morfologia, perfil de proteínas totais, polimorfismos e fragmentos do rDNA 18S, 28S, região espaçadora 18S-28S e do gene histona H3-1, e produção de aroma. Foram incluídas neste estudo 7 linhagens de referência de 4 espécies de *Neurospora*: *N. crassa* NRRL 2223, CCT 2680 (=ATCC 24698); *N. sitophila* ATCC 46892 (produtora de aroma), NRRL 2884 (=ATCC 36935, =CCT 0045); *N. intermedia* NRRL 5506 (*N. sitophila* ATCC 56753) e *N. tetrasperma* NRRL 2164.

Os resultados obtidos na análise das características morfológicas sugerem que os isolados pertencem a 7 espécies diferentes. As linhagens obtidas do Maranhão foram identificadas como *N. sitophila*, com exceção de AC9, identificada como *N. crassa*, enquanto que os isolados do Estado de São Paulo apresentaram uma maior diversidade de espécies: *N. sitophila*, *N. crassa*, *N. tetrasperma*, *N. dodgei*, *N. galapogensis*, *N. africana* e *N. lineolata*. As análises dos perfis de proteínas totais corroboraram os resultados da análise morfológica.

Os resultados da análise de proteínas totais, assim como os de digestão da região espaçadora 18S-28S com a endonuclease *Ava* II, permitiram agrupar a linhagem *N. sitophila* ATCC 46892 produtora de aroma e isolados obtidos do mesmo substrato (beiju de mandioca) e local (Maranhão). Estas linhagens formaram um grupo distinto das

linhagens de referência e dos demais isolados.

A digestão do rDNA 18S com a enzima de restrição *Hae* III resultou em padrões diferentes para as três linhagens de referência em estudo. A linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892 apresentou o mesmo padrão de restrição que as linhagens de referência *N. crassa* NRRL 2223 e CCT 2680, assim como a maioria dos demais isolados. As linhagens AC4 e AC15 apresentaram padrão de restrição igual ao de *N. tetrasperma* NRRL 2164.

Os perfis de restrição do gene da proteína histona, *his-3* obtido com as enzimas *Dde* I e *Hae* III, permitiram a diferenciação das duas espécies *N. sitophila* NRRL 2884, CCT 0045 e *N. crassa* NRRL 2223, CCT 2680. A linhagem *N. sitophila* ATCC 46892 produtora de aroma, as linhagens *N. crassa* NRRL 2223, CCT 2680, e as linhagens de *Neurospora* isoladas do mesmo local (Maranhão) apresentaram perfis idênticos de restrição. Os fragmentos amplificados na região conservada 28S não apresentaram polimorfismo com nenhuma das enzimas em estudo.

Os resultados da avaliação sensorial indicaram que as linhagens de *Neurospora* isoladas do beiju de mandioca, apresentam características aromáticas muito semelhantes à da linhagem produtora de aroma de frutas *N. sitophila* ATCC 46892.

Os métodos moleculares e a taxonomia polifásica forneceram informações referentes ao grupo de linhagens de *Neurospora* obtidas do mesmo substrato da linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892, reforçando o uso desses métodos na caracterização de microrganismos associados à produção de aroma, podendo auxiliar na escolha de linhagens para futuros estudos envolvendo a produção e aplicação tecnológica.

Abstract

Polyphasic taxonomic studies were done with twenty-two *Neurospora* strains isolated from cassava *beiju* and burned vegetation in Maranhão and São Paulo states. Strains were characterized regarding morphology, protein profiles and polymorphisms of 18S, 28S and 18S-28S rDNA spacer fragment, histone H3-1 gene, and aroma production. Reference strains: *N. crassa* NRRL 2223, CCT 2680 (=ATCC 24698); NRRL 2884 (=ATCC 36935), CCT 0045 (=NRRL 2884); *N. intermedia* (*N. sitophila* ATCC 36935) *N. sitophila* ATCC 46892 (aroma producer) and *N. tetrasperma* NRRL 2164, were also studied.

Results obtained from morphological analyses suggested that the isolates comprised 7 different species. Strains from Maranhão were identified as *N. sitophila* but, except for strain AC9, identified as *N. crassa*, whereas isolates from São Paulo were assigned to *N. africana*, *N. crassa*, *N. dodgei*, *N. galapogensis*, *N. lineolata*, *N. sitophila*, and *N. tetrasperma*. The analyses of total protein profiles agreed with the results from morphological analysis.

Analysis of total protein profiles as well as spacer region digestion with *Ava* II endonuclease allowed the grouping of *N. sitophila* ATCC 46892 aroma producer strain with the isolates of *Neurospora* spp. originated of same substrate (cassava *beiju*) and local (Maranhão). These strains formed a group distinct from the reference strains and from the others isolates.

Digestion of 18S rDNA with restriction enzyme *Hae* III resulted in different patterns for the three reference strains in study. *N. sitophila* ATCC 46892 aroma producer strain, reference strains *N. crassa* NRRL 2223, CCT 2680 and most of the isolates presented the same restriction pattern. AC4 and AC15 strains and the *N. tetrasperma* NRRL 2164 reference strain presented identical restriction patterns.

Restriction profiles of the histone protein gene, *his-3* obtained with *Dde* I and *Hae* III enzymes allowed the differentiation of the two species *N. sitophila* NRRL 2884, CCT 0045 and *N. crassa* NRRL 2223, CCT 2680. *N. sitophila* ATCC 46892 aroma producer strain, *N. crassa* NRRL 2223, CCT 2680 strains and *Neurospora* strains isolated from same local (Maranhão) presented identical restriction pattern. Amplified fragments from 28S rDNA conserved region with studied enzymes did not present polymorphism.

Sensorial evaluation indicated that *Neurospora* strains isolated of cassava *beiju* show aromatic characteristics similar to that of *N. sitophila* ATCC 46892, producer of fruit aroma strain.

Molecular methods and the polyphasic taxonomy provided information for the *Neurospora* group originated from the same substrate of the *N. sitophila* ATCC 46892 aroma producer strain. These methods corroborate characterization of microorganisms associated to production of aroma, and could be useful with selection of strains for future studies related with technological production and application.

1. Introdução

O gênero *Neurospora* pertence a um grupo de fungos filamentosos do Filo Ascomycota, sub-classe Pirenomiceto, que se caracteriza por possuírem micélios bem desenvolvidos formados por hifas aéreas e septadas. Produzem na sua fase assexuada conídios ovais e um pigmento alaranjado. O requerimento nutricional para o desenvolvimento desses microrganismos é bastante simples, permitindo o seu crescimento em vários substratos como por exemplo solo (Krug & Khan, 1991), amendoim (Ho, 1986), soja (Shambuyi *et al.*, 1992), milho (Boboye & Adetuyi, 1994), mandioca (Okafor *et al.*, 1984; Park *et al.*, 1982), produtos de padaria (Yassin & Wheals, 1992) e cana-de-açúcar (Pandit & Maheshwari, 1996).

Uma vasta literatura tem se acumulado nas áreas de bioquímica e genética nos últimos setenta e dois anos desde que Shear e Dodge (1927) descreveram o gênero. No entanto, *Neurospora* continua sendo fonte de inovações e surpresas (Perkins, 1992). A linhagem *N. sitophila* ATCC 46892, isolada de “beiju de mandioca” (Park *et al.*, 1982) utilizado na fabricação de uma bebida alcóolica no Estado do Maranhão, produz um forte aroma de frutas atribuído ao composto etil hexanoato (Yamauchi *et al.*, 1991; Yoshizawa *et al.*, 1988). Estudos piloto da produção e aplicação dessa substância aromática, utilizando arroz polido pré-gelatinizado, vem sendo desenvolvidos no Japão (Yamauchi *et al.*, 1989a). Trabalhos recentes sugerem que a capacidade de produzir aroma por esses microrganismos

pode ser restrita a um determinado grupo relacionado ao local e substrato de onde essas linhagens foram isoladas (Pastore *et al.* 1994).

A influência de condições ambientais, do substrato, região ou espécie, como fator determinante na produção de aroma pelo microrganismo *Neurospora* não está esclarecida. Todavia, é necessária a compreensão da diversidade da população de *Neurospora* produtoras de aromas, principalmente no que se refere a sua especificidade, que pode ser o resultado do local, substrato de cultivo ou da combinação de ambos.

A diversidade fenotípica e genotípica são critérios comumente usados para agrupar isolados dentro das várias taxa de microrganismos. Embora, a definição de espécies seja o propósito principal da classificação dos organismos, a separação e o reconhecimento de diferentes tipos dentro da espécie tem assumido grande importância em vários ramos da microbiologia aplicada.

O gênero *Neurospora* é bem definido morfologicamente através de características da fase sexual. Os métodos convencionais são os mais aplicados para a identificação desses fungos (Prescott, 1993). Entretanto, as comparações moleculares e quimiotaxonômicas, que permitam a análise direta do material genético ou produtos de expressão gênica, trazem resultados mais confiáveis para estudos que analisam a variabilidade genética de muitas espécies. Inúmeros trabalhos publicados nos últimos anos mostram a utilização de técnicas moleculares e quimiotaxonômicas na identificação de diversos grupos de fungos de interesses clínico, agrícola e industrial, permitindo um maior controle e seleção dos microrganismos (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 1998; Borazjani *et al.*, 1998; Montrocher *et al.*, 1998).

2. Revisão da Literatura

2.1 Métodos Fenotípicos e Genotípicos na Identificação e Tipagem de Fungos

Em princípio, toda informação fenotípica, genotípica e filogenética pode ser incorporada na taxonomia polifásica. A informação genotípica é derivada de ácidos nucleicos (DNA e RNA) presentes na célula, enquanto a informação fenotípica vem de proteínas e suas funções, diferentes marcadores quimiotaxonômicos e outros fatores de expressão, tais como morfologia, fisiologia, enzimologia e sorologia (Vandamme *et al.*, 1996). A taxonomia polifásica é usada para delinear taxa em todos os níveis. Entretanto, a aplicação das diferentes técnicas depende do nível de resolução taxonômico que objetiva o estudo (Tabela I) (Murray *et al.*, 1990).

A classificação e identificação de microrganismos baseada em métodos tradicionais utilizava basicamente características fenotípicas, tais como coloração, morfologia, exigências nutricionais, pigmentação e formação de esporos. No processo de identificação, essas características são importantes na caracterização primária, que é seguida do isolamento, purificação e determinação de outras características. Na identificação de fungos, a abundância e facilidades de obtenção de informações sobre as características morfológicas, principalmente associadas à esporulação sexual desses microrganismos, faz com que a análise fenotípica tradicional continue sendo de grande valia em todo o processo

de classificação e identificação dos fungos (Prescott, 1993).

Tabela I. Resolução taxonômica de algumas técnicas fenotípicas e genotípicas.

Componentes celulares	Técnicas	Nível de resolução taxonômica
DNA	Composição de bases (%G+C)	Gênero
	Homologia DNA-DNA	Espécie
	Análise de RFLP e AFLP	Espécie e subespécie
	Ribotipagem	Espécie e subespécie
	Sequenciamento do rDNA	Espécie, gênero e acima
rRNA	Sequenciamento do rRNA	Espécie, gênero e acima
Proteínas	Padrão de proteínas totais	Espécie e gênero
	Análise de proteínas ribossomais	Espécie e gênero
Enzimas	Testes enzimáticos	Espécie e gênero
	Isoenzimas	Clones dentro de espécie
Componentes celulares	Análises de ácidos graxos, quinonas e lipídeos	Espécie e gênero
Célula inteira	Morfologia	Espécie e gênero
	Pirólise-espectrometria de massa	Gênero, espécie e abaixo
	Ciclo de vida	Espécie e gênero

Fonte: Priest & Austin, 1993

Para a maioria dos fungos, a identificação é baseada primariamente, nas características morfológicas dos esporos sexuados e dos corpos de frutificação presentes durante as etapas sexuadas de seus ciclos vitais, as quais são analisadas e comparadas com chaves de identificação e descrições taxonômicas disponíveis na literatura. Entretanto, muitas espécies somente produzem esporos sexuados e corpos de frutificação em condições ambientais apropriadas. Quando o sistema reprodutivo do fungo não é conhecido ou apresenta morfologia simples são necessárias outras determinações, tais como características fisiológicas e metabólicas, compostos de baixo peso molecular, propriedades antigênicas, composição da parede celular, composição de proteínas e ácidos nucleicos (Carlie & Watkinson, 1996).

A taxonomia molecular vem despertando interesse dos micologistas, principalmente no estudo de grupos de fungos de importância clínica, agrícola e industrial, onde a caracterização específica é de grande utilidade para ajudar na definição da diversidade de patógenos e o monitoramento de novos produtos microbiológicos. Os métodos convencionais são de grande importância na identificação dos fungos. Entretanto, as comparações moleculares e quimiotaxonômicas podem detectar variabilidade entre diferentes isolados de uma mesma espécie (Towner & Cockayne, 1993).

As metodologias moleculares e quimiotaxonômicas para a identificação e tipagem de microrganismos utilizam informações derivadas principalmente de ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, cujas sequências ou composição permitem uma análise simples e uniforme para estudar a diversidade microbiana e o desenvolvimento de métodos de identificação. Historicamente, métodos utilizados para isolar e caracterizar

macromoléculas envolviam técnicas complexas, demoradas e caras e, portanto, não eram comuns na rotina de laboratórios de microbiologia. Atualmente, essas técnicas tornaram-se mais simples e rápidas, permitindo a sua aplicação em estudos epidemiológicos e de diversidade genética (Fantinatti, 1997).

Em geral, o método de identificação ideal deve diferenciar as linhagens estudadas, ser capaz de reconhecer um número razoável de tipos, ser aplicável para isolados naturais, ser reprodutível em diferentes laboratórios, além de ser simples e de baixo custo (Hawsksworth, 1994).

2.1.1 Análise da Morfologia

Para se observar a morfologia microscópica dos fungos filamentosos deve-se analisar os micélios vegetativos e os micélios reprodutivos. O sistema vegetativo ou assexual está diretamente relacionado ao desenvolvimento e absorção de alimentos nos fungos. O método mais comum de reprodução assexual é a produção de conídios ou mitósporos, os quais podem variar muito na forma, tamanho e cor.

No gênero *Neurospora* os esporos assexuados, ou conídios, são produzidos pela fragmentação do micélio vegetativo em propágulos. As células que dão origem aos conídios são denominadas células conidiogênicas. Na reprodução assexual desses organismos, as hifas ramificam-se originando os conidióforos, a partir dos quais se formarão os conídios. Em seguida, esses esporos germinam, tomando a forma de longos

tubos germinativos, que crescem e ramificam-se formando uma massa de filamentos (micélios) dando continuidade ao ciclo (Gompertz *et al.*, 1991). Os conídios são pigmentados, escuros e ovais. As hifas são septadas, multinucleadas, e podem ser observados por exame microscópico direto do crescimento do microrganismo entre lâmina e lamínula. Esse método conserva a estrutura do organismo, facilitando a obtenção das informações morfológicas necessárias para a identificação do fungo. Informações macroscópicas como tipo e cor das colônias também são úteis para o diagnóstico genérico. A cultura em meio sólido pode ser examinada com uma lupa. As colônias de fungos filamentosos são tipo algodão, aveludadas ou pulverulentas e apresentam uma grande diversidade de cores. As colônias de *Neurospora* apresentam comumente coloração rósea, pink ou alaranjada devido a produção de pigmentos carotenóides. Na ausência de luz as colônias de *Neurospora* se desenvolvem na cor branca. Porém, duas horas após à exposição da luz as colônias tornam-se laranjas (Perkins, 1992).

Quase todos os fungos crescem aerobicamente, numa faixa de temperatura entre 20 a 30 ° C. Essas condições normais de crescimento favorecem a propagação vegetativa. O meio mais comum para o cultivo de *Neurospora* é o meio mínimo de Vogel (Davis & De Serres, 1970). Entretanto, o meio sintético para cruzamento SC (Westgaard & Mitchell, 1947) suplementado com acetato de iodo tem sido usado com sucesso na produção de microconídios de linhagens de *N. crassa* (Ebbole & Sachs, 1996; Pandit & Maheshwari, 1996). Os meios mais indicados para o cultivo dos fungos filamentosos são o Agar Sabouraud, Agar Extrato de Malte e Agar Batata, os quais são adequados para o isolamento do organismo (Sevilla & Orbach, 1996).

Os esporos sexuados são produzidos com menor frequência e em menor quantidade que os esporos assexuados. Normalmente são produzidos somente em circunstâncias especiais, de modo que é possível estarem ausentes no cultivo de fungos em meios comuns. Alguns meios de cultura foram desenvolvidos para estimular a reprodução sexual nesses organismos. O meio Agar Milho (CMA) e o meio Sintético para Cruzamento (SC) de Westgaard e Mitchell são os mais utilizados (Perkins, 1996). Fatores como baixa concentração de nitrogênio (em torno de 0.1%), baixa porcentagem de açúcar e adição de sorbose reduzem o rápido crescimento de *Neurospora* (> 4mm/hr) favorecendo a produção de esporos sexuados.

Nos ascomicetos, as espécies que se reproduzem sexualmente seguem uma das três estratégias básicas de reprodução: homotalismo, pseudohotalismo ou heterotalismo (Nelson, 1996). No ciclo sexual das linhagens homotálica e pseudohomotálicas o micélio produz protoperitécios que se constituem em formas imaturas de corpos de frutificação, os quais contêm hifas especiais (tricógenas) com núcleos haplóides. Essas hifas especiais, por anastomose com conídios ou hifas, recebem núcleos distintos. Ocorre fusão nuclear resultando em núcleos diplóides, os quais ficam envolvidos por uma estrutura denominada de asco. O núcleo diplóide, dentro do asco, sofre divisão meiótica dando 4 células haplóides que sofrem em seguida uma divisão mitótica resultando em 8 células, todas haplóides dentro de cada asco. Cada uma dessas células é denominada de ascósporos que dispõem-se linearmente no interior do asco. Finalmente, centenas de ascos ficam reunidos em uma estrutura que é o corpo de frutificação maduro ou peritécio (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Tamanho dos peritécios, ascos e ascósporos, presença de estrias e germesporos e quantidade de esporos presentes nos ascos são fundamentais para a identificação de *Neurospora*. Essas características, quando comparadas às da chave de identificação, proposta por Frederick *et al.* (1969) para esse gênero, podem definir a identidade do organismo em nível de espécie.

Nas linhagens heterotálicas, embora individualmente uma *Neurospora* do tipo *A* ou *a* possa se reproduzir assexuadamente com formação de conídios, somente através do heterocário formado por dois talos compatíveis que a meiose e a reprodução sexual podem ocorrer. Os fungos heterotálicos apresentam portanto dois *mating-type* e requerem a interação de duas linhagens compatíveis, uma de cada *mating type*, para completar a reprodução (Leslie & Klein, 1996). *Mating type* é um estágio haplóide homocariótico que produzirá um estágio diplóide ou dicariótico apenas após pareamento com um *mating type* compatível.

Supõe-se que as linhagens heterotálicas surgiram a partir de linhagens homotálicas, onde foram gerados mutantes com ausência de uma sequência (gene *mating-type A*) levando à perda da propriedade de reproduzir-se sexualmente (Elliot, 1994). Para que a reprodução sexual possa acontecer esta linhagem deve cruzar com a linhagem compatível que ficou com a outra sequência (gene *mating-type a*) que também não pode reproduzir-se sexualmente. Estudos moleculares tem sido conduzidos com os genes *mating type* em *Neurospora* (Raju, 1992).

O procedimento mais utilizado para a identificação de linhagens heterotálicas de *Neurospora* em nível de espécie é o cruzamento com linhagens de

referência autênticas. Esporos sexuados de espécies heterotálicas de *Neurospora* foram analisados por Perkins *et al.* (1976). O tamanho do asco foi a característica mais variável e menos conveniente como critério taxonômico e o tamanho do corpo de frutificação foi muito afetado por influências ambientais. Entretanto, o tamanho, forma, cor e quantidade dos esporos sexuados foram características consideradas importantes para a identificação do organismo.

Os cruzamentos são realizados rotineiramente a 25°C, em tubos de 15 cm, ou em placas de Petri, no meio sintético para cruzamento SC (Westegaard & Mitchell, 1947). Os ascósporos são isolados aproximadamente após 18 dias da fertilização. Entretanto, podem ser ativados a 60°C por 30 min em banho-maria (Stanford *Neurospora* Methods, 1997). O meio de cultivo Agar Milho também pode ser utilizado nos cruzamentos, principalmente quando houver falhas com o meio sintético para cruzamento SC. Existem dois tipos de Agar Milho (CMA) no mercado, com e sem glicose, sendo utilizado normalmente o Agar Milho com glicose nos testes de cruzamentos (Perkins, 1996)

Um método simples para cruzamento de linhagens de *Neurospora crassa* foi sugerido por Pandit e Russo (1996). Os autores descreveram um procedimento no qual a produção de confídios é eliminada praticamente e um grande número de ascósporos podem ser facilmente colhidos. Neste teste foi utilizado o meio de cruzamento sintético SC modificado (concentração de sacarose 0.1% e adição de 0.5% de sorbose, 0.1% de extrato de levedura e 0.1% de hidrolizado de caseína) e papel de filtro como fonte de carbono cortados em pedaços de 3.5 X 4.0 cm. Para a identificação dos fungos foram adicionados ao papel de filtro o meio de cultivo, a linhagem de referência e o isolado a identificar.

Pela presença massiva de enormes quantidades de macroconídios de coloração laranja o fungo *Neurospora* pode ser facilmente reconhecida na natureza. Exceto a publicação de Kitazima (1925) revelando a presença do corpo de frutificação de *Neurospora* em árvores de pinheiro após a queimada, outras tentativas de encontrar o estágio sexual na natureza fracassaram (Shear & Dodge, 1927; Shaw, 1990). Recentemente, Pandit e Maheshwari (1996) presenciaram a ocorrência da reprodução sexual de *Neurospora* na natureza em cana-de-açúcar após a queimada. Eles observaram peritécios no interior do tecido epidérmico da planta após a queimada.

2.1.2 Análises de Perfil de Proteínas

A diversidade e o número de proteínas produzidas pelos microrganismos levaram ao desenvolvimento de métodos de identificação e tipagem baseados em análises comparativas de perfis de subunidades protéicas. Esses métodos têm gerado bons dados qualitativos em estudos taxonômicos e têm sido aplicados na identificação de vários organismos, em nível de espécie, e particularmente, na diferenciação entre linhagens de bactérias da mesma espécie (Fantinatti *et al.*, 1994; Lyra *et al.*, 1997). Apesar de não ser utilizado tão extensivamente como para bactérias, as análises de proteínas têm sido utilizada também em estudos de diferenciação e subtipagem de fungos (Symoens *et al.*, 1993; Rath *et al.*, 1999). Geralmente, as proteínas de maior peso molecular das linhagens de uma mesma espécie são muito semelhantes mas, diferem consideravelmente, das de outras

espécies. Dentro de uma mesma espécie, diferenças menores entre as linhagens permitem a subtipagem (Towner & Cockayne, 1993).

A expressão protéica é um caráter fenotípico regulado pelo genótipo do organismo e pelo fator ambiental. As análises comparativas baseadas em perfil de proteínas requerem portanto que as condições de crescimento na preparação dos organismos testados sejam padronizadas. O padrão de subunidades protéicas é o resultado da extração de proteínas de células inteiras (proteínas totais) ou de frações celulares, tais como proteínas de membranas ou de superfície, e da separação do material solubilizado por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Nessa técnica, proteínas são desnaturadas por aquecimento, detergente e agentes redutores produzindo subunidades polipeptídicas as quais são então separadas por eletroforese de acordo com a massa molecular. Em geral essas técnicas utilizam pequenas quantidades de células para o preparo dos extratos protéicos, permitindo a comparação de muitas linhagens simultaneamente.

A extração de proteínas a partir de fungos é dificultada pela existência de alta atividade de protease endógena, presença de parede celular mais resistente e tendência de formar micélio, mesmo em cultura líquida. Osherov e Gregory (1997) estudaram a otimização da extração de proteínas para eletroforese em gel, a partir do fungo *Aspergillus nidulans*. Seis protocolos com diferentes tampões foram testados. Os resultados obtidos em géis de eletroforese mostraram que proteínas de todos os tamanhos foram eficientemente extraídas no sobrenadante com o tampão úreia.

A comparação dos padrões de bandas em eletroforese em gel SDS-PAGE pode ser feita através de visualização direta. Entretanto, quando o número de padrões de

bandas é mais complexo, especialmente em preparações de proteínas totais, a análise entre as linhagens é feita por programa de computador. O GelCompar (Applied Maths BVBA, 1998) é um *software* que oferece grande versatilidade para gerenciar dados, incluindo grupos hierárquicos e análise de componentes principais (PCA) numa ampla escolha de demonstração (dendrogramas, matriz de similaridade, perfis de bandas) e facilidades na identificação de linhagens não conhecidas frente a uma base de dados de perfis protéicos.

Na identificação de fungos o método SDS-PAGE pode ser utilizado em combinação com outras técnicas como por exemplo eletroforese de várias enzimas, onde os microrganismos podem ser diferenciados pela análise de mobilidade eletroforética de um extrato enzimático. Existem diversas formas variantes de uma mesma enzima numa população de microrganismos, cada uma codificada por um alelo diferente. Mudanças de poucos aminoácidos nas proteínas, codificadas por diferentes alelos, são suficientes para afetar a mobilidade eletroforética e permitir a diferenciação entre as linhagens. Deve-se levar em conta que o nível de discriminação da técnica é aumentado pela análise múltipla de enzimas, geralmente entre 10 a 15 enzimas diferentes (Selander *et al.*, 1986).

Reddy & Threlkeld (1971) compararam diferentes linhagens de *Neurospora* (*N. africana*, *N. crassa*, *N. dodgei*, *N. intermedia*, *N. sitophila*, *N. terrícola*, *N. tetrasperma*, e *N. toroi*) por eletroforese em gel com as enzimas esterase, lactato desidrogenase, amilases, peroxidase e ácido fosfatase. Neste estudo foi possível diferenciar as espécies, com exceção de *N. tetrasperma* e *N. intermedia*. Foi evidenciado que zimogramas de esterase podem servir como critério para a classificação de espécies dentro do gênero *Neurospora*.

2.1.3 Análises de Ácidos Nucléicos

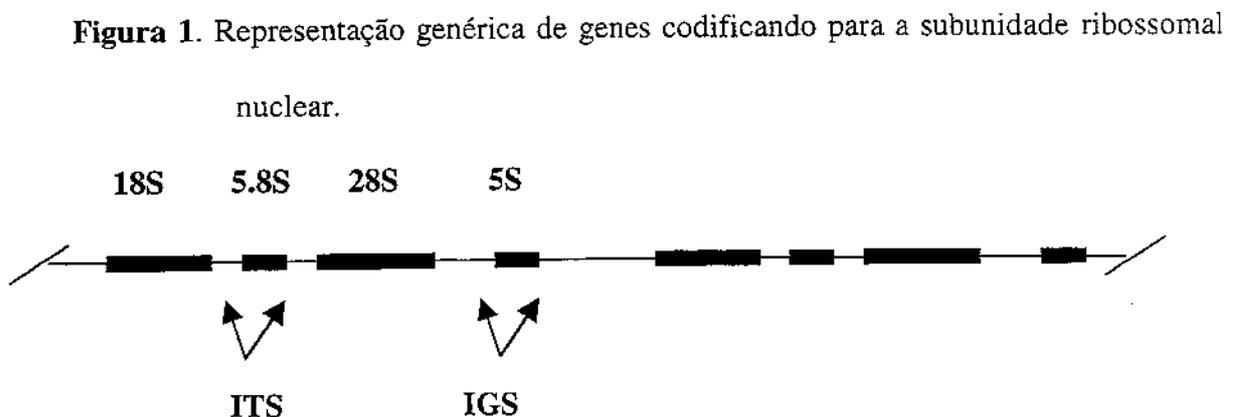
A taxonomia, baseada em caracteres moleculares envolve o estudo dos ácidos nucleicos, principalmente DNA cromossômico e RNA ribossômico, para a obtenção de informações taxonômicas. As informações derivadas de ácidos nucleicos podem ser empregadas na classificação de linhagens microbianas em diversos níveis taxonômicos hierárquicos, desde o estabelecimento de relações infra-específicas entre linhagens até relações entre espécies, gêneros e níveis taxonômicos supra-genéricos (Tabela I).

Na maioria dos microrganismos o material genético consiste de um DNA de fita dupla com sequência específica de pares de bases que armazenam informação. O DNA da célula eucariótica não se encontra livre no interior do núcleo e sim como um complexo DNA-proteína na forma de filamentos dispostos, aparentemente de forma irregular, constituindo a cromatina. Dentre as proteínas associadas à cromatina, destaca-se as histonas, pequenas proteínas que existem em maior quantidade e apresentam um caráter básico, por conter entre 10 e 20 % de aminoácidos com cargas positivas (lisina e arginina). Na cromatina nativa, a longa molécula de DNA se estende como uma fibra contínua enrolando-se, de espaço em espaço, sobre um octâmero de histona. São cinco tipos principais denominadas de histona H1, H2A, H2B, H3 e H4, diferenciadas pelo conteúdo de lisina e arginina.

As histonas são proteínas muito conservadas em termos evolutivos, como é o caso das histonas H4. Entretanto, a histona H1 é mais variável, embora forme uma família

de proteínas relacionadas. As demais proteínas são denominadas, em conjunto, de proteínas não-histônicas e são muito variáveis entre as espécies, compreendendo um grande número de tipos, mas todos ocorrendo em pequenas quantidades dentro do núcleo (Costa, 1987). Considerando esse envolvimento, genes que codificam as proteínas histônicas, principalmente H3 e H4, têm sido usados em investigação e tipagem de vários grupos de fungos, entre eles os gêneros *Neurospora* (Glass & Donaldson, 1995) e *Fusarium* (Donaldson *et al.*, 1995).

O DNA ribossomal é um importante marcador genético usado para diferenciação de espécies e linhagens em muitos organismos. Os rDNAs nos eucariotos estão presentes repetidas vezes, e cada unidade consiste de regiões codificadas para os genes rRNA 18S, 5.8S e 28S, e dois espaços internos (ITS1 e ITS2) que separam essas regiões. Cada unidade do rDNA é separada por um espaço intergênico (IGS) (Figura 1). A unidade de rDNA apresenta componentes em sua sequência que envolve variações e podem ser usadas em estudos de sistemática para diferentes níveis taxonômicos (Fouly *et al.*, 1997).



As regiões rDNA 18S e 28S são muito conservadas e podem ser utilizadas para diferenciações em nível de gênero e espécie (Berbee & Taylor, 1995; Spatafora, 1995; Eriksson, 1995; Gargas & Depriest, 1996). No entanto, as regiões espaçadoras ITS e IGS acumulam mais variabilidade, sendo mais utilizadas na diferenciação de espécies ou entre linhagens da mesma espécie (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Ristaino *et al.*, 1998; Chillali *et al.*, 1998).

Os métodos convencionais de eletroforese em gel de agarose não permitem a separação de DNA cromossômico devido ao seu tamanho. Porém, o DNA cromossômico pode ser digerido com enzimas de restrição, resultando em fragmentos de DNA que então podem ser analisados pelos métodos convencionais de eletroforese, permitindo a identificação de diferenças mínimas entre os microrganismos estudados.

Sequências específicas do rDNA amplificadas por reações de polimerização em cadeia, combinados à digestão com enzimas de restrição, resulta em RFLPs (“restriction fragment length polymorphisms”), que são analisados em eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Esse método de amplificação de ácidos nucléicos conhecido como PCR (“polymerase chain reaction”) foi introduzido em 1986 e tornou-se uma das mais importantes inovações científicas da década passada (Foster *et al.*, 1993).

O mecanismo do PCR é teoricamente simples, onde uma DNA polimerase termoestável produz múltiplas cópias de regiões específicas do DNA, incluindo regiões não-codificadoras ou genes específicos a partir de iniciadores (*primers*). Os produtos obtidos após amplificação podem ser analisados através de eletroforese em gel de agarose,

quanto ao tamanho do fragmento amplificado, que, em muitos casos, pode indicar a presença do DNA alvo da sequência original. Atualmente, o uso do PCR para identificação e comparação de microrganismos específicos tem se tornado uma rotina em laboratórios de biologia molecular devido à sua simplicidade e rapidez (Innis *et al.*, 1990).

O PCR em estudos com fungos foi introduzido por White *et al.* (1990) e desde então são inúmeros os trabalhos envolvendo esta técnica. Estratégias variadas usando o PCR têm sido descritas e utilizadas em muitas áreas na micologia. Smith *et al.* (1990) por exemplo avaliaram a aplicação do método em ecologia de fungos. Pecchia *et al.* (1998) relataram que os produtos amplificados a partir da região espaçadora IGS mostraram diferenças quanto ao tamanho no fungo *Pyrenophora graminea*, agente causador da doença da folha da cevada. Dois grupos foram identificados dependendo do tamanho do produto IGS-PCR que variou de 3.8 e 4.4 Kb.

Diferenças no tamanho do produto amplificado com o *primer* Bt-2 foi encontrado entre linhagens de ascomicetos filamentosos (Donaldson *et al.*, 1995). O produto Bt2-PCR a partir de *Neurospora crassa* apresentou tamanho de 495 pb enquanto nos outros fungos o tamanho foi de 475 pb em *Botrytis cinerea*, 360 pb em *Trichoderma reesei* e 340 pb em *Fusarium*. Dentro do gênero *Fusarium* as espécies não apresentaram diferenças no tamanho do produto amplificado, onde todos foram de 340 pb. No entanto, a digestão desse fragmento com enzima de restrição apropriada pode vir a resultar em diferentes fragmentos. O sucesso do método RFLP depende da seleção de uma enzima de restrição que seja apropriada para o grupo de microrganismos analisados e o método de determinação de similaridade dos fragmentos obtidos.

Ristaino *et al.* (1998) estudaram um método rápido de identificação para seis grupos taxonômicos do patógeno de plantas *Phytophthora* utilizando a comparação visual dos padrões de bandas de restrição para as enzimas *Rsa* I, *Msp* I e *Hae* III. A digestão do produto ITS obtido com as enzimas de restrição revelou perfis diferentes dentre as espécies testadas possibilitando, em todos os casos, a diferenciação inter e infra-específica. Os isolados foram caracterizados anteriormente por métodos tradicionais, através de características morfológicas. Os métodos moleculares foram, segundo os autores, ferramentas rápidas e fáceis para a identificação de espécies economicamente importantes dentro desse gênero.

Outra aplicação do PCR é a análise de RAPD (“randomly amplified polymorphic DNA”). Esse método consiste na escolha arbitrária de um único oligonucleotídeo iniciador (*primer*), combinado com ciclos de baixa estrigência e resultando em fragmentos amplificados característicos de um genoma em particular (Welsh & McClelland, 1990). Ouellet e Seifert (1993), através de análise RAPD com 3 oligonucleotídeos selecionados, caracterizaram 17 linhagens de *Fusarium graminearum*. O método descrito no estudo está sendo usado em outros laboratórios pela boa reprodutibilidade encontrada. Recentemente, esta técnica tem sido aplicada com sucesso na identificação de muitos fungos tais como dos gêneros *Pythium* (Herrero & Klemsdal, 1999) e *Macrobrachium* (Lu *et al.*, 1998).

A hibridização aplicada com sondas de ácidos nucléicos específicas para uma determinada espécie é outro método utilizado na identificação em nível de espécie (Tabela I). Linhagens relacionadas apresentam grande número de fragmentos hibridizados

em comum, sendo consideradas da mesma espécie com grau de similaridade acima de 80%. Espécies heterotáticas de *Neurospora* e isolados não relacionados por outros métodos foram claramente distinguidos por homologia DNA:DNA (Dutta, 1976).

2.2 Produção de Aroma por Microrganismos

Mais de 80 % dos compostos aromáticos são produzidos por síntese química (Unger, 1989). Porém, a formação de misturas indesejáveis nesses processos e a crescente rejeição do consumidor pela adição de aditivos químicos aos alimentos, cosméticos e outros produtos, despertou o interesse de pesquisadores pelo estudo do aroma de origem biológica. Os métodos biotecnológicos utilizam biocatalisadores na síntese dos compostos aromáticos tais como cultura em tecido, microrganismos ou enzimas. Atualmente, os processos microbianos são os mais promissores para a produção desses aromatizantes em escala industrial (Janssens *et al.*, 1992).

No crescimento dos fungos filamentosos temos duas fases distintas de crescimento, a fase de metabolismo primário e a fase de metabolismo secundário. Os metabólitos voláteis primários, produzidos durante a fase do crescimento logarítmico, equilíbrio entre a utilização de nutrientes e a construção de novas células, são similares para a maioria dos fungos. Esses processos metabólicos seguem as mesmas vias básicas na maioria das células fúngicas e estão diretamente relacionados com a síntese das substâncias celulares. Os metabólitos voláteis secundários começam a ser produzidos somente após a

fase de crescimento logarítmico da célula e são processos específicos cujas funções não são bem conhecidas. Esses compostos voláteis produzidos pelos microrganismos diferem entre espécies ou entre linhagens da mesma espécie (Eriksson *et al.*, 1992). Diferenças descritivas e da intensidade de compostos aromáticos produzidos por certos microrganismos tais como *Aspergillus* e *Penicillium* têm sido usadas como critério taxonômico (Börjesson *et al.*, 1992; Jollivet *et al.*, 1993).

Os fungos filamentosos podem produzir um amplo espectro de substâncias voláteis. A diversidade de aromas depende da espécie e condições ambientais (Christen & Raimbault, 1991). Os compostos voláteis microbianos incluem principalmente os grupos químicos aldeídos, cetonas, terpenos, lactonas, pirazinas, álcoois e ésteres, os quais apresentam aromas próprios. Esses compostos são caracterizados pela alta volatilidade e podem ser identificados por técnicas instrumentais de química orgânica como a cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

Os ésteres associados ao aroma característico de frutas sintetizado pelos microrganismos estão presentes em pequenas concentrações no substrato, entre 1 e 100 ppm (Janssens *et al.*, 1992). A variedade e intensidade do aroma microbiano é influenciada pelo meio de cultivo utilizado para o crescimento do microrganismo (Christen *et al.*, 1994; Inoue *et al.*, 1994; Fabre *et al.*, 1996).

A análise cromatográfica de isolados de *Neurospora* obtidos de diferentes substratos e regiões mostrou a influência de fatores ambientais na produção de etil hexanoato (éster) (Pastore *et al.*, 1994). O aroma de frutas foi detectado somente nas linhagens de *Neurospora* isoladas de beiju de mandioca na região do Maranhão que

produziram 60 ppm de etil hexanoato após cultivo em caldo malte por 5 dias. Anteriormente, Yamauchi *et al.* (1989b, 1989c) verificaram que essas linhagens poderiam ser diferenciadas pela enzima que cataliza a reação de esterificação. Uma nova enzima foi detectada pelos autores como Acil Coenzima A:Álcool Aciltransferase. A via metabólica que leva à síntese do composto etil hexanoato, não está bem esclarecida (García *et al.*, 1994).

Molinari *et al.* (1995) estudaram a produção de diferentes ésteres com características de aroma de frutas pela linhagem *Rhizopus oryzae* CBS 112-07. O resultado promissor obtido na síntese do composto butirato geranil permitiu a produção em escala piloto. Com adição contínua do substrato foi possível acumular quantidades consideráveis de produto em 48 horas.

Embora o uso de fungos na produção de aromas naturais tenha avançado, o número de aplicações industriais ainda é limitado. É necessário entender melhor como os microrganismos sintetizam os componentes aromáticos e como as vias metabólicas fundamentais tornam estas reações possíveis (Häusler & Münch, 1997). A baixa taxa de produção de aromas microbianos e aspectos legais neste setor (cada País apresenta regulamentos próprios) contribuem para a dificuldade de comercialização de aromas produzidos por microrganismos (Janssens *et al.*, 1992).

Dentre os aromas produzidos por microrganismos em escala industrial destacam-se os seguintes: • ácido 4-hidroxicaproico de *Yarrowia lipolytica* comercializado pela companhia alemã Fritzsche Dodge & Oleott (Tyrrel, 1995) • ácido butírico de *Clostridium butyricum* comercializado pela companhia americana Hercules Inc.

(Dziezak, 1986) • β -ionona de *Lasiodiplodia theobromae* ATCC 28570 comercializado pela companhia suíça Givauduan (Krasnobajew & Helminger, 1982) • metilcetonas de *Aspergillus niger* comercializados pela companhia inglesa Stafford Speciality Ingredients e • compostos almíscar via uma combinação de processo biotecnológico e sintético no Japão comercializados pela Nippon Miring Co (Jeffcoat & Willis, 1988).

Os componentes voláteis possuem estruturas químicas variadas, são termolábeis e são produzidos em pequenas quantidades. Esses fatores tornam as pesquisas de aroma muito complexas as quais envolvem, geralmente, quatro etapas: (1) isolamento dos compostos voláteis (2) separação da mistura complexa de voláteis (3) identificação dos compostos voláteis e (4) estudo da contribuição sensorial destes compostos (Bastos, 1996). Nos trabalhos envolvendo compostos voláteis que contribuem para a produção do aroma microbiano, a análise direta do vapor do “headspace” (Direct “Headspace”) está sendo a mais aplicada para a detecção desses compostos. Essa análise refere-se à retirada do vapor em equilíbrio com a amostra, em um sistema fechado a uma determinada temperatura, por uma seringa, e a imediata introdução no cromatógrafo gasoso (Ioffe, 1982; Twiddy, 1994).

2.3 Análise Sensorial

A contribuição sensorial dos compostos voláteis é importante nos estudos de produção de aromas por microrganismos (Bramorski *et al.* 1998; Christen *et al.* 1994; Cormier *et al.*, 1991). A aceitação ou rejeição de um alimento e sua preferência em relação

a outro dependem em grande parte da informação gerada pela análise sensorial. As pesquisas relacionadas a esses produtos tem como objetivo determinar a aceitabilidade do consumidor (IFF, 1996).

A análise sensorial pode ser definida como um conjunto de técnicas para medida e avaliação de determinadas propriedades dos alimentos por um ou mais dos sentidos humanos. Para a aplicação dos métodos de análise sensorial, emprega-se equipes de provadores selecionados, às vezes, necessariamente treinados que se baseiam em suas próprias impressões sensoriais para o julgamento de uma amostra. Desta forma pode-se dizer que o elemento humano é o aparelho que registra as medidas (Moraes, 1985).

Os métodos sensoriais são classificados em testes de diferença, de detecção, de ordenação, testes baseados em escalas hedônicas e testes descritivos. O procedimento analítico a ser empregado deve ser definido detalhadamente em função da pesquisa e do problema em questão. O tamanho da equipe, a seleção, o treinamento e as condições dos testes (local, horário, planejamento, equipamentos, procedimento, preparo das amostras e as fichas de avaliação) são aspectos que devem ser claramente definidos no início da análise.

A análise descritiva permite analisar e quantificar os diferentes atributos que configuram a qualidade sensorial de uma amostra. Para uma determinada característica, cada provador dará contribuição relevante e a magnitude da contribuição será refletida em nível de significância estatística e no grau de confiança atribuído ao resultado. O tratamento dos dados é feito por análise de variância de um ou dois fatores e também pelo grau de interação entre as respostas dos provadores (ASTM, 1981).

Aromas produzidos por microrganismos podem ser detectados em análise sensorial por pessoal devidamente treinado. Entretanto, esse método apresenta a desvantagem de ser subjetivo, além de existir a possibilidade de risco de inalação dos esporos fúngicos causando efeitos alérgicos nos provadores (Eriksson *et al.*, 1992). Com a aplicação prática dos aromas microbianos, muitos autores acham necessário incluir a avaliação sensorial nos seus trabalhos. A descrição e intensidade desses aromas pode ser facilmente conhecidas nos resultados sensoriais.

De acordo com Christen *et al.* (1994), o “aroma de banana” mais marcante produzido pelo fungo *Ceratocystis fimbriata*, foi detectado por análise sensorial. Outros descritores como “aroma de abacaxi, pera, maçã e castanha”, apresentando intensidade variada, também foram detectados na análise. A intensidade dos aromas produzidos por esse fungo também foram analisadas sensorialmente por Bramorski *et al.* (1998). Ambos trabalhos utilizaram um painel não-treinado com descrição aleatória do olfato percebido, na avaliação sensorial.

O método químico-sensorial combinado a equipe de provadores treinados pode identificar de forma mais objetiva o aroma microbiano através de técnicas que envolvem a avaliação sensorial dos efluentes de colunas cromatográficas, as quais empregam o nariz humano como detector de parte do efluente cromatográfico (Cormier *et al.*, 1991; Acree *et al.*, 1984).

3. Objetivos

O objetivo do presente estudo foi a caracterização de vinte e duas linhagens de *Neurospora* isoladas de beiju de mandioca e vegetação queimada nos Estados do Maranhão e São Paulo, e da linhagem *Neurospora sitophila* ATCC 46892 produtora de aroma, quanto às características fenotípicas e genotípicas. Para isso, foram utilizados caracteres morfológicos como cruzamentos e observação de esporos sexuais; métodos quimiotaxonômicos, como análise de perfil de proteínas totais; e métodos moleculares, como polimorfismo do rDNA 18S, rDNA 28S, região espaçadora 18S-28S e do gene histona *his-3*, procurando detectar marcadores moleculares no estudo de linhagens de *Neurospora* com potencial de produção de aroma.

4. Material e Métodos

4.1 Linhagens utilizadas

As linhagens de *Neurospora* estudadas no presente trabalho foram isoladas a partir de beiju de mandioca no Estado do Maranhão e a partir de vegetação queimada no Estado de São Paulo. As linhagens de referência foram obtidas de coleções de culturas e mantidas em Agar Malte inclinado a 4 ° C. A designação e origem das linhagens utilizadas encontram-se listadas nas tabelas II e III.

4.2 Isolamento e Condições de Cultivo

Os isolados foram inicialmente repicados em placas contendo os meios Dicloran-glicerol (Hocking & Pitt, 1980), meio Sintético para Cruzamento SC (Westgard & Mitchell, 1947), Agar Milho (Beadle & Tatum, 1945) e Agar Batata, e incubados a 25 ° C por 3 a 7 dias. Em seguida, para a obtenção de colônias isoladas, as linhagens fúngicas foram transferidas em meio Agar Milho, a partir dos quais foram feitas culturas estoque, no meio caldo malte 2% e mantidas à temperatura de – 80 ° C em glicerol. Os meios SC e Agar Milho foram utilizados no crescimento das linhagens fúngicas nos experimentos realizados neste trabalho.

O isolamento das linhagens fúngicas foi feito entre o terceiro e sétimo dia de incubação dos beijus em locais úmidos (Costa, 1994) e entre uma e quatro semanas após as queimadas (Pandit & Maeshwari, 1996), quando micélios de cor alaranjada tornam-se visíveis nestes substratos.

Tabela II. Designação das linhagens de referências de *Neurospora*

Linhagens	Fonte
<i>N. sitophila</i>	
NRRL 2884 (ATCC 36935)	Ontjom
CCT 0045 (NRRL 2884)	Ontjom
ATCC 46892	Beiju de mandioca
NRRL 5506 ^(a) (ATCC 56753)	Ontjom
<i>N. crassa</i>	
NRRL 2223	Solo
CCT 2680 (= ATCC 24698)	Solo
<i>N. tetrasperma</i>	
NRRL 2164	Solo

^(a) Linhagem da espécie *N. intermedia* reclassificada morfológicamente pela ATCC como sendo da espécie *N. sitophila* ATCC 56753

Tabela III. Designação e origem dos isolados de *Neurospora*

Linhagens	Fonte	Local
<i>Neurospora</i> sp.		
AC4	Vegetação queimada	Piracicaba, São Paulo, Brasil
AC5	Vegetação queimada	Piracicaba, São Paulo, Brasil
AC6	Vegetação queimada	Sta Maria da Serra, São Paulo, Brasil
AC7	Beiju de mandioca	Muquem, Maranhão, Brasil
AC8	Beiju de mandioca	Muquem, Maranhão, Brasil
AC9	Beiju de mandioca	Riacho do Meio, Maranhão, Brasil
AC10	D ^(a)	São José de Ribamar, Maranhão, Brasil
AC11	D ^(a)	São Luis, Maranhão, Brasil
AC12	Beiju de mandioca	Tutóia, Maranhão, Brasil
AC13	Beiju de mandioca	Tutóia, Maranhão, Brasil
AC14	Mandioca assada	Araras, São Paulo, Brasil
AC15	Cana-de-açúcar queimada	Paulínia, São Paulo, Brasil
AC16	Cana-de-açúcar queimada	Paulínia, São Paulo, Brasil
AC17	Vegetação queimada	Paulínia, São Paulo, Brasil
AC18	Vegetação queimada	Jaguariúna, São Paulo, Brasil

(continua na próxima página)

(continuação da Tabela III)

AC19	Vegetação queimada	Campinas, São Paulo, Brasil
AC20	Vegetação queimada	Campinas, São Paulo, Brasil
AC21	D ^(b)	Campinas, São Paulo, Brasil
AC22	D ^(b)	Campinas, São Paulo, Brasil
AC23	Solo com óleo diesel	Paulínia, São Paulo, Brasil
AC24	D ^(b)	Campinas, São Paulo, Brasil
AC25	Beiju de mandioca	Tutóia, Maranhão, Brasil

^(a) Doação do Laboratório de Microbiologia de Alimentos/UFMA – fonte não conhecida

^(b) Doação do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana/FEA/UNICAMP - fonte não conhecida

4.3 Caracterização Morfológica

As características morfológicas da fase anamórfica ou assexual e da fase telemórfica ou sexual foram registradas em ficha (Figura 2) e comparadas aos dados da chave de identificação do gênero *Neurospora*, descrita por Frederick *et al.* (1969) (TabelaV).

Tabela IV. Chave de identificação para o gênero *Neurospora* elaborado por Frederick *et al.* (1969).

I.	Ascus with 4 spores	
	A. Mature perithecia mostly 250-300 μ ; conidial masses pale salmon <i>N. tetrasperma</i> Shear & Dodge
	B. Mature perithecia larger	
	1. Asci about 250 μ long; conidial masses orange <i>N. erythraea</i> (Moll.) Shear & Dodge
	2. Asci about 190 μ long; conidial masses pink <i>N. toroi</i> Tai
II.	Ascis with 8 spores	
	A. Perithecia embedded in a stroma <i>N. phoenix</i> (Kze.) Dennis
	B. Perithecia not embedded in an expanded stroma	
	1. Heterothallic, with imperfect stage	
	a. Perithecia 200-300 μ <i>N. sitophila</i> Shear & Dodge
	b. Perithecia larger than 300 μ	
	(1) Ascospores mostly 23 x 13 μ <i>N. intermedia</i> Tai
	(2) Ascospores mostly 27-30 x 14-13 μ <i>N. crassa</i> Shear & Dodge
	2. Homothallic, without imperfect stage	
	a. Ascospores with one germ pore <i>N. terricola</i> Gochenaur & Backus
	b. Ascospores with a germ pore at each end	
	(1) Spores large, mostly 30-33 x 14-18 μ , ribs and intercostal veins prominent	
	i. Spores with 14-16 broad, mostly continous, conspicuous ribs <i>N. dodgei</i> Nelson <i>et al.</i>
	ii. Spores with 18-22, narrow, occasionally branched or anastomosed rib.....	<i>N. galapagosensis</i> Mahoney <i>et al.</i>
	(2) Spores smaller, mostly less than 25 μ long, intercostal veins distinct or inconspicuous	
	i. Intercostal veins distinct; spores broad, 14-17 μ in width <i>N. africana</i> Mahoney <i>et al.</i>
	ii. Intercostal veins indistinct; spores narrow, 10-15 μ in width <i>N. lineolata</i>

4.3.1 Observação dos esporos assexuados

As linhagens fúngicas foram transferidas para placas contendo o meio SC, incubadas à 30 ° C por 3 a 5 dias. Após o crescimento, com auxílio de uma espátula, um pedaço do meio (2 X 2 cm) contendo a cultura foi retirado cuidadosamente da placa, e adicionado à lâmina contendo o corante azul de algodão/lactofenol. A lâmina foi passada rapidamente sob bico de Bunsen (para derreter o meio) e coberta com uma lamínula. As formas vegetativas como hifas, conídios e septos características do gênero *Neurospora* foram observadas em microscopia óptica com contraste de fase.

4.3.2 Observação dos esporos sexuados

As linhagens fúngicas foram inicialmente cultivadas em placas contendo o meio Agar Milho e o Meio Sintético para Cruzamento SC, que favorecem o desenvolvimento da fase sexuada. Em seguida, as placas foram vedadas com fita crepe, incubadas no escuro a 25 ° C por 2 semanas, ou até o aparecimento de peritécios. Os peritécios produzidos pelas linhagens homotáticas foram transferidos para uma lâmina e rompidos com auxílio de uma agulha para a observação das características dos peritécios, ascos e ascósporos em microscópio óptico.

Para as linhagens heterotáticas, as quais não produzem peritécios foram feitos ensaios de cruzamento com as linhagens de referência heterotáticas *N. sitophila* NRLL 2884 *mating type a* e *N. crassa* NRRL 2223 *mating type A*. O método utilizado para

o cruzamento foi baseado na técnica de Pandit e Russo (1996). Para tanto, cada isolado foi inoculado junto com uma linhagem de referência em meio sintético modificado (sacarose 0.1% e adição de 0.5% de sorbose, 0.1% de extrato de levedura e 0.1% de casaminos) (Davis & De Serres, 1970) sobre pequenos pedaços de papel de filtro (4.0 X 4.0 cm). Os peritécios maduros e ascósporos podem ser observados em aproximadamente 12-18 dias como resultando do cruzamento positivo.

4.3.3 Dimensão dos micélios reprodutíveis

Os esporos foram medidos em micrometros (μm), com ajuda de uma lente ocular micrométrica, calibrada para cada uma das lentes objetivas. As ampliações foram calculadas pela fórmula:

$$\text{Ampliação do papel} = \text{objetiva} \times 3.2 \times \text{fator de ampliação.}$$

Onde:

$$\text{Fator de ampliação} = \text{tamanho da foto} \div \text{tamanho do negativo}$$

Figura 2. Ficha de registro de dados morfológicos

NÚMERO :					
FASE ANAMÓRFICA					
Condições de Cultivo					
Grau de crescimento	Lento	Moderado		Rápido	
Cor da colônia	Rósea	Laranja	Branco	Salmão	Pink
Mudança de cor no meio					
Textura da colônia	Pó	Compacta	Flocosa	Teias	
Odores	Mofento	Fragrância		Carente de odor	
Hifas septadas					
FASE TELEMÓRFICA					
Condições de Cultivo					
Quant./esporos no asco	Quatro		Oito		
Peritécio em estroma	Sim		Não		
Reprodução	Heterotálica		Homotálica		
Germe poro/ascósporos	1 poro germinativo		2 poros germinativos		
Estrias nos ascósporos	Evidente		Não evidente		
Tamanho peritécio (µm)					
Tamanho ascos (µm)					
Tamanho ascósporo (µm)					
Espécie					

4.4 Extração de Proteínas Totais

As extrações de proteínas totais das linhagens fúngicas foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Osherov e Gregory (1997). As linhagens fúngicas foram crescidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 20 mL de meio líquido (0.5% extrato de levedura, 1.0% dextrose) sob agitação (20 rpm) a 28 ° C por 14 horas. Aproximadamente 20 mg da massa celular e igual volume de pérola de vidro 0.1 mm foram suspensas em 200 µL de tampão uréia (1% SDS, 9M uréia, 25mM Tris-Cl, pH 6.8, 1mM EDTA, 0.7M mercaptoetanol, 0.02% azul de bromofenol), misturados vigorosamente e fervidos por 2 min. A suspensão foi agitada (vortex) por 1 min, fervida novamente por mais 1 min e o tubo mantido a – 20 ° C.

O volume de suspensão aplicado no gel de SDS-PAGE variou de 10 µL a 20 µL para as diferentes linhagens, e o peso molecular foi estimado comparando-se o tamanho das subunidades protéicas com o marcador de peso molecular de procedência Pharmacia Biotech (14.400 – 94.000 KDa).

4.5 Eletroforese de Proteínas Totais em Gel de SDS-PAGE

4.5.1 Montagem do Gel SDS-PAGE

A montagem do gel seguiu as especificações do “Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises” (1990-1991). A montagem do gel de separação (12.5%) e do gel de

empacotamento (4%) seguiu a tabela V. Primeiramente foi preparado o gel de separação com a adição das soluções na sequência indicada na tabela V, sob agitação. A solução foi transferida para os moldes das placas de vidro, e adicionado pequena quantidade de água com a finalidade de delinear uma dimensão reprodutiva do gel e evitar o contato com o oxigênio. Após a polimerização do gel, a água foi retirada e a mistura líquida do gel de empacotamento foi despejada sobre o gel de separação e sobre esta, um pente com 10 canaletas para subsequente aplicação da amostra.

As proteínas totais foram submetidas à eletroforese com gel submerso em tampão glicina pH 8.3 (Tris 25mM, Glicina 182mM, SDS 0.1%) durante aproximadamente 4 h, numa voltagem de 120V.

O volume indicado na tabela V foi calculado para o preparo de 2 géis de separação e 2 géis de empacotamento. Todas as soluções foram estocadas a 4 ° C, exceto o persulfato de amônio, que foi mantido a - 20 ° C, e o SDS e TEMED, à temperatura ambiente.

4.5.2 Impregnação dos Géis de Proteínas Totais com Prata

A metodologia de impregnação das proteínas com prata seguiu as especificações descritas por Blum *et al.* (1987). A sequência da técnica de impregnação por prata encontra-se na tabela VI. Os tempos de permanência de cada solução foram mantidos estritamente e a revelação interrompida quando todas as bandas tornaram-se bem visíveis. O gel foi mantido sob constante agitação durante todos os passos da impregnação com

prata.

Após a revelação das bandas proteicas, os géis foram lavados com água destilada, fotografado com filme colorido ASA 100 Kodak, mantidos entre dois papéis celofane previamente umedecidos com água e selados.

Tabela V. Volume das soluções utilizadas no preparo do gel de SDS-PAGE

	Gel de Separação	Gel de Empacotamento
	10% T; 2,7% C	4% T; 2,7% C
Solução de Monômero (acrilamida)	25,0 mL	2,66 mL
Tris-Cl 1,5 M pH 8,8	15,0 mL	—
Tris-Cl 0,5 M pH 6.8	—	5,0 mL
SDS 10%	0,6 mL	0,2 mL
H ₂ O	19,1 mL	12,2 mL
Persulfato de Amônio 10%	300 µL	100 µL
TEMED	20 µL	10 µL

4.5.3 Impregnação dos Géis de Proteínas Totais com Coomassie-Blue

A visualização das bandas de proteínas com o corante coomassie-blue seguiu as especificações do “Hoefler Electrophoresis Catalog and Exercises” (1990-1991). A sequência da técnica de impregnação por coomassie-blue encontra-se na tabela VII. O

procedimento com a solução de descoloração II foi repetido até a completa remoção da coloração de fundo, persistente no gel. Após a revelação das bandas proteicas, o gel foi fotografado e mantido como descrito anteriormente.

Tabela VI. Soluções para impregnação com prata

Soluções	Tempo
Fixador (metanol 50 %; ácido acético 12 %; formaldeído 37 % 0,5 mL/l)	1 h
Etanol 50 %	3 X 20 min
Tiosulfato de sódio 0,02 %	1 min
H ₂ O destilada	3 X 20 seg
Nitrato de prata 0,2 % + 75 µL de formaldeído p/ 100 mL	20 min
H ₂ O destilada	2 X 20 seg
Solução reveladora (carbonato de sódio 6 %; tiosulfato de sódio 4 mg/mL; formaldeído 37% 0,5 mL)	+/- 5 min
H ₂ O destilada	2 X 1 min
Solução "stop" (metanol 50 %; ácido acético 12 %)	10 min
Metanol 50 %	20 min

Tabela VII. Soluções para impregnação com coomassie-blue

Soluções	Tempo
Solução corante (coomassie-blue R-250 0,12 %; metanol 40 %; ácido acético 7 %)	12-18 hs
Solução de descoloração I (metanol 50 %; ácido acético 10 %)	1 h
Solução de descoloração II (metanol 5 %; ácido acético 7 %)	2 h

4.5.4 Análise Computacional dos Géis de SDS-PAGE

O perfil de proteínas totais de cada linhagem foi analisado através de programa GelCompar Versão 4.1 Applied Maths BVBA (1992-1998). O programa utilizado neste estudo calculou a similaridade dos perfis de proteínas das linhagens de *Neurospora* spp. com as linhagens de referência, formando uma matriz de similaridade de bandas (coeficiente de Jaccard). A matriz de similaridade gerou um dendrograma representando as semelhanças entre os perfis de proteínas pelo UPGMA.

4.6 Extração do DNA Genômico em pequena escala

O método utilizado para extração do DNA genômico em pequena escala foi baseado na técnica de Pitcher *et al.* (1989) modificado. As linhagens fúngicas foram

inoculadas em meio caldo malte 2 %, a partir de um pré-repique em Agar Batata inclinado, incubado a 25 ° C por 5 dias. Os frascos foram incubados à temperatura ambiente por 24 horas a 20 rpm. Com auxílio de uma alça estéril a biomassa foi transferida para tubos de centrífuga (volume 1,5 mL), lavada 3 vezes com 500 µL de tampão (NaCl 0,1 M; EDTA 0,1 M), e então centrifugada a 6500 rpm por 2 min.

Após a remoção do sobrenadante pérolas de vidro de 0,1 mm foram adicionadas ao sedimento. Com auxílio de um bastão de plástico, a biomassa foi macerada até a obtenção de uma massa lisa, quando então foi suspensa em 100 µL de SUC-TE pH 8.0 (sacarose 0,3 M; Tris 25 mM pH 8.0; EDTA 25 mM). A seguir, 500 µL de solução de tiocianato de guanidina (tiocianato de guanidina 5 M; EDTA 0,5 M pH 8.0; N-lauril sarcosina 10 %) foram adicionados ao tubo e este agitado em vortex brevemente e mantido à temperatura ambiente por 10 min. O tubo foi resfriado em gelo e ao lisado fúngico foram adicionados 250 µL de acetato de amônio 7,5 M. O tubo foi invertido várias vezes suavemente e mantido no gelo por 10 min. Após a incubação em gelo, 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v) foram adicionados e o tubo invertido manualmente com força até completa emulsificação. A suspensão foi centrifugada a 12000 rpm por 10 min, a fase aquosa transferida para novo tubo de centrífuga e 430 µL de isopropanol foram adicionados para precipitar o DNA. O tubo foi invertido várias vezes até a mistura das soluções e a visualização de um precipitado fibroso branco. A suspensão foi centrifugada a 6500 rpm por 1 min e o DNA precipitado lavado 3 vezes com etanol 70 % (v/v). O DNA foi suspenso em 200 µL de TE pH 8.0 (EDTA 0,5 M pH 8,0; Tris-Cl 1 M

pH 8,0), e posteriormente adicionou-se 2 µL de RNase (10 mg/mL) seguido de incubação a 37 ° C por 1 h. Permanecendo “overnight” na geladeira. Os tubos foram mantidos a 4 ° C durante à noite.

No outro dia foi adicionado 40 µL de cloreto de lítio para precipitação do DNA e em seguida 240 µL de clorofórmio-álcool isoamílico para remoção de proteínas. A solução foi emulsificada e centrifugada a 12000 rpm por 8 min. A fase aquosa foi recuperada e o DNA precipitado com 400 µL de etanol. O tubo foi invertido vagarosamente até a formação de um precipitado fibroso branco e centrifugado a 6500 rpm por 1 min. O DNA precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 70 % (v/v), seco no forno de hibridização a 37^o C, suspenso em 20 µL de H₂O Milli-Q esterilizada, e mantido a 4 ° C.

A pureza e quantificação do DNA foram verificadas através de leitura em espectrofotômetro (Gene Quant Pharmacia).

4.7 Eletroforese de DNA em Gel de Agarose

O DNA foi visualizado através do sistema de eletroforese horizontal com gel de agarose submerso. A concentração do gel foi de 0,8 %, e a agarose foi fundida em tampão TBE 1X (solução estoque TBE 5X: 0,1 M Tris; 0,1 M ácido bórico; 2 mM EDTA pH 8,0), com acréscimo de 1 µL/100 mL de solução de brometo de etídio (10 mg/mL), sendo o mesmo tampão utilizado para as corridas eletroforéticas.

Um µL do DNA foi misturado com 2 µL do tampão de amostra (ficoll 400

15 %; azul de bromofenol 0,25 %; xileno cianol FF 0,25 %) e aplicados nas canaletas. Foram utilizados os padrões de λ DNA (50 e 100 ng/ μ L). As condições de corrida foram de aproximadamente 40 minutos a 80 V. Após o término da corrida a visualização das bandas foi feita em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados com filme preto e branco de revelação instantânea ASA 600 Polaroid.

4.8 Amplificação de DNA por PCR

Os genes do rDNA 18S, 28S, ITS e da proteína histona das linhagens de *Neurospora* sp. foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.8.1 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação do DNA

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene rDNA 18S, rDNA 28S, ITS e da proteína histona foram sintetizados pela Gibco (Life Technologies). Estes oligonucleotídeos iniciadores encontram-se listados na tabela VIII. Os oligonucleotídeos foram suspensos em água Milli-Q esterilizada para concentração final de 200 μ M (Matrix), volume calculado pela fórmula: $V (l) = m (g) \div Mol (P.M) \times C (M)$. Foi feita leitura de absorbância a 260 nm da diluição de 1 μ L da Matrix + 99 μ L de água Milli-Q. A solução trabalho utilizada foi de concentração de 20 a 30 μ M, obtida a partir de diluições da solução estoque (Matrix), e ambas mantidas a $-20^{\circ}C$.

Tabela VIII. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo

Nome	Sequência (5'para 3')	Região	Nº. pb	Tm °	Referência
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC			49	White <i>et al.</i> , 1990
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA	rDNA 18S	1800	59	White <i>et al.</i> , 1990
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG			57	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	"spacer"	540	53	White <i>et al.</i> , 1990
LROR	ACCCGCTGAACTTAAGC			52	Gargas & Depriest, 1996
LR7	TACTACCACCAAGATCT	rDNA 28S	1300	48	Gargas & Depriest, 1996
H3-1a	ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG			61	Glass & Donaldson 1995
H3-1b	GCGGGCGAGCTGGATGTCCCT	Histona	470	65	Glass & Donaldson 1995

4.8.2 Reação de PCR

As reações de PCR foram realizadas em máquina automática de termociclagem (Perkin-Elmer thermo cycler modelo 9600) usando tubos de centrifuga de 0,2 mL. A enzima *Taq* DNA polimerase e o tampão para a reação foram de procedência Pharmacia Biotech, assim como as soluções estoque dos deoxiribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), os quais foram misturados em quantidades equimolares para uma concentração final de 25 mM.

As reações foram realizadas num volume de 50 µL utilizando-se 2 U de *Taq*

polimerase por reação. Os reagentes foram misturados em tubos de polipropileno de 0,2 mL, sempre mantidos em gelo, na seguinte ordem:

	Tampão da enzima (10X)	MgCl ₂ (50 mM)	Iniciador 1 (30 mM)	Iniciador 2 (20 mM)	dNTPs (25 mM)	H ₂ O ^(a)	DNA	Taq DNA
RDNA 18S	5,0 µL	0,5 µL	0,6 µL	1,0 µL	0,4 µL	37,1 µL	5,0 µL	0,4 µL

^(a) H₂O Milli-Q esterilizada

Os conteúdos dos tubos foram rapidamente misturados, e colocados na máquina de termociclagem. As reações foram submetidas às seguintes condições para cada par de *primers*:

Técnica	Temper. Inicial	Denaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final
rDNA 18S	95° C	94° C	57° C	72° C	72° C
	2 min	1 min	1 min	2 min	3 min
			32 ciclos		
rDNA 28S	95° C	94° C	56° C	72° C	72° C
	2 min	1 min	1 min	1 min	3 min
			32 ciclos		
ITS	95° C	94° C	50° C	72° C	72° C
	2 min	1 min	1 min	1 min	3 min
			32 ciclos		
his-3	95° C	94° C	57° C	72° C	72° C
	2 min	1 min	1 min	1 min	3 min
			32 ciclos		

Após as reações os tubos foram mantidos a 4 ° C e os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Aproximadamente 5 µL do produto de amplificação da reação foram adicionados nas canaletas e os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados de acordo com o tamanho dos fragmentos de marcadores de peso molecular 1 Kb (Ready Load™ 1kb Ladder) e 100 pb (Ready Load™ 100 pb Ladder) da Pharmacia Biotech.

4.9 Digestão dos DNAs com Enzimas de Restrição

Os rDNAs amplificados por PCR das linhagens de *Neurospora* spp. foram primeiramente clivados com as enzimas de restrição *Alu* I, *Ava* II, *BamH* I, *Dde* I, *Dra* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Sau3A* I e *Taq* I (Pharmacia Biotech., Sigma, Gibco e Promega) nas condições recomendadas pelo fabricante. O rDNA 28S e a região espaçadora ITS amplificados das linhagens de referência foram também clivados com as enzimas de restrição *Bgl* I, *Hind* III, *Pst* I, *Sac* I, *Sac* II, *Sal* I e *Sma* I. Os produtos de digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 3,0 %. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados por comparação com os marcadores de peso molecular 1 Kb (Ready Load™ 1kb Ladder), 50 e 100 pb (Ready Load™ 50 e 100 pb Ladder) da Pharmacia Biotech. Os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados em transluminador de luz UV, e fotografados com filme Polaroid.

4.10 Análise Sensorial

4.10.1 Preparo das Amostras

A partir de um pré-crescimento em meio de cultura Agar Batata inclinado, a 25 ° C por 5 dias, as linhagens fúngicas foram inoculadas em frascos de 125 mL contendo 50 mL do meio caldo malte 2%. Os frascos foram incubados a 28 ° C por 4 a 6 dias a 150 rpm.

4.10.2 Avaliação das Amostras e Análise dos Resultados

Para a avaliação do aroma de frutas, foram apresentados aos provadores 30mL de cada amostra em copos tipo tulipa (taças de vinho), cobertas com placas descartáveis e codificadas com número de três dígitos. As avaliações foram realizadas por um painel não-treinado consistindo de doze membros, sem restrições de termos descritivos. Em cada grupo de prova continha um padrão, representado pela linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892, e três amostras codificadas. Foram atribuídos valores de 0 a 9, sendo 0= nenhuma diferença e 9= estranha diferença e os provadores descreveram as similaridades e diferenças utilizando-se uma ficha de avaliação sensorial (Figura 3).

A análise foi efetuada em duplicata, e os dados obtidos foram primeiramente submetidos a uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunett ($p \leq 0.05$).

Figura 3. Ficha de avaliação sensorial

Ficha de Avaliação Sensorial		
<p>Avalie o aroma da amostra padrão codificada com a letra P. Em seguida avalie o aroma de cada amostra codificada, comparando-a com o padrão P. Indique na escala abaixo o grau de diferença de cada amostra codificada com relação a P e descreva a diferença.</p>		
	0	
	1	Nenhuma diferença
	2	
	3	Ligeira diferença
	4	
	5	Moderada diferença
	6	
	7	Muito diferente
	8	
	9	Extranha diferença
Amostra	Valor	Descrição
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

5. Resultados

5.1 Análise da Morfologia

Linhagens de *Neurospora* foram isoladas da superfície de plantas, 14-20 dias após a queimada (Figura 4A) e da superfície de beijos de mandioca, 3-5 dias após a incubação em local úmido, quando os micélios de cor laranja apresentavam-se visíveis e abundantes. Temperaturas amenas entre 20 e 25 ° C favoreceram o crescimento micelial nestes substratos.

O crescimento vegetativo das linhagens de *Neurospora* nos meios Agar Batata e SC foi rápido (3-5 dias) e abundante, consistindo de hifas aéreas desenvolvendo-se para fora das placas nesse período. Nos meios Dicloran-glicerol e Agar Milho o crescimento foi lento (5 a 7 dias) porém não espalhado, consistindo de micélios esparsos. As linhagens apresentaram hifas aéreas ramificadas e septadas com 6.0-6.5µm de espessura e conídios ovais marrom escuros medindo 4.0-6.5X6.0-10.0 µm (Figura 4B). A textura e coloração das colônias foram verificadas no meio SC após 6 dias de crescimento a 25°C. As linhagens AC7, AC8, AC9, AC12, AC13, AC21, AC23, AC24, AC25 apresentaram textura flocosa, e as demais textura algodonosa. A coloração laranja foi observada nos isolados AC4, AC7, AC8, AC9, AC12, AC13, AC25 e a coloração rósea nos demais.

Formação de peritécios no meio Agar Milho foi observada nas linhagens AC4, AC5, AC14, AC15, AC19 e AC20, entre 2 a 3 semanas de crescimento. Estas

linhagens diferenciaram quanto ao tamanho e aparência dos esporos sexuais (ascósporos) e corpos de frutificação (peritécios) (Tabela IX). Tais informações e características relacionadas ao tamanho dos ascos, estrias, poro germinativo e quantidade de ascósporos nos ascos foram comparadas às da chave de identificação do gênero *Neurospora* (Frederick *et al.*, 1969) (Tabela IV) com o objetivo de identificar os isolados em nível específico. As linhagens AC4, AC5, AC14, AC15 e AC19 foram identificadas como *N. tetrasperma*, *N. africana*, *N. lineolata*, *N. dodgei* e *N. galapagosensis*, respectivamente (Figuras 5 a 9). As informações referentes à linhagem AC20 não apresentaram semelhança com nenhuma das espécies descritas (Figura 10).

O cruzamento com as linhagens de referência *N. sitophila* NRRL 2884 e *N. crassa* NRRL 2223 permitiram a identificação dos isolados AC7, AC8, AC10, AC11, AC12, AC13, AC18, AC21, AC24 e AC25 como *N. sitophila* e os isolados AC6, AC9, AC16, AC17 e AC22 como *N. crassa*, com aparecimento dos peritécios em aproximadamente 10 dias (Figura 11, Tabela X). Os ascósporos resultantes do cruzamento entre a linhagem *N. sitophila* NRRL 2884 e as linhagens AC7, AC8, AC10, AC11 e AC13 foram similares no tamanho, os quais mediram 20-26 X 10-15 µm. Apresentaram semelhanças também os ascósporos resultantes do cruzamento entre a linhagem de referência *N. crassa* NRRL 2223 e o isolado AC6 que mediram 27 X 13 µm em diâmetro. O tamanho dos ascósporos produzidos pelos demais isolados não foram determinados.

Peritécios não foram produzidos no cruzamento entre a linhagem de *Neurospora* AC23 e as linhagens *N. sitophila* NRRL 2884 *mating type a* e *N. crassa* NRRL 2223 *mating type A*, resultando em cruzamento infértil (Tabela X).

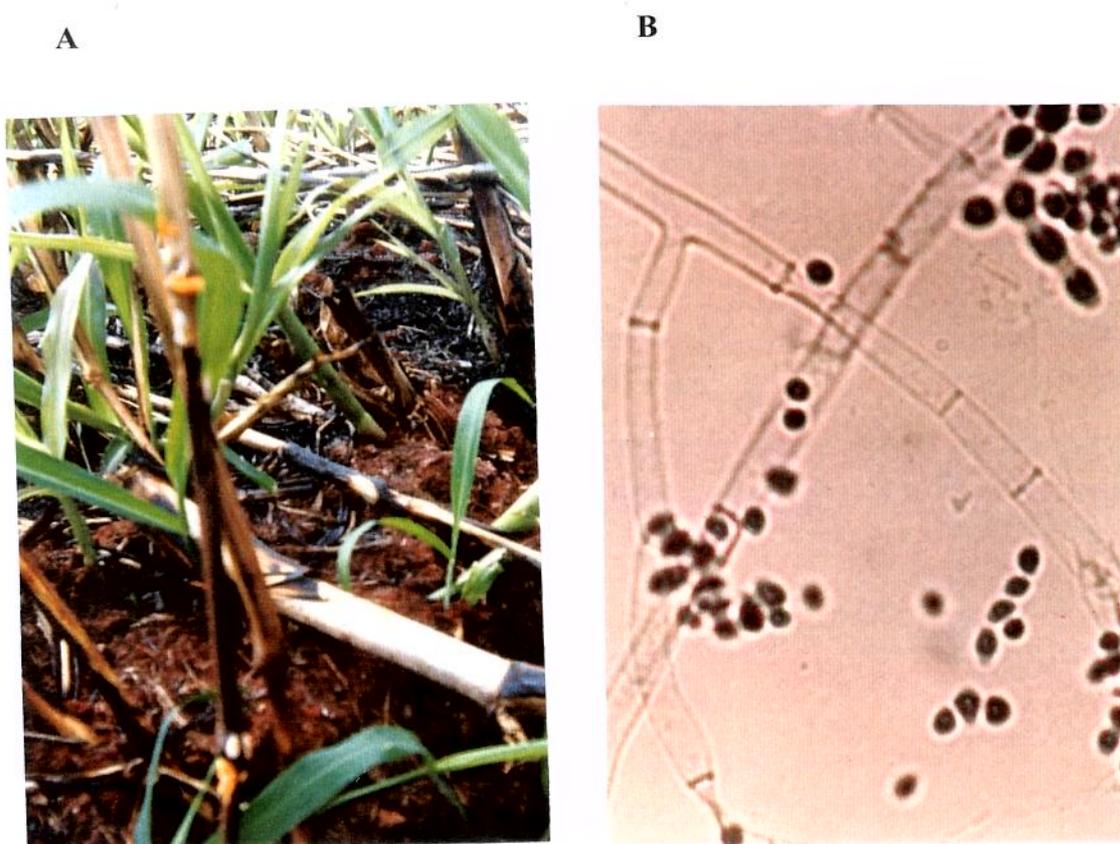


Figura 4. *Neurospora* sp. **A.** micélio na superfície de plantas de cana-de-açúcar após 20 dias da queimada; **B.** hifas septadas e conídios ovais (548 x).

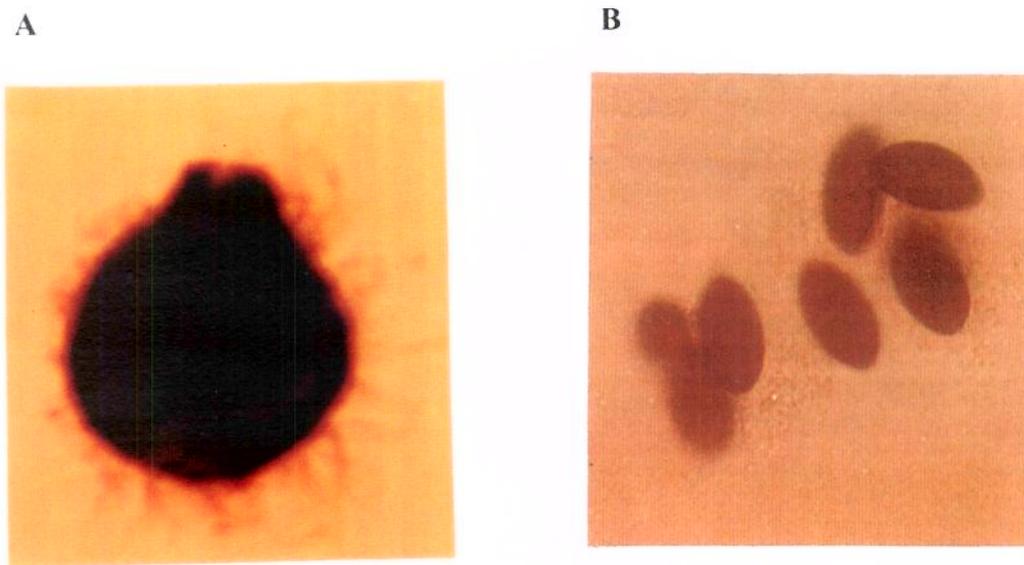


Figura 5. *Neurospora tetrasperma*, AC4. **A.** peritécio (1370 x); **B.** ascósporos (548 x).

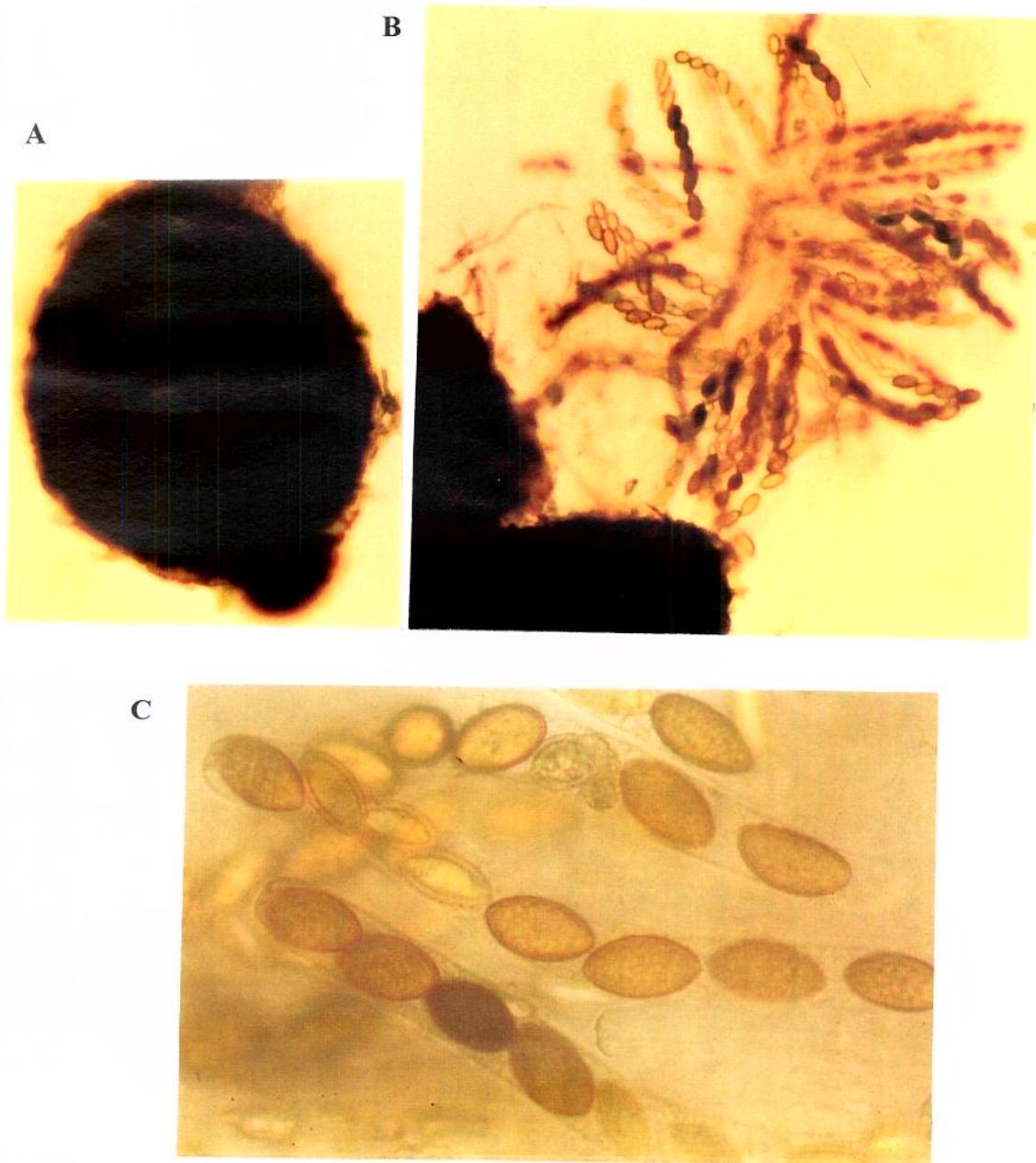


Figura 6. *Neurospora africana*, AC5. **A.** peritécio (1370 x); **B.** ascos e ascósporos (548 x); **C.** ascos (1370 x).

A



B



Figura 7. *Neurospora lineolata*, AC14. **A.** ascos e ascósporos (274 x); **B.** ascos (548 x).

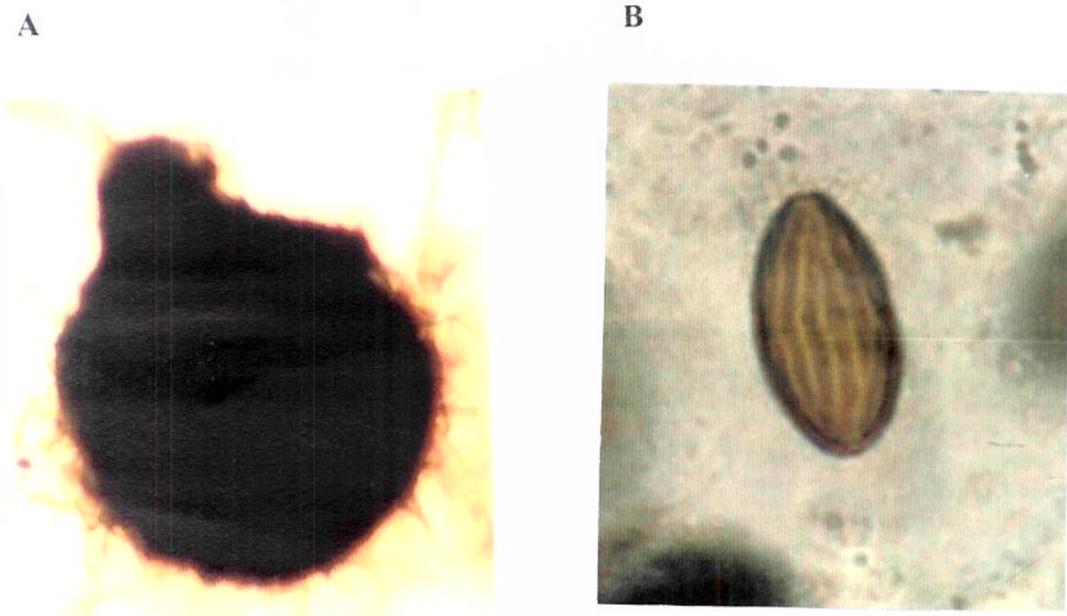
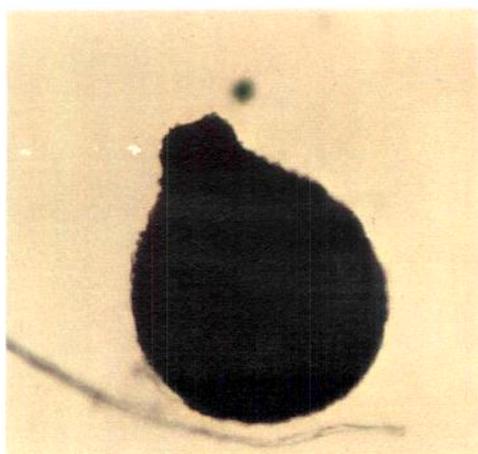


Figura 8. *Neurospora dodgei*, AC15. **A.** peritécio (137 x); **B.** ascósporos (1370 x).

A



B

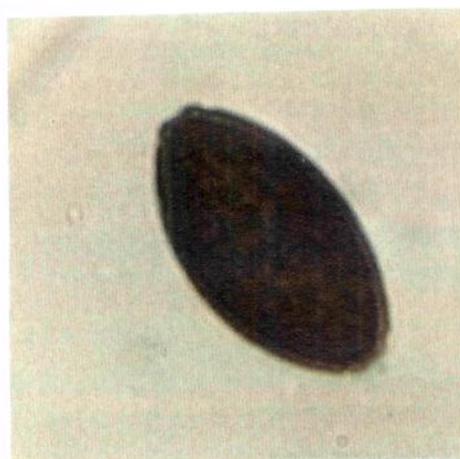
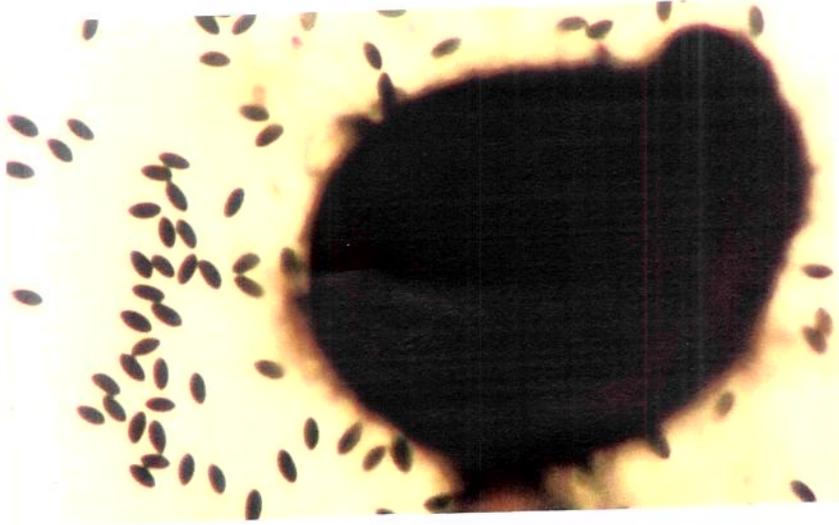


Figura 9. *Neurospora galapagonensis*, AC19. A. peritécio (137 x); B. ascósporos (1370 x).

A



B



Figura 10. *Neurospora* sp. AC20. A. peritécio (137 x); B. ascósporos (1370 x).

Tabela IX. Características morfológicas dos isolados de *Neurospora* homotéticas provenientes do Estado de São Paulo em Agar Milho (CMA) após 14-20 dias de crescimento a 25 °C

Isolados	Nº de		Estrias nos	Tamanho dos		Tamanho dos		Tamanho dos
	ascósporos	germinativo		ascósporos	peritécios	ascósporos	ascos	
				(µm)	(µm)	(µm)	(µm)	
<i>N. tetrasperma</i> , AC4	ND	2	Não evidentes	250-300x300-350	26-28x15			ND
<i>N. africana</i> , AC5	8	2	Não evidentes	350-400x450-500	25-30x15-17			180-200x18-20
<i>N. lineolata</i> , AC14	8	2	Não evidentes	ND	18-22x10-13			200x18
<i>N. dodgei</i> , AC15	ND	2	Evidentes	400x500	31x16-18			ND
<i>N. galapagonensis</i> , AC19	ND	2	Evidentes	250-280x300-380	35-18			ND
<i>Neurospora</i> sp., AC20	ND	2	Não evidentes	400x500	35-45x20			ND

ND = não determinado

Tabela X. Ensaio de cruzamento dos isolados de *Neurospora* sp. com linhagens de referência.

Linhagens	<i>Neurospora sitophila</i>	<i>Neurospora crassa</i>
	NRRL 2884	NRRL 2223
AC6	-	+
AC7	+	-
AC8	+	-
AC9	-	+
AC10	+	-
AC11	+	-
AC12	+	-
AC13	+	-
AC16	-	+
AC17	-	+
AC18	+	-
AC21	+	-
AC22	-	+
AC23	-	-
AC24	+	-
AC25	+	-

+ = produção de peritécio e ascósporos

- = cruzamento infértil

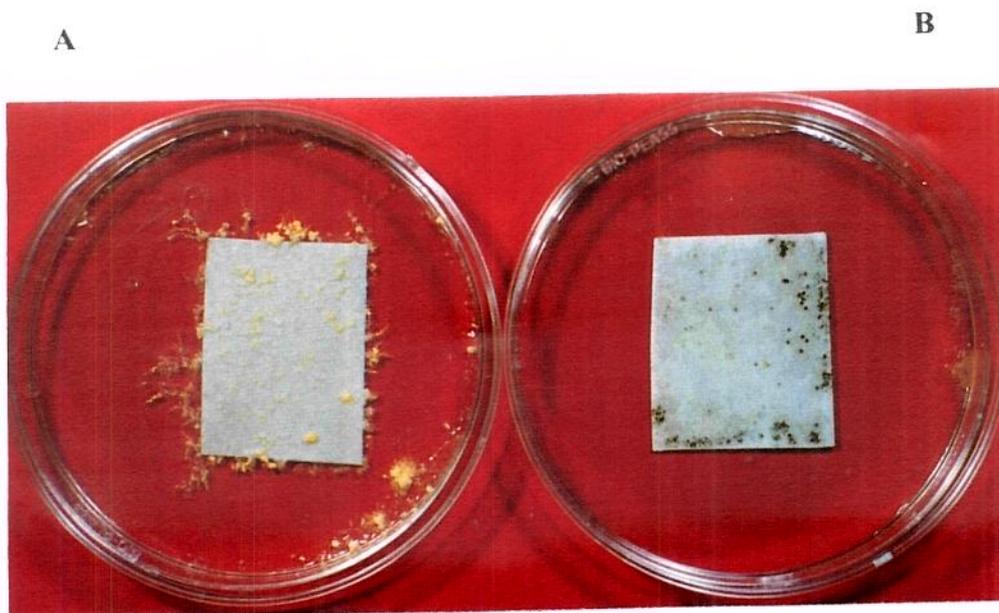


Figura 11. Crescimento em superfície de papel de filtro do isolado de *Neurospora* AC6 e linhagens de referência após 10 dias de crescimento a 25° C, no escuro. **A.** *N. sitophila* 2884; **B.** *N. crassa* NRRL 2223.

5.2 Perfil de Proteínas Totais

As linhagens de *Neurospora* isoladas de beiju de mandioca, vegetação queimada e a linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892 foram comparadas através da análise de proteínas totais por eletroforese em SDS-PAGE. Os perfis de bandas de proteínas de cada linhagem foram analisados no programa GelCompar e a similaridade dos isolados com as linhagens de referência demonstrados na forma de dendrograma (Figura13).

A análise visual do perfil de proteínas totais em SDS-PAGE 12,5 % indicou a presença de diferentes padrões nas linhagens de *Neurospora* com subunidades protéicas que variaram de 10 a 90 KDa. As linhagens de referência de *Neurospora* apresentaram perfis de proteínas totais distintos, principalmente na faixa de 30,0 a 43,0 KDa (Figura 12). As linhagens *N. sitophila* NRRL 2884, CCT 0045 e NRRL 5506 (canaletas 2, 3 e 7) apresentaram perfis de proteínas similares, assim como as linhagens *N. crassa* NRRL 2223 e CCT 2680 (canaletas 5 e 6). A linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892 e *N. tetrasperma* NRRL 2164 (canaletas 4 e 8) apresentaram perfis de proteínas totais distintos entre si e das demais.

A figura 13 (a,b,c) mostra que as linhagens de *Neurospora* AC10, AC11, AC18, AC21, AC24 e *N. intermedia* NRRL 5506 apresentaram perfil de proteínas totais correspondente ao da linhagem *N. sitophila* NRRL 2884 e CCT 0045, com 70 a 90 % similaridade. As linhagens AC6, AC16, AC17 e AC22 apresentaram perfil de proteínas totais correspondente ao da linhagem *N. crassa* NRRL 2223 e CCT 2680, com 70 a 95 %

similaridade. Perfis de proteínas totais semelhantes foram encontrados ainda entre a linhagem AC4 e *N. tetrasperma* NRRL 2164, com 92 % similaridade. As linhagens AC5, AC14, AC15, AC19, AC20 e AC23 apresentaram perfis de proteínas totais distintos quando comparados com as linhagens de referências em estudo.

O perfil de proteínas totais da linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892 e das linhagens AC7, AC8, AC9, AC12, AC13 e AC25 foi semelhante (80 a 100 % de similaridade) sendo distinto das demais linhagens analisadas (Figura 13 a, b, c). A figura 14 (canaletas 2 a 8) mostra o perfil de proteínas totais semelhantes para este grupo de microrganismos isolados do mesmo substrato (beiju de mandioca) no Estado do Maranhão. Porém, as linhagens AC10 e AC11, isoladas de diferentes substratos (Tabela III) mas, do mesmo local (Estado do Maranhão) apresentaram perfis de proteínas totais diferentes (Figura 14, canaletas 9 e 10).

A análise numérica dos perfis de proteínas totais permitiu a determinação do grau de similaridade entre as linhagens estudadas (Figuras 12 a 14). Os dendrogramas revelaram 4 grupos com aproximadamente 80 % de similaridade, e 6 linhagens, AC5, AC14, AC15, AC19, AC20 e AC23, que não foram agrupadas com as linhagens de referência em estudo.

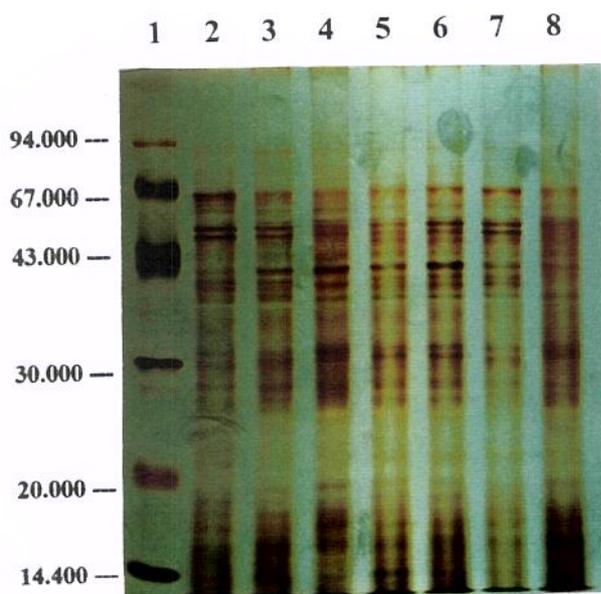


Figura 12. Perfil eletroforético de proteínas totais das linhagens de referência de *Neurospora*.

- | | |
|---|------------------------------------|
| 1. Padrão de Peso Molecular (14,4 a 94,0 KDa) | 5. <i>N. crassa</i> NRRL 2223 |
| 2. <i>N. sitophila</i> NRRL 2884 | 6. <i>N. crassa</i> CCT 2689 |
| 3. <i>N. sitophila</i> CCT 0045 | 7. <i>N. intermedia</i> NRRL 5506 |
| 4. <i>N. sitophila</i> ATCC 46892 | 8. <i>N. tetrasperma</i> NRRL 2164 |

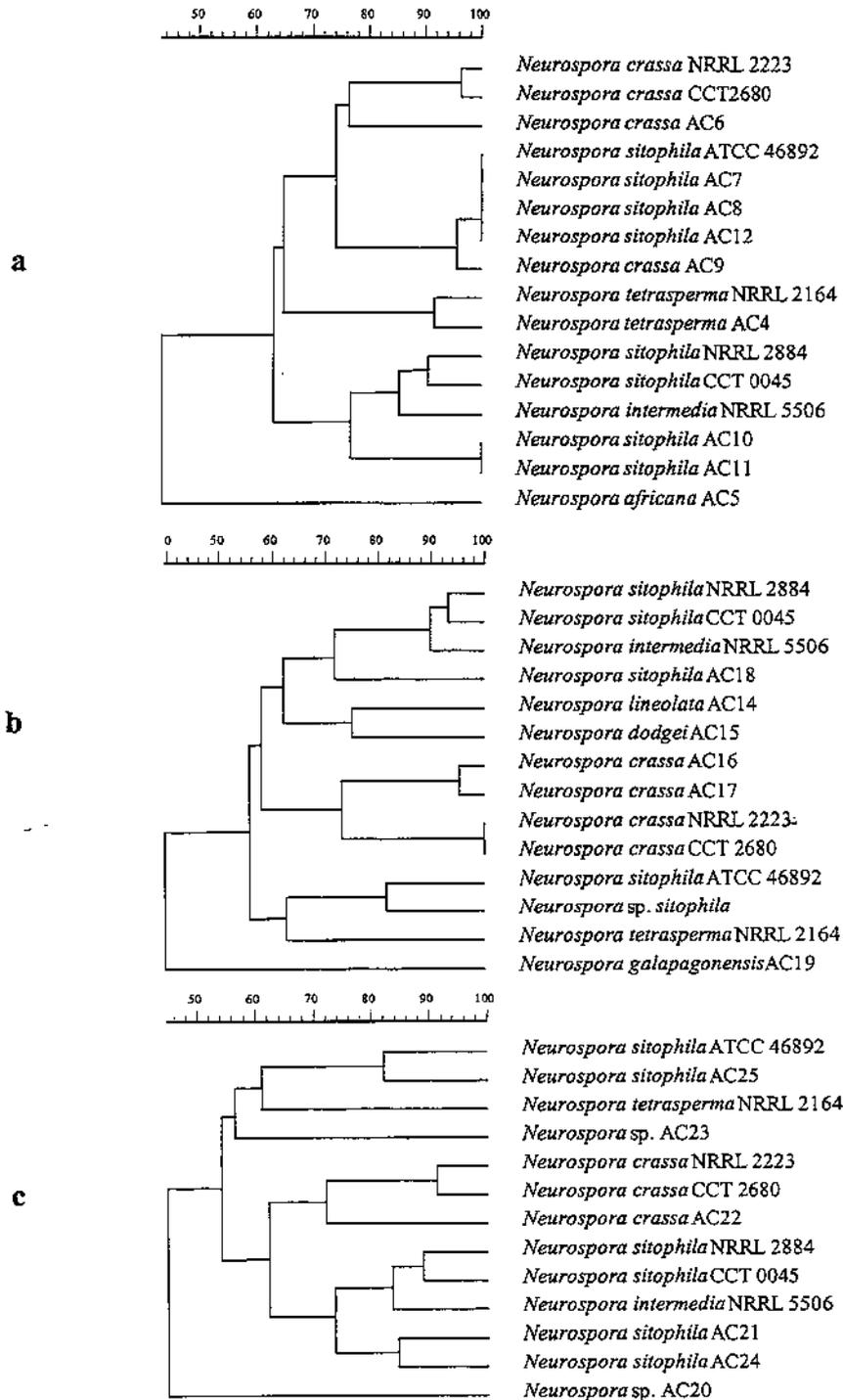


Figura 13 (a,b,c). Dendrogramas representando a relação entre as linhagens de referência e as linhagens de *Neurospora* isoladas do beiju de mandioca e vegetação queimada nos Estados do Maranhão e São Paulo, baseado no perfil de proteínas totais em SDS-PAGE

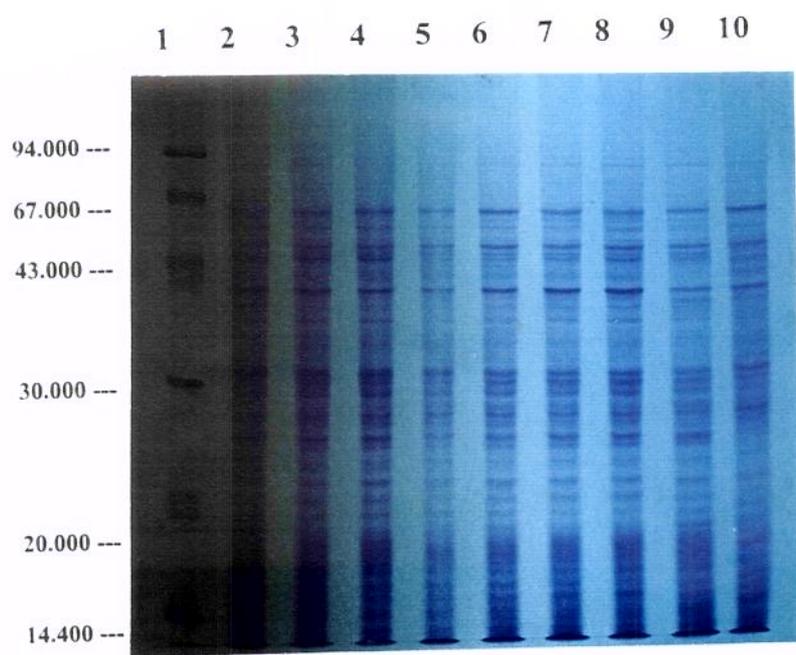


Figura 14. Perfil eletroforético de proteínas totais das linhagens de *Neurospora* isoladas do Estado do Maranhão.

- | | |
|---|----------|
| 1. Padrão de Peso Molecular (14,4 a 94,0 KDa) | 6. AC12 |
| 2. <i>N. sitophila</i> ATCC 46892 | 7. AC13 |
| 3. AC7 | 8. AC25 |
| 4. AC8 | 9. AC10 |
| 5. AC9 | 10. AC11 |

5.3 Polimorfismo do rDNA 18S, 28S, 18S-28S e H3-1

O DNA genômico das linhagens de *Neurospora* foi isolado a partir da massa celular. Aproximadamente 30 mg do material foi suficiente para extração em 500 μL de tampão. A quantidade de DNA por este protocolo variou de 70 a 100 ng/ μL , com pureza em torno de 85% apresentando pouca degradação (Figura 15).

A amplificação com os oligonucleotídeos NS1 e NS8 (18S), LROR e LR7 (28S), ITS1 e ITS4 (ITS), H3-1a e H3-1b (histona), resultou em fragmentos de aproximadamente 1800, 1300, 540 e 470 pares de bases (pb), respectivamente (Figura 16, canaletas A, B, C e D). Não foi observada variação nos tamanhos dos fragmentos entre as linhagens de referência em estudo (Figura 16, canaletas 2, 3, 4 e 5; A, B, C e D). Estes fragmentos amplificados foram digeridos com enzimas de restrição para análise de polimorfismos e os resultados encontram-se na tabela XI.

A digestão do fragmento correspondente ao rDNA 18S das linhagens de referência de *Neurospora* com a enzima *Hae* III resultou em padrões polimórficos (Figura 17). A linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892 apresentou o mesmo padrão de restrição que as linhagens de referência *N. crassa* NRRL 2223 e CCT 2680 (Figura 17, canaletas 5, 4 e 13), assim como a maioria dos demais isolados (Figura 17). As linhagens AC4 e AC15 apresentaram padrão de restrição igual ao de *N. tetrasperma* NRRL 2164 (Figura 17, canaletas 8, 9 e 3).

As enzimas mais indicadas na detecção de polimorfismo com o fragmento correspondente ao gene da proteína histona his-3 foram *Dde* I e *Hae* III. A digestão com a

enzima *Dde* I resultou em padrões diferentes entre as linhagens de referência *N. sitophila* NRRL 2884, CCT 0045 e *N. intermedia* NRRL 5506 com fragmentos de 290, 180 e 120 pb estimados de acordo com o tamanho dos fragmentos de marcadores de peso molecular padrão de 100 pb (Figura 18, canaletas 2, 3 e 7) e *N. crassa* NRRL 2223, CCT2680, *N. sitophila* ATCC 46892 e *N. tetrasperma* NRRL 2164 com fragmentos de 250, 180, 120 e 40 pb (Figura 18, canaletas 5, 6, 4 e 8).

A linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892, as linhagens *N. crassa* NRRL 2223, CCT 2680, os isolados do mesmo local (Maranhão), AC7, AC8, AC9, AC10, AC11, AC12, AC13 e AC25, e a linhagem de *Neurospora* AC19, apresentaram perfis idênticos de restrição (Figura 18, canaletas 4, 5, 12-18, 24 e 30). Os demais isolados de *Neurospora* sp.; AC4, AC5, AC6, AC14, AC16, AC17, AC18, AC20, AC21, AC22, AC23 e AC24 apresentaram o mesmo padrão de restrição que as linhagens de referência *N. sitophila* NRRL 2884, CCT 0045 e NRRL 5506 (Figura 18, canaletas 2-3, 7, 9-11, 19, 21-23 e 25-29), com exceção da linhagem AC15 que apresentou um perfil completamente diferente (Figura 18, canaleta 20).

A enzima *Hae* III mostrou polimorfismo no gene da proteína histona his-3 entre as linhagens de *Neurospora* analisadas, separando-as em dois grupos. Um grupo foi formado pelas linhagens *N. sitophila* NRRL 2884, CCT 0045, AC4, AC5, AC6, AC14, AC15, AC16, AC17, AC18, AC20, AC21 e AC22 apresentando fragmentos de 450 e 20 pb. As linhagens *N. crassa* NRRL 2223, CCT 2680, a produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892, e os isolados AC7, AC8, AC9, AC10, AC11, AC12, AC13, AC19 e AC25, formaram um segundo grupo, apresentando fragmentos de 440 e 30 pb (Figura 19).

A digestão da região espaçadora 18S-28S com a endonuclease *Ava* II permitiu agrupar a linhagem produtora de aroma ATCC 46892 e os isolados obtido do mesmo substrato (beiju de mandioca) e local (Maranhão). Essas linhagens formaram um grupo distinto das linhagens de referência e dos demais isolados, apresentando fragmentos de 300, 150 e 90 pb (Figura 20, canaletas 4 e 8-13). As enzimas de restrição em estudo não mostraram polimorfismo no rDNA 28S entre as linhagens de *Neurospora*.

A Tabela XII apresenta a classificação polifásica das linhagens de *Neurospora* estudadas com base nos resultados das análises morfológicas e moleculares usados neste trabalho.



Figura 15. DNA genômico extraído a partir de massa celular de *Neurospora*. **1.** ATCC 46892 (70 ng/ μ L). **2.** λ de DNA (100 ng/ μ L).

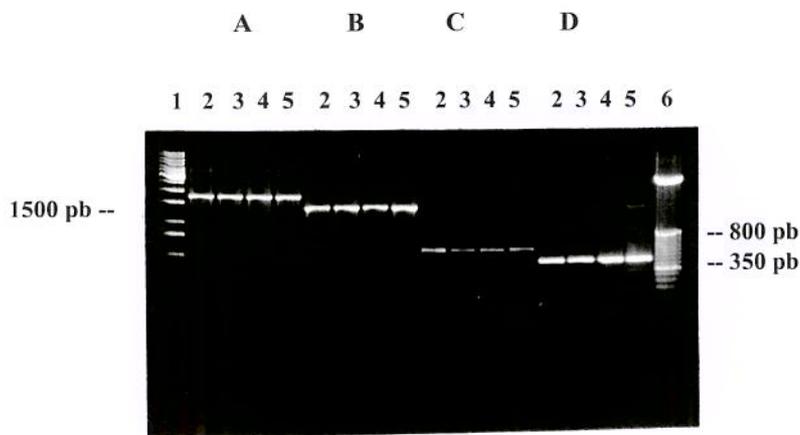


Figura 16. Amplificação de DNA de linhagens de *Neurospora* com os *primers* NS1 e NS8 (A2-A5, fragmento com 1800 pb), LR0 e LR7 (B2-B5 fragmento com 1300 pb), ITS1 e ITS4 (C2-C5, fragmento 540 pb) e H31-a e H31-b (D2-D5, fragmento 470 pb).

1. Padrão de Peso Molecular (100 pb)

2. *N. sitophila* NRRL 2884

3. *N. sitophila* ATCC 46892

4. *N. crassa* NRRL 2223

5. *N. tetrasperma* NRRL 2164

6. Padrão de Peso Molecular (50 pb)

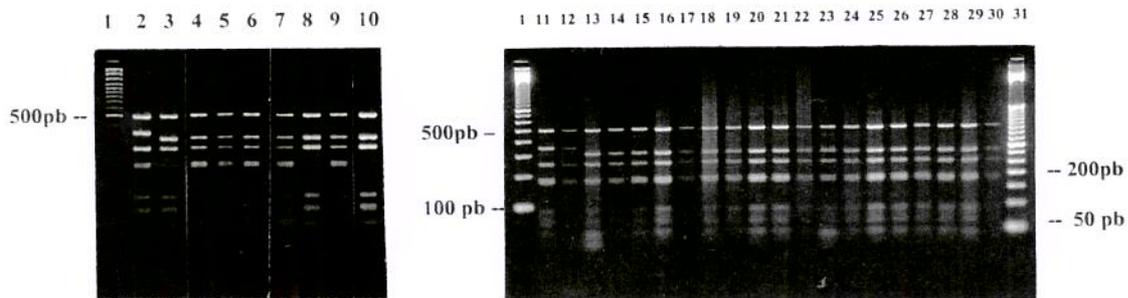


Figura 17. Perfil de RFLP do fragmento de rDNA 18S das linhagens de *Neurospora* amplificado com os *primers* NS1 e NS8 por PCR e digeridos com a enzima *Hae* III.

1. Padrão de Peso molecular (100 pb)	9. AC5	17. AC11	25. AC20
2. <i>N. sitophila</i> NRRL 2884	10. AC15	18. AC12	26. AC21
3. <i>N. tetrasperma</i> NRRL 2164	11. <i>N. sitophila</i> CCT 0045	19. AC13	27. AC22
4. <i>N. crassa</i> CCT 2680	12. <i>N. intermedia</i> NRRL 5506	20. AC14	28. AC23
5. <i>N. sitophila</i> ATCC 46892	13. <i>N. crassa</i> NRRL 2223	21. AC16	29. AC24
6. AC7	14. AC6	22. AC17	30. AC25
7. AC8	15. AC9	23. AC18	31. Padrão de P.M (50 pb)
8. AC4	16. AC10	24. AC19	

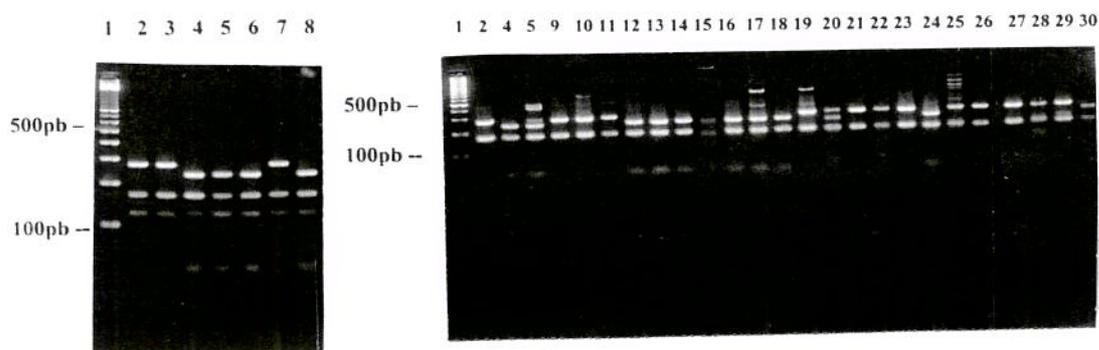


Figura 18. Perfil de RFLP do gene *his-3* da proteína histona das linhagens de *Neurospora* amplificado com os *primers* H31-a e H31-b por PCR e digeridos com a enzima *DdeI*.

1. Padrão de Peso molecular (100 pb)	9. AC4	17. AC12	25. AC20
2. <i>N. sitophila</i> NRRL 2884	10. AC5	18. AC13	26. AC21
3. <i>N. sitophila</i> CCT 0045	11. AC6	19. AC14	27. AC22
4. <i>N. sitophila</i> ATCC 46892	12. AC7	20. AC15	28. AC23
5. <i>N. crassa</i> NRRL 2223	13. AC8	21. AC16	29. AC24
6. <i>N. crassa</i> CCT 2680	14. AC9	22. AC17	30. AC25
7. <i>N. tetrasperma</i> NRRL 2164	15. AC10	23. AC18	
8. <i>N. intermedia</i> NRRL 5506	16. AC11	24. AC19	

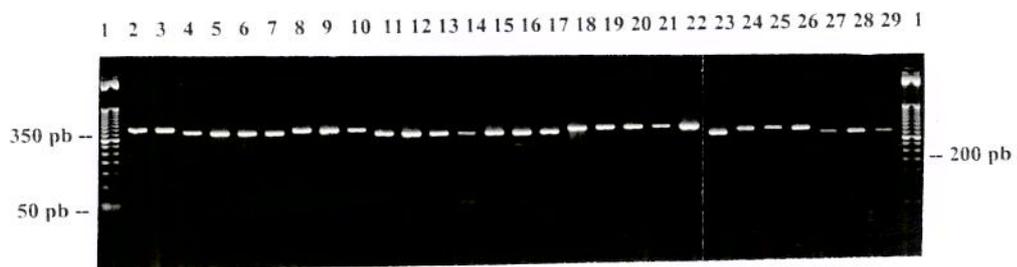


Figura 19. Perfil de RFLP do gene *his-3* da proteína histona das linhagens de *Neurospora* amplificado com os *primers* H31-a e H31-b por PCR e digeridos com a enzima *Hae* III.

1. Padrão de Peso molecular (50 pb)	9. AC5	17. AC13	25. AC21
2. <i>N. sitophila</i> NRRL 2884	10. AC6	18. AC14	26. AC22
3. <i>N. sitophila</i> CCT 0045	11. AC7	19. AC15	27. AC23
4. <i>N. sitophila</i> ATCC 46892	12. AC8	20. AC16	28. AC24
5. <i>N. crassa</i> NRRL 2223	13. AC9	21. AC17	29. AC25
6. <i>N. crassa</i> CCT 2680	14. AC10	22. AC18	
7. <i>N. tetrasperma</i> NRRL 2164	15. AC11	23. AC19	
8. AC4	16. AC12	24. AC20	

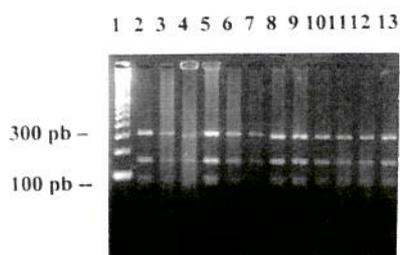


Figura 20. Perfil de RFLP da região espaçadora 18S-28S das linhagens de *Neurospora* amplificada com os *primers* ITS1 e ITS4 por PCR e digeridos com a enzima *AvaII*.

- | | |
|--------------------------------------|----------|
| 1. Padrão de Peso Molecular (100 pb) | 8. AC7 |
| 2. <i>N. sitophila</i> NRRL 2884 | 9. AC8 |
| 3. <i>N. sitophila</i> CCT 0045 | 10. AC9 |
| 4. <i>N. sitophila</i> ATCC 46892 | 11. AC12 |
| 5. <i>N. crassa</i> NRRL 2223 | 12. AC13 |
| 6. <i>N. crassa</i> CCT 2680 | 13. AC25 |
| 7. <i>N. tetrasperma</i> NRRL 2164 | |

Tabela XI. Análise de RFLP dos fragmentos rDNA 18S, histona-3, rDNA 18S-28S e rDNA 28S amplificados com os *primers* NS1 e NS8, H31-a e H31-b, ITS1 e ITS4, e LR0 e LR7 respectivamente.

Enz. de Restrição	Sítios de Restrição	Perfil de Restrição			
		rDNA 18S	Histona	ITS	rDNA 28S
<i>Alu</i> I	AG↓CT	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico
<i>Ava</i> II	C↓CCGGG	Monomórfico	Monomórfico	Polimórfico	Monomórfico
<i>Bam</i> H I	G↓GATCC	NC	NC	Monomórfico	Monomórfico
<i>Dde</i> I	C↓TNAG	Monomórfico	Polimórfico	Monomórfico	Monomórfico
<i>Dra</i> I	TTT↓AAA	Monomórfico	NC	Monomórfico	Monomórfico
<i>Hae</i> III	GG↓CC	Polimórfico	Polimórfico	Monomórfico	Monomórfico
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT	ND	NC	NC	Monomórfico
<i>Hinf</i> I	G↓ANTC	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico
<i>Msp</i> I	CC↓GG	NC	NC	Monomórfico	Monomórfico
<i>Pst</i> I	CTGCA↓G	ND	ND	NC	Monomórfico
<i>Pvu</i> II	CGAT↓CG	ND	ND	NC	Monomórfico
<i>Rsa</i> I	GT↓AC	Monomórfico	Monomórfico	NC	Monomórfico
<i>Sac</i> I	GAGCT↓C	ND	ND	NC	Monomórfico
<i>Sac</i> II	CCGC↓GG	ND	NC	Monomórfico	Monomórfico
<i>Sal</i> I	G↓TCGAC	ND	ND	NC	Monomórfico
<i>Sau</i> 3A I	↓GATC	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico
<i>Sma</i> I	CCC↓GGG	ND	NC	Monomórfico	Monomórfico
<i>Taq</i> I	T↓CGA	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico	Monomórfico

ND. Enzima não determinada para o fragmento.

NC. Fragmento não apresenta sítio de restrição para a enzima

Tabela XII. Classificação polifásica de *Neurospora* com base nos resultados dos métodos de caracterização incluindo morfologia, perfil de proteínas totais, e polimorfismo do rDNA 18S, região espaçadora 18S-28S e do gene histona-3.

Linhagens de <i>Neurospora</i>	Origem	Padrão de RFLP				Anal. de Prot. Total	Análise Morfológica
		rDNA 18S	gene histona		ITS1-ITS4		
		<i>Hae</i> III	<i>Dde</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Ava</i> II		
NRRL 2884	<i>N. sitophila</i>	A	A	A	A	I	ND
CCT 0045	<i>N. sitophila</i>	A	A	A	A	I	ND
AC10	DO/MA	B	B	B	A	I	<i>N. sitophila</i>
AC11	DO/MA	B	B	B	A	I	<i>N. sitophila</i>
AC18	VQ/SP	B	A	A	A	I	<i>N. sitophila</i>
AC21	VQ/SP	B	A	A	A	I	<i>N. sitophila</i>
AC24	DO/SP	B	A	B	A	I	<i>N. sitophila</i>
ATCC 46892	<i>N. sitophila</i>	B	B	B	D	IV	ND
AC7	BM/MA	B	B	B	D	IV	<i>N. sitophila</i>
AC8	BM/MA	B	B	B	D	IV	<i>N. sitophila</i>
AC12	BM/MA	B	B	B	D	IV	<i>N. sitophila</i>
AC13	BM/MA	B	B	B	D	IV	<i>N. sitophila</i>
AC25	BM/MA	B	B	B	D	IV	<i>N. sitophila</i>
AC9	BM/MA	B	B	B	D	IV	<i>N. crassa</i>
NRRL 2223	<i>N. crassa</i>	B	B	B	A	II	ND
CCT 2680	<i>N. crassa</i>	B	B	B	A	II	ND
AC6	VQ/SP	B	A	A	A	II	<i>N. crassa</i>
AC16	VQ/SP	B	A	A	A	II	<i>N. crassa</i>
AC17	VQ/SP	B	A	A	A	II	<i>N. crassa</i>
AC22	DO/SP	B	A	A	A	II	<i>N. crassa</i>
NRRL 2164	<i>N. tetrasperma</i>	C	A	A	A	III	ND
AC4	VQ/SP	C	A	A	A	III	<i>N. tetrasperma</i>
AC15	VQ/SP	C	E	A	A	V	<i>N. dodgei</i>
AC5	VQ/SP	B	A	A	A	V	<i>N. africana</i>
AC14	BM/SP	B	A	A	A	V	<i>N. lineolata</i>
AC19	VQ/SP	B	B	B	A	V	<i>N. galapagonensis</i>
AC20	VQ/SP	B	A	A	A	V	NI
AC23	SO/SP	B	A	B	A	V	NC

A, I = *N. sitophila*. B, II = *N. crassa*. C, III = *N. tetrasperma*. D, IV = *Neurospora* isolada de beiju de mandioca. E, V = outras. ND = não determinada, NI = Não identificada, NC = cruzamento infértil com linhagens de referência. DO = doação. VQ = vegetação queimada. BM = beiju de mandioca. SO = solo.

5.4 Análise Sensorial

Duplicatas do aroma produzidos por linhagens de *Neurospora* foram avaliadas por dez provadores, que compararam a amostra padrão (linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892) com vinte e duas amostras, em grupo de quatro, indicando o grau de diferença. Para tanto, foram aplicados valores de 0 a 9, com uma descrição aleatória da diferença percebida.

Os termos gerados individualmente pelos provadores para descrever as similaridades e diferenças de cada amostra foram listados na tabela XIII de acordo com a frequência. Posteriormente estes termos foram agrupados, originando os descritores listados na tabela XIV. A tabela XV apresenta a média de cada uma das 22 amostras analisadas. Os resultados discriminam as amostras em dois grupos: um primeiro grupo (AC8, AC9, AC12, AC13, AC22, AC25) composto por amostras que não apresentaram diferença significativa em nível de 5% com o padrão, pelo teste de Dunnet (representadas com um *) e um segundo grupo (demais isolados) composto pelas amostras significativamente diferentes do padrão em relação à produção de aroma de frutas (nível de 5%).

Tabela XIII. Termos descritivos desenvolvidos individualmente pelos provadores para caracterização das similaridades e diferenças entre as amostras de *Neurospora* e o padrão *N. sitophila* ATCC 46892.

Descrição do Aroma	N (número de vezes que cada termo foi citado)
Aroma adocicado	47
Aroma frutado	39
Aroma alcoólico	33
Aroma de terra	24
Aroma suave	22
Aroma mofento	14
Aroma agradável	12
Aroma ácido	10
Aroma fermentado	5
Aroma desagradável	5
Aroma de remédio	4
Aroma de cogumelo	3
Aroma de madeira	2

Tabela XIV. Termos descritivos gerados consensualmente a partir dos termos desenvolvidos individualmente pelos provadores

Amostras	Descrição	Amostras	Descrição
Padrão	Aroma frutado, adocicado, alcoólico, agradável	AC4	Aroma mofado, desagradável
AC8	Aroma frutado, + suave, + doce, - alcoólico	AC5	Aroma de terra (mofado), fermentado
AC13	Aroma frutado, + doce	AC16	Aroma de remédio, + suave, + doce, - alcoólico
AC22	Aroma frutado, + doce, - alcoólico	AC14	Aroma fermentado, - alcoólico, sem relação com o padrão
AC9	Aroma frutado, + doce, - alcoólico, + agradável	AC20	Aroma de terra
AC25	Aroma frutado, odor de cogumelo, terra, - alcoólico, + fraco	AC15	Aroma fermentado, não alcoólico, não adocicado
AC12	Aroma frutado, + doce, + agradável	AC18	Aroma de terra, + alcoólico, - doce
AC24	Aroma alcoólico, + doce, + agradável	AC17	Aroma de terra, alcoólico, - doce, sem relação com o padrão
AC11	Aroma mofado, de remédio, ácido, - doce	AC7	Aroma de cogumelo, adocicado, frutado, mas sem relação com o padrão
AC21	Aroma fermentado, - doce	AC19	Aroma de remédio, não alcoólico, não adocicado, extranho, sem relação com o padrão
AC6	Aroma de terra, - doce, - alcoólico	AC23	Aroma adocicado, não alcoólico, cogumelo, sem relação com o padrão, + agradável
AC10	Aroma frutado, + doce, - alcoólico		

Tabela XV. Média dos atributos sensoriais das linhagens de *Neurospora* conforme determinado por teste de Dunnet.

Amostras	*Médias	Amostras	*Médias
Padrão	1.62*	AC16	6.12
AC8	2.00*	AC14	6.25
AC13	2.12*	AC20	6.25
AC22	2.12*	AC5	6.37
AC9	3.00*	AC10	6.37
AC25	3.00*	AC18	6.37
AC12	3.50*	AC17	6.50
AC24	5.25	AC15	6.87
AC11	5.37	AC7	6.87
AC21	5.50	AC19	8.00
AC6	5.62	AC23	8.12
AC4	6.12		

* não apresentam diferença significativa em nível de 5% pelo teste de Dunnet.

6. Discussão

O objetivo deste estudo foi detectar marcadores moleculares para a diferenciação de linhagens de *Neurospora* associadas à produção de aroma de frutas, usando como referência a linhagem produtora de aroma *Neurospora sitophila* ATCC 46892, isolada do beiju de mandioca no Estado do Maranhão (Park *et al.*, 1982).

Um aspecto interessante no estudo de *Neurospora* spp. produtoras de aroma é a sua associação com o substrato beiju de mandioca utilizado na fabricação de “tiquira”, uma bebida indígena do Estado do Maranhão (Pinheiro, 1981). A caracterização da diversidade dos organismos encontrados em diferentes habitats e associados à produção de aroma é um primeiro passo para prospecção de novos organismos produtores de aroma para aplicação tecnológica.

Ferramentas moleculares, incluindo a análise de isoenzimas, polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP) do DNA mitocondrial e nuclear, amplificação de fragmentos específicos com o uso de oligonucleotídeos arbitrários por RAPD em PCR (reação de polimerização em cadeia) da região espaçadora intergênica (ITS) e das subunidades do rDNA, têm sido utilizadas para analisar variações inter- e infra-específicas em várias espécies de fungos (Bruns *et al.*, 1991).

No presente estudo, a caracterização das linhagens de *Neurospora* isoladas de beiju de mandioca e de vegetação queimada foi realizada empregando-se uma

abordagem polifásica, a qual incluiu a caracterização morfológica e métodos moleculares, como análises de proteínas totais e polimorfismo do rDNA 18S, rDNA 28S, região espaçadora 18S-28S e do gene da proteína histona H3-1.

A seleção do fungo foi feita a partir de substratos em que apresentava crescimento visível, empregando-se um método de isolamento direto e meios diferenciados para facilitar a obtenção de colônias puras. As espécies heterotáticas de *Neurospora* produzem grande quantidade de conídios de coloração laranja, pelos quais o fungo pode ser facilmente reconhecido na natureza.

O isolamento e seleção das culturas de *Neurospora* foram realizadas com sucesso a partir de vegetação, após aproximadamente duas semanas da queimada. Pandit e Maheshwari (1996) observaram a presença de *Neurospora* em cana-de-açúcar após a queimada durante três anos, e perceberam que após duas semanas o fungo já se apresentava visivelmente numa coloração laranja nos nódulos da planta, e somente após três meses pôde-se verificar a ocorrência da reprodução sexual na natureza pela presença de peritécios na epiderme de cana-de-açúcar queimada. O significado destes fatores no contexto do crescimento de *Neurospora* em condições de campo ainda não foi esclarecido.

A seleção do microrganismo a partir de beiju de mandioca usado na fabricação de “tiquira” também foi realizada com sucesso entre o terceiro e quinto dia de incubação do beiju, coletado nos meses de junho e julho, período de temperatura mais amenas na região (20 a 25 ° C). Pôde-se verificar com mais frequência nesse período a presença de *Neurospora* pelo micélio de coloração laranja no substrato (Costa, 1994). Nesse período, observa-se também o crescimento lento de outros fungos. Porém, após o

quinto dia há uma grande proliferação de outros fungos inibindo o crescimento de *Neurospora*.

Shambuyi *et al.* (1992) testaram alguns substratos para o estudo do crescimento das espécies *Neurospora intermedia* e *Rhizopus microsporus*. O desenvolvimento micelial, bem como a formação de esporos e conídios por *N. intermedia* foram melhor observados nos substratos mandioca e arroz que em amendoim e soja. O meio de cultura mais apropriado para o crescimento do microrganismo no presente estudo foi Agar Milho (CMA) (DIFCO), que promoveu o crescimento pouco espalhado, e favoreceu o ciclo sexual. Alguns meios de cultivo desenvolvidos para este fim também foram testados, tais como o Dicloran-Glycerol (Hocking & Pitt, 1980) e o meio sintético para cruzamento SC (Westegaard & Mitchell, 1947).

Informações associadas ao ciclo sexual são apropriadas para caracterizar morfologicamente uma espécie de *Neurospora*. Homotalismo vs. Heterotalismo, 4 vs. 8 ascósporos, tamanho e formato dos peritécios, ascósporos e conídios, presença de poros germinativos e estrias são características morfológicas comumente utilizadas na identificação de espécies deste microrganismo. Espécies de *Neurospora* não podem ser diferenciadas pela aparência vegetativa. Taxa de crescimento, coloração e textura superficial da colônia, mudança de coloração do meio, odores existentes e características das hifas são de pequeno valor para sua classificação, porém são fatores que ajudam no processo de identificação morfológica em nível de espécie (Perkins *et al.*, 1976).

Os resultados obtidos na análise das características morfológicas sugerem que os isolados de *Neurospora* estudados podem ser enquadrados em 7 espécies diferentes,

prevalecendo a espécie heterotática *Neurospora sitophila*. Os isolados do Estado de São Paulo apresentaram uma maior diversidade de espécies, enquanto a maioria das linhagens obtidas do Estado Maranhão foram identificadas como *N. sitophila*, com exceção de AC9, identificada como *N. crassa*. A linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892 isolada do beiju de mandioca no Estado do Maranhão foi identificada como *N. sitophila* por Turner (1995).

Perkins e Turner (1988) realizaram estudos com um número diferente de marcadores genéticos em *Neurospora* coletadas da natureza. Estes dados revelaram um alto grau de variabilidade nas populações naturais, prevalecendo linhagens heterotáticas, também observado por Pandit e Maheshwari (1996) e por Perkins *et al.* (1976). Das 22 linhagens isoladas neste estudo 6 foram consideradas homotáticas, sendo que para uma delas (AC20) não foi possível a identificação em nível de espécie, pois apresentou características morfológicas diferentes das espécies descritas na literatura. As características dessa linhagem foram similares às da espécie homotática *N. pannonica* Krug & Khan (1991) que produz peritécios de 360-500X450-700µm em diâmetro, ascósporos com estrias pouco evidentes e dois poros germinativos. Porém, seus ascósporos são maiores em largura (24-30µm) que aqueles produzidos pela linhagem de *Neurospora* AC20 (2 µm) (Figura10).

O gênero *Neurospora* foi estabelecido por Shear e Dodge em 1927 incluindo quatro espécies. Posteriormente, doze espécies de *Neurospora* foram reconhecidas e incluídas numa chave de identificação proposta por Frederick *et al.* em 1969, a qual ainda é utilizada na identificação morfológica desses organismos. Perkins e Turner (1988) reconheceram apenas 10 espécies de *Neurospora* e Glass *et al.* (1990) baseados em dados

de hibridização molecular, sugeriram que várias das espécies homotáticas identificadas até o momento possivelmente eram semelhantes. Mais recentemente, duas novas espécies foram descritas, *N. pannonica* (Krug & Khan, 1991) e *N. celeata* (Turner & Fairfield, 1997).

A identificação das espécies heterotáticas foi baseada na fertilidade após o cruzamento com linhagens de referência. Para tanto, foi utilizado o método desenvolvido por Pandit e Russo (1996) que utiliza como fonte de carbono papel de filtro e o meio SC para o desenvolvimento dos corpos de frutificação. Este método é simples e eficaz, e favoreceu a produção de grande quantidade de peritécios após 10-12 dias de incubação das linhagens de referência *N. sitophila* NRRL 2884 com os isolados AC7, AC8, AC10, AC11, AC12, AC13, AC18, AC21, AC24 e AC25 e *N. crassa* NRRL 2223 com os isolados AC6, AC9, AC16, AC17 e AC22.

A linhagem AC23 foi considerada heterotática, mas apresentou-se infértil nos testes de cruzamento com as linhagens de referência *N. sitophila* NRRL 2884 e *N. crassa* NRRL 2223 utilizadas. A espécie heterotática *N. intermedia* não foi utilizada neste estudo como referência. As espécies *N. tetrasperma*, *N. sitophila* e *N. crassa* são claramente distintas umas das outras mas, a combinação entre elas pode até gerar o início do desenvolvimento do peritécio (Perkins, 1994). Entretanto, a relação entre *N. intermedia*, *N. sitophila* e *N. crassa* não é bem esclarecida, e requer o emprego de várias linhagens de referência e cruzamentos recíprocos para uma classificação segura (Turner & Fairfield, 1997).

A análise do perfil de proteínas totais permite a comparação de

microrganismos para fins de identificação e estudos epidemiológicos. Esta técnica pode ser aplicada na identificação de microrganismos em nível de espécie e, particularmente, a comparação entre microrganismos da mesma espécie (Fantinatti *et al.*, 1994). A diversidade e o número de proteínas produzidas tem amplo alcance para o desenvolvimento de esquemas de identificação e tipagem baseados em análises comparativas de perfis de proteínas e polipeptídeos (Towner & Cockayne, 1993). A análise do perfil de proteínas totais tem sido aplicada com sucesso na identificação de bactérias em nível de espécie, e particularmente, para subtipagem dentro da espécie (Kodjo *et al.*, 1993; Samelis *et al.*, 1994; Vandamme *et al.*, 1996, Lyra *et al.*, 1997). Apesar de não ser usada tão extensivamente como em bactérias, a análise de proteínas também tem sido aplicada na diferenciação e tipagem de fungos (Burnier *et al.*, 1989; Towner e Cockayne, 1993; Rath *et al.*, 1999).

A extração eficiente de proteínas a partir de fungos é dificultada pela existência de alta atividade de protease endôgena, assim como a presença da parede celular mais resistente no micélio de fungos. No presente estudo foi utilizado com sucesso, o método testado por Oshero e Gregory (1997), com o emprêgo do tampão uréia 9M, que em comparação com outros seis protocolos de extração, mostrou maior eficiência para lise de *Aspergillus nidulans*.

A análise visual do perfil de subunidades protéicas das linhagens de *Neurospora* obtidos de células inteiras mostraram concordância com as análises morfológicas. Como pode ser observado na tabela XII. As linhagens *N. sitophila* NRRL 2884, CCT 0045 e os isolados de *Neurospora* sp. AC10, AC11, AC18, AC21 e AC24

foram agrupadas devido às semelhanças nos perfis de proteínas totais. Perfis semelhantes foram encontrados entre as linhagens *N. crassa* NRRL 2223, CCT 2680 e os isolados de *Neurospora* sp. AC6, AC16, AC17 e AC22, e também entre as linhagens *N. tetrasperma* e AC4. E as linhagens AC5, AC14, AC15, AC19, AC20 e AC23 apresentaram perfis diferentes das linhagens de referência.

Entretanto, os resultados obtidos pela análise do perfil de proteínas totais demonstraram que a linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892 e os isolados do mesmo local (Maranhão) e substrato (beiju de mandioca) formaram um grupo distinto dos demais isolados e das linhagens de referência usadas em estudo, inclusive da espécie *N. sitophila* (Tabela XII). Resultados semelhantes foram observados no polimorfismo da região espaçadora ITS, digerida com a enzima de restrição *Ava* II (Figura 20). Proteínas exercem uma série de funções metabólicas e estruturais nos eucariotos. A separação entre organismos produtores de aroma e não-produtores de aroma pode estar relacionada a enzimas e vias metabólicas presentes apenas no primeiro grupo. Estes tipos de compostos voláteis produzidos pelos microrganismos diferem não apenas entre espécies, mais também em muitos casos, entre linhagens da mesma espécie (Tortora *et al*, 1997). Estudos bioquímicos destas linhagens podem ajudar a elucidar esta questão.

Recentemente, a amplificação de ácidos nucleicos pelo processo de PCR revolucionou muitos procedimentos na biologia molecular, incluindo os métodos relacionados à identificação e tipagem de microrganismos. Na extração de DNA genômico das linhagens de *Neurospora* foram testados materiais como massa celular após o crescimento do fungo em meio líquido, e micélios do fungo, visando a simplicidade e

agilidade nesta etapa. Porém, a partir do micélio não foram obtidos bons resultados. A maioria dos protocolos específicos para *Neurospora* utilizam material liofilizado (Sokolovsky *et al.*, 1997; Cambareri & Kinsey, 1996; Irelan *et al.*, 1996) que torna o método mais caro e trabalhoso. Neste trabalho foi adotado o protocolo de Pitcher *et al.* (1989) com pequenas adaptações para fungos, como a quebra mecânica utilizada devido a grande resistência da parede celular desses organismos. Esse protocolo é simples, rápido e possibilitou a extração do DNA a partir da biomassa, com produção de 70 a 100 ng/ μ L, quantidade suficiente para dar sequência às análises de PCR. Apesar do DNA genômico extraído apresentar degradação parcial (Figura 15), esta não foi prejudicial para o andamento do trabalho. Möller *et al.* (1992) isolaram DNA de fungos que resultou no rendimento de 100 ng/ μ L a partir de 30-60 mg de material liofilizado, apresentando DNA um pouco degradado. Esse material porém foi utilizado com sucesso para análises de PCR.

A amplificação de ácidos nucleicos ribossomais de regiões espaçadoras, e subunidades do rDNA permite a comparação e diferenciação infra-específica de muitas linhagens de fungos em um único experimento (White *et al.*, 1990). Os 29 isolados de *Neurospora* e linhagens de referência descritos aqui foram examinados com 4 pares de *primers*. Para cada par de *primers* não houve diferenciação nos tamanhos dos produtos amplificados (Figura 16). Os resultados mostraram que a variação no tamanho do produto de PCR amplificado com estes *primers* não vem a ser um bom parâmetro para a diferenciação entre espécies de *Neurospora*.

Variação no tamanho de produtos amplificados tem sido apontado como um bom marcador molecular para muitas espécies de fungos (Pechia *et al.*, 1998; Fouly *et al.*,

1997; Jiang & Hiruki, 1996) e para nível acima, tais como gênero (Borazjani *et al.*, 1998; Castle *et al.*, 1998). Fouly *et al.* (1997) usaram os oligonucleotídeos NS1/NS2, NS3/NS6 e NS7/NS8 para amplificar o rDNA 18S de 36 linhagens de *Gaeumannomyces*, gênero de importância agrícola. Não foi observada variação no tamanho do fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos NS1/NS2 e NS7/NS8 para os isolados, que apresentaram 510 e 400 pb, respectivamente. Entretanto, a amplificação do fragmento com o par de *primers* NS3/NS6 resultou em produtos de tamanhos diferentes em nível de espécie.

O polimorfismo do rDNA 18S e das regiões espaçadoras ITS e IGS tem sido muito utilizado na identificação de vários fungos, principalmente alguns grupos de importância clínica e agrícola (Makimura, 1999; Fouly *et al.*, 1997). As análises de polimorfismo do rDNA 18S, assim como do rDNA 28S, é um método relativamente simples para utilização em estudos de diversidade, mas os resultados dependem do grupo de organismos estudados, sendo mais adequado para estudos de microrganismos em nível de espécie e acima. Entretanto, as regiões espaçadoras ITS e IGS são menos conservadas e, portanto, mais adequadas para estudos em nível de espécie e infra-específicos. Esta variação da técnica de PCR consiste na digestão dos fragmentos amplificados para PCR com enzimas de restrição, resultando em um padrão específico de bandas para as linhagens estudadas. Nós observamos que a região rDNA 28S (LROR–LR7) e a região espaçadora ITS (ITS1-ITS4) foram altamente conservadas entre as espécies de *Neurospora*. Entretanto, a região rDNA 18S e do gene da proteína histona H3-1 foram mais variáveis.

No presente estudo, os produtos amplificados do rDNA 18S (NS1-NS8), rDNA 28S (LROR-LR7), rDNA 18S-28S (ITS1-ITS4) e o gene histona H3-1 (H31a-H31b)

de linhagens de *Neurospora* isoladas de beiju e vegetação queimada, foram clivados com as enzimas de restrição *Alu* I, *Ava* II, *Bam*H I, *Dde* I, *Dra* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Sau*3A I e *Taq* I. A enzima *Hae* III (Figura 17, canaletas 2, 3, 4, 5, 11, 12 e 13) resultou em alto polimorfismo do fragmento rDNA 18S entre as 3 linhagens de referências estudadas. Entretanto, a maioria das outras linhagens isoladas de beiju de mandioca e vegetação queimada, apresentaram padrão de restrição comum a *N. crassa* NRRL 2223, CCT 2680, resultados que mostraram discordância com as análises morfológicas e com os perfis de proteínas totais, onde foi observada maior diversidade. Estes resultados podem ser explicados pelo alto grau de conservação dos genes ribossomais em microrganismos. Já o padrão de digestão das linhagens AC4 com a enzima *Hae* III foi idêntico ao da linhagem referência *N. tetrasperma* NRRL 2164 (Figura 17, canaletas 8 e 3), neste caso mostrando concordância com as análises morfológicas e análises de proteínas totais.

Baseado em características morfológicas, a linhagem produtora de aroma ATCC 46892 foi identificada como sendo da espécie *N. sitophila* (Turner, 1995). Porém, em nossos estudos a linhagem apresentou padrão de restrição comum a *N. crassa* NRRL 2223 e CCT 2680, quando os produtos rDNA 18S e o gene H3-1 foram digeridos com *Hae* III e *Dde* I respectivamente (Figura 17, canaletas 13, 4 e 5; Figura 18, canaletas 4, 5 e 6). Em adição, a região amplificada ITS, quando digerida com *Ava* II, permitiu separar a linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892 e os isolados do mesmo substrato e local como um grupo diferente das espécies *N. crassa*, *N. sitophila* e dos demais isolados (Figura 20). Esta correlação tem sido previamente mostrada por análise cromatográfica (Pastore *et al.*, 1994). Neste trabalho similar resultado foi encontrado na análise de

proteínas totais.

Em estudos de genética e variabilidade dentre os fungos tem sido comum o uso de oligonucleotídeos específicos para a região espaçadora ITS do DNA nuclear ribossomal, o qual apresenta um papel valioso na identificação de espécies de fungos (Anderson *et al.*, 1998). Entretanto, nossos resultados indicaram que RFLP do DNA genômico da região ITS (ITS1 – ITS4) apresenta pouca variabilidade entre as espécies de *Neurospora*. Nenhuma das onze enzimas de restrição utilizadas no trabalho evidenciou diferenças no padrão de bandas entre as linhagens de referência analisadas. Apenas uma enzima (*Ava* II) diferenciou a linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892. Alguns pesquisadores tem aplicado uma combinação de duas ou mais enzimas para a obtenção de melhores resultados. Montrocher *et al.* (1998) usaram 10 enzimas de restrição no estudo de linhagens de leveduras na digestão do fragmento amplificado da região ITS. Nenhum polimorfismo foi revelado entre as 49 linhagens. Porém, após a combinação dessas enzimas, 18 diferentes tipos ITS-RFLP foram distinguidos e várias linhagens diferentes foram identificadas.

O padrão de restrição do gene da proteína histona H3-1, gerado por *Dde* I e *Hae* III, permitiu diferenciar as linhagens *N. sitophila* NRRL 2884, CCT 0045 e *N. crassa* NRRL 2223, CCT 2680 (Figuras 18 e 19). A digestão com a enzima *Hae* III dividiu os 22 isolados em 2 grupos, que coincidem com as duas espécies mais conhecidas do gênero *Neurospora* (*N. sitophila* e *N. crassa*).

Neste estudo, foi testada a linhagem *N. intermedia* NRRL 5506, a qual foi previamente reclassificada como da espécie *N. sitophila*, pela coleção de cultura ATCC

(ATCC 56753). A digestão dos fragmentos 18S (Figura 17) e H3-1 (Figura 18) com as enzimas *Hae* III e *Dde* I respectivamente confirmaram este resultado, assim como a análise de proteínas totais (Figura 12 e 13).

O método sensorial aplicado para verificar o aroma das linhagens de *Neurospora* foi o Método de Diferença, utilizando-se o Teste de Comparação Múltipla. O propósito dos métodos de diferença é medir efeitos específicos pela simples discriminação, indicando se as amostras são iguais ou diferentes. São objetivos e seus dados podem ser analisados estatisticamente (Moraes, 1985). Uma comparação múltipla foi feita para determinar se as amostras inoculadas com linhagens de *Neurospora* isoladas de beiju de mandioca e vegetação queimada são iguais ou diferentes de amostra inoculada com a linhagem de *N. sitophila* ATCC 46892 quanto à produção de aroma. Além desses critérios, também foi utilizado no estudo a terminologia descritiva que têm a finalidade primordial de caracterizar e quantificar os atributos sensoriais de um produto, ou caracterizar as similaridades e diferenças entre vários produtos de uma mesma categoria, normalmente utilizando uma equipe de provadores treinados. A equipe avalia as amostras e identifica os termos descritores (ou atributos) que evidenciam as similaridades e diferenças sensoriais entre os produtos (Behrens, 1998).

Pelos resultados da análise descritiva a amostra inoculada com a linhagem de *Neurospora* produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892 apresentou como nota mais marcante dos descritores o aroma “frutado, adocicado e alcóólico” como mostra a tabela XIV. A repetibilidade desses descritores pôde ser percebida para as amostras inoculadas com linhagens provenientes do mesmo substrato (beiju de mandioca) tais como AC8, AC9,

AC12, AC13 e AC25, com exceção da amostra AC7, que foi caracterizada pelos provadores como “sem relação com o padrão”. A amostra AC22, de fonte não conhecida, também foi avaliada com o aroma característico do padrão porém, nas análises de proteína total e RFLP esta linhagem apresentou perfil diferente desse grupo. Em relação às demais amostras, verifica-se que o termo descritivo mais atribuído foi “aroma de terra”. A análise descritiva aqui aplicada foi baseada na percepção de um grupo de indivíduos não-treinados, mas forneceu informações qualitativas interessantes em relação ao aroma percebido nas amostras de *Neurospora*.

Os dados da análise sensorial podem ser analisados por diferentes testes estatísticos. A escolha depende da finalidade do estudo. Para comparação das amostras com um controle (padrão), o teste de Dunnet, desenvolvido em 1964, é o procedimento mais utilizado, o qual é aplicado após verificar na análise de variância se o “F” é significativo em nível de 5% (Montgomery, 1991).

A análise de variância revelou que ocorreu diferença significativa em nível de 5% entre as amostras testadas e o padrão. Foi considerado como causa de variação apenas as amostras. Pelos resultados, verifica-se que, com exceção de AC7, as amostras inoculadas com as linhagens provenientes de beiju de mandioca do Estado do Maranhão e a amostra inoculada com a linhagem produtora de aroma (padrão) não apresentam diferença significativa em nível de 5%, sendo que a amostra AC8 apresentou a menor média, o que significa que obteve maior similaridade com o aroma do padrão (Tabela XV). Entretanto, a amostra AC22, proveniente do Estado de São Paulo e de fonte (substrato) desconhecida também apresenta similaridade com o padrão. As demais amostras apresentaram diferença

significativa com o padrão. Dentre essas, as amostras AC7, AC10 e AC11 são linhagens de *Neurospora* provenientes do Estado do Maranhão, e as demais são provenientes do Estado de São Paulo. Apesar das médias dessas amostras serem mais distantes do padrão, conferindo suas diferenças, para algumas amostras, tais como AC23 e AC24, os provadores caracterizaram o aroma como “agradável” ou até “mais agradável” que o padrão. Esses resultados sugerem que a análise cromatográfica desses voláteis pode ser interessante para definir novos aromas produzidos por esses microrganismos.

Em geral, a análise do perfil de proteínas totais foi usada com maior sucesso neste estudo para a caracterização de 22 linhagens de *Neurospora* oriundas de beiju de mandioca e vegetação queimada nos Estados do Maranhão e São Paulo. A alta similaridade dos perfis das linhagens isoladas do beiju de mandioca com o da linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892 confirma a relação filogenética estreita destas linhagens (Pastore *et al.*, 1994). Uma boa correlação foi encontrada entre os resultados da análise fenotípica. A metodologia de SDS-PAGE de proteínas pode ser empregada para caracterização/identificação de espécie que pertence a este grupo e na caracterização de linhagens de *Neurospora* associadas à produção de aromas.

7. Conclusões

A partir da análise dos resultados obtidos na caracterização de linhagens de *Neurospora* spp. isoladas de beiju de mandioca, vegetação queimada e linhagens de referência de *Neurospora* através de métodos tradicionais e moleculares, foi possível concluir que:

1. Análises fenotípicas, principalmente características morfológicas da fase sexual, revelaram um maior número de espécies de *Neurospora* isoladas do Estado de São Paulo que aquelas isoladas do Estado do Maranhão.
2. Análises de proteínas totais foram mais informativas na caracterização das linhagens de *Neurospora* produtoras de aroma, permitindo a identificação destes microrganismos em nível infra-específico.
3. Análises moleculares de ácidos nucleicos, incluindo perfil de proteínas totais e polimorfismo da região espaçadora 18S-28S com a enzima *Ava* II, indicaram que as linhagens isoladas do substrato beiju de mandioca e a linhagem *N. sitophila* ATCC 46892 produtora de aroma, são muito semelhantes, podendo fazer parte de um grupo distinto das demais linhagens de *Neurospora*.
4. Análises de polimorfismo do rDNA 18S e do gene histona his-3 sugerem que a linhagem ATCC 46892 *N. sitophila* produtora de aroma deve ser reclassificada como *N. crassa*.
5. Em análises de polimorfismo, o gene rDNA 28S revelou-se altamente conservado e não

- permitiu a diferenciação entre as linhagens de *Neurospora* da espécie *N. sitophila*, *N. crassa* e *N. tetrasperma* com as enzimas testadas.
6. Análises moleculares de ácidos nucleicos, incluindo RFLP e perfil de proteínas totais comprovaram a reclassificação da linhagem *N. intermedia* NRRL5506 como sendo da espécie *N. sitophila*.
 7. Em análises fenotípicas e genotípicas as linhagens AC10, AC11, AC18, AC21 e AC24 apresentaram características muito semelhantes às linhagens de referência *N. sitophila* NRRL 2884 e CCT 0045 podendo, por alguns métodos de caracterização, serem consideradas da mesma espécie. O mesmo ocorreu entre as linhagens AC6, AC16, AC17, AC22 e as linhagens referência *N. crassa* NRRL 2223 e CCT 2680; e entre AC4 e *N. tetrasperma* NRRL 2164.
 8. Análises sensoriais pelo teste de comparação múltipla indicaram que as linhagens de *Neurospora* isoladas do substrato beiju de mandioca, com exceção da linhagem AC7, apresentaram características aromáticas muito semelhantes à da linhagem produtora de aroma *N. sitophila* ATCC 46892.
 9. A seleção de linhagens de *Neurospora* a partir de vegetação queimada revelou ser uma técnica fácil, rápida e de baixo custo, onde a coleta requereu pouco material e experiência, e a cultura isolada foi na maioria dos casos, pura.
 10. Os resultados obtidos reforçam o uso de métodos moleculares e taxonomia polifásica na caracterização de microrganismos associados à produção de aroma, podendo auxiliar na escolha de linhagens para futuros estudos envolvendo a produção e aplicação tecnológica.

8. Referências Bibliográficas

- ACREE, T. E.; BARNARD, J.; CUMINGHAM, D. G. The analysis of odor-active volatiles in gas chromatographic effluents. In: SCHREIER, P. **Analysis of volatiles methods and applications**: proceeding International Workshop. Berlin: De Gruyter. 1984. 469p.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; ALEXOPOULOS, C. J. **Introductory Mycology**. 4.ed. John Wiley & Sons, 1996. 880p.
- ANDERSON, I.; CHAMBERS, S. M.; CAIRNEY, J. W. G. Molecular determination of genetic variation in *Pisolithus* isolates from a defined region in New South Wales, Australia. **New Phytology**, v.138, p.151-162, 1998.
- APPLIED MATHS. **Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns**. Version 4.1. Kortrijk, Belgium. 1998.
- ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). **Guidelines for the selection and training of sensory panel members**. ASTM, (STM-758). 1981
- BASTOS, D. H. M. **Compostos voláteis de méis de eucalipto e laranja**. Campinas, 1996. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- BEADLE, G. W.; TATUM, E. L. *Neurospora*. II. Methods of producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. **American Journal of Botany**, v.32, p.678-686, 1945.

- BEHRENS, J. H. **Avaliação do perfil sensorial e aceitação de vinhos brancos varietais riesling, gewürztraminer e chardonnay produzidos no Brasil.** Campinas, 1998. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- BERBEE, M. L.; TAYLOR, J. W. From 18S ribosomal sequence data to evolution of morphology among the fungi. **Canadian Journal Botanic**, v.73(suppl.1), p.S677-S683, 1995.
- BLUM, H. C. BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.
- BOBOYE B. E.; ADETUYI, F. C. Fungal population association with raw materials and intermediate products of lager beer produced from Nigeria sorghum grains. **Journal Food Science Technology**, v.31, n.2, p.148-150, 1994.
- BORAZJANI, R. N.; LOTT, T. J.; AHEARN, D. G. Comparison of 5.8S and ITS2 rDNA RFLP patterns among isolates of *Acremonium obclavatum*, *A. Kiliense*, and *A. strictum*. **Current Microbiology**, v.36, p.70-74, 1998.
- BÖRJESON, T.; STÖLLMAN, U.; SCHNÜRER, J. Volatiles metabolites produced by six fungal species compared with other indicator of fungal growth on cereal grains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2599-2605, 1992.
- BRAMORSKI, A.; SOCCOL, C. R.; CHRISTEN, P.; REVAH, S. Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes. **Revista de Microbiologia**, v.28, p.208-212, 1998.
- BRUNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal molecular systematics. **Annual**

- Review Ecology Systematic**, v.22, p.525-564, 1991.
- BURNIER, J. P.; MATHEWS, R. C.; CLARCK, I.; MILNE, L. J. R. Immunoblot fingerprinting *Aspergillus fumigatus*. **Journal Immunology Methods**, v.118, p.178-186, 1989.
- CAMBARERI, E. B.; KINSEY, J. A. **An ultra-fast method of DNA extraction from *Neurospora***. Disponível na Internet: <http://www.kumc.edu/research/fgsc/fgn/camb.html>. 28 set. 1996.
- CARLIE, M. J.; WATKINSON, S. C., **The Fungi**. 3.ed. Academic Press, 1996. Cap.5: Classification, phylogeny and evolutionary trends, p.235-241.
- CASTLE, A.; SPERANZINI, D.; RGHEI, N.; ALM, G.; RINKER, D.; BISSET, J. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.1, p.133-137, 1998.
- CHILLALI, M.; IDDER, H.; GUILLAUMIN, J. J.; LUNG, B.; BOTTON, B. Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the biological species of European *Armillaria*. **Mycological Research**, v.102, n.5, p.533-540, 1998.
- CHRISTEN, P.; RAIMBAULT, M. Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. **Biotechnology Letters**, v.13, n.7, p.521-529, 1991.
- Christen, P.; Villegas, E.; Revah, S. Growth and aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in various fermentation media. **Biotechnology Letters**, v.16, n.11, p.1183-1188, 1994.
- CORMIER, F.; RAYMOND, Y.; CHAMPAGNE, C. P.; MORIN, A. Analysis of odor-

- active volatiles from *Pseudomonas fragi* grown in milk. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.39, p.159-161, 1991.
- COSTA, A. S. **Contribuição para o estudo de linhagem de *Neurospora* sp. produtora de aroma**. Campinas, 1994. 66p. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- COSTA, S. O. P. Genética molecular e de microrganismos – Os fundamentos da engenharia genética. São Paulo: Editora Manole. 1987. 559p.
- DAVIS, R. H.; DE SERRES, F. J. Genetic and Microbiological Research Techniques for *Neurospora crassa*. **Methods Enzymology**, v.17, p.79-143, 1970.
- DENNIS, R. W. G. Fungi Venezuelani. **Kell Bulletin**, v.14, p.418-458, 1960.
- DONALDSON, G. C.; BALL, L. A.; AXELROOD, P. E.; GLASS, N. L. Primer sets developed to amplify conserved genes from filamentous *Ascomycetes* are useful in differentiating *Fusarium* species associated with conifers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.4, p.1331-1340, 1995.
- DUTTA, S. K. DNA homologies among heterothallic species of *Neurospora*. **Mycologia**, v.68, p.388-401, 1976.
- DZIEZAK, J. D. Biotechnology and flavor development: an industrial research perspective. **Food Technology**, v.40, n.4, p.105, 1986.
- EBBOLE, D.; SACHS, M. S. **A rapid and simple method for isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidia**. Disponível na Internet:
<http://www/fgsc.net/fgn37/ebbole1.html>. 7 maio 1996.
- ELLIOT, C. G. **Reproduction in fungi**. Chapman & Hall, 1994. Cap.2: Genetic systems of

filamentous Ascomycetes, p.5-36..

ERIKSSON, C. E.; KAMINSKI, E.; ADAMEK, P.; BÖRJESSON, T. Volatile compounds and off-flavour produced by microorganisms in cereals. In: CHARALAMBOUS, G. (Ed.) **Off-flavours in food and Beverages**. Elsevier Science Publishers, 1992. p.37-56.

ERIKSSON, O. E. DNA and ascomycetes systematics. **Canadian Journal Botanic**, v.73(suppl), p.S784-S789, 1995.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.329-337, 1999.

FABRE, C.E.; BLANC, P.J.; GOMA, G. Production of benzaldehyde by several strains of *Ischnoderma benzoinum*. **Sciences des Aliments**, v.16, p.61-68, 1996.

FANTINATTI, F. **Diversidade de Pseudomonas spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de culturas agrícolas**. Campinas, 1997. 104p. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

FANTINATTI, F; SILVEIRA, W. D.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemic *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology**, v.41, p.75-86, 1994.

FOSTER, L. M.; KOZAK, R.; LOFTUS, M. G.; STEVENS, J. J.; ROSS, I. K. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. **Mycological Research**, v.97, p.769-781, 1993.

FOULY, H.; WILKINSON, H. T.; CHEN, W. Restriction analysis of internal transcribed

- spacers and the small subunit gene of ribosomal DNA among four *Gaeumannomyces* species. **Mycologia**, v.89, n.4, p.590-597, 1997.
- FREDERICK, L.; UECKER, F. A.; BENJAMIN, C. R. A new of *Neurospora* from soil of west Pakistan. **Mycologia**, v.61, p.1077-1084, 1969.
- GARCÍA, A. I.; GARCÍA, L. A.; DÍAZ, M. Prediction of ester production in industrial beer fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, v.16, p.66-71, 1994.
- GARGAS, A.; DEPRIEST, P. T. A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing Ssu rDNA. **Mycologia**, v.88, n.5, p.745-748, 1996.
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genus from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1323-1330, 1995.
- GLASS, N. L.; METZENBERG, R. L.; RAJU, N. B. Homothalic Sordariaceae from nature: The absence of strains containing only the a mating-type sequence. **Experimental Mycologia**, v.14, p.274-286, 1990.
- GOCHENAUR, S. E.; BACKUS M. P. A new of *Neurospora* from Wisconsin Lowland soil. **Mycologia**, v.54, p.555-562, 1962.
- GOMPERTZ, O. F.; CEBALLOS, B. S. O.; CORNEJO, L. C. Z. Biologia dos Fungos. In: TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 1991. Cap.4, p.240-251.
- HÄUSLER, A.; MÜNCH, T. Microbial production of natural flavors. **ASM News**, v.63, n.10, p.551-559, 1997.
- HAWKSWORTH, D. L. **Ascomycete Systematics: problems and perspectives in the nineties**. New York: Plenum Press, 1994.

- HERRERO, M. L.; KLEMSDAL, S. S. Identification of *Pythium aphanidermatum* using RAPD technique. **Mycological Research**, v.102, n.2, p.136-140, 1999.
- HO C. C. Identity and characteristics of *Neurospora intermedia* responsible for oncom fermentation in Indonesia. **Food Microbiology** , v.3, p.115-132, 1986.
- HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-Glycerol medium for enumeration of Xerophilic fungi from low-moisture foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.39, n.3, p.488-492, 1980.
- HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS. **Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises**. São Francisco, 1990.
- IFF ESSÊNCIAS E FRAGRÂNCIAS. 1.ed. Rio de Janeiro: IFF. **Aromas**. 1996.
- INNIS, D. H.; SNINSKY, J. J AND WHITE, T.J. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. 482p.
- INOUE, Y.; FUKUDA, K.; WAKAI, Y.; SUDSAI, T.; KIMURA, A. Ester formation by a yeast *Hansenula mrakii* IFO 0895: Contribution of esterase for iso-amyl acetate production in sake brewing. **Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie**, v.27, p.189-193, 1994.
- IOFFE, B. V. **Head-space analysis and related methods in gas chromatography**. Cap.5, p.257-261, 1982.
- IRELAN, J.; MIAO, V.; SELKER, E. U. **Small scale DNA preps for *Neurospora crassa***. Disponível na Internet: <http://www.kumc.edu/research/fgsc/fgn/irelan.html>. 13 jun. 1997.
- JANSSENS, L.; DE POOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J. Production of

- flavours by microorganisms. **Process Biochemistry**, v.27, p.195-215, 1992.
- JEFFCOAT, R.; WILLIS, B. J. A manufacturing process for hexadecanolide. **Developments in Food Science**, v.18, p.743-751, 1988.
- JIANG, L.; HIRUKI, C. Polymerase chain reaction amplification and restriction analysis of the ribosomal DNA of *Olpidium radicale* isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v.26, p.87-93, 1996.
- JOLLIVET, N.; BELIN, J-M.; VAYSSIER, Y. Comparison of volatile flavor compounds produced by ten stains of *Penicillium camemberti* Thom. **Lait**, v.121, p.1837-1844, 1993.
- KITAZIMA, K. On the fungal luxuriantly grown on the great fire of Tokyo on Sept 1, 1923. **Annual Phytopathology Society Japanese**, v.1, p.15-19, 1925.
- KODJO, A.; MOUSSA, A.; BORGES, E.; RICHARD, Y. Identification of *Moxarella-like* bacteria isolated from caprine and ovine nasal flora. **Journal of Veterinary Medicine; Serie B**, v.40, p.97-104, 1993.
- KRASNOBAJEV, V.; HELMILINGER, D. Fermentation of fragrances: biotransformation of β -ionone by *Lasiodiplodia theobromae*. **Helvetica Clinica Acta**, v.65, p.1590-1601, 1982.
- KRUG, J. C.; KHAN, R. S. A new homothallic species of *Neurospora* from Hungary. **Mycologia**, v.83, n.6, p.829-832, 1991.
- LESLIE, J. F.; KLEIN, K. K. Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. **Genetics**, v.144, p.557-567, 1996.
- LU, C. C.; TANG, K. F. J.; CHEN, S. N. Identification and genetic characterization of

- yeasts isolated from freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* de Man, in Taiwan. **Journal of Fish Diseases**, v.21, p.185-192, 1998.
- LYRA, C.; HANTULA, J.; VAINIO, E.; RAPALA, J.; ROUHIAINEN, L.; SIVONEN, K. Characterization of Cyanobacteria by SDS-PAGE of well-cell proteins and PCR/RFLP of the 16S rRNA gene. **Archives of Microbiology**, v.168, p.176-184, 1997.
- MAHONEY, D. P.; HUANG, L. H.; BACKUS, M. P. New homothalic *Neurospora* from tropical soil. **Mycologia**, v.61, p.264-272, 1969.
- MAKIMURA, K. **Detection and identification of a wide range of medically important fungal species from PCR and southern analysis.** Disponível na Internet: <http://timm.main.teikyo-u.ac.jp/pcr.e.html>. 10 jan. 1999.
- MOLINARI, F.; MARIANELLI, G.; ARAGOZZINI, F. Production of flavours esters by *Rhizopus oryzae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.43, p.967-973, 1995.
- MÖLLER, E. M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi; fruit bodies and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.6115-6116, 1992.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments.** 3.ed. New York: John Wiley & Sons. 1991.
- MONTRONCHER, R.; VERNER, M. C.; BRIOLAY, J.; GAUTIER, C.; MARMEISSE, R. Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.295-303, 1998.

- MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 5.ed. Campinas: Editora da UNICAMP. 1985.
- MURRAY, R. G. E.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; DE VOS, P.; GOODFELLOW, M.; GRIMONT, P. A. D.; PFENNIG, N.; STACKEBRANDT, E.; ZAVARZIN, G. A. Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.40, p.213-215, 1990.
- NELSON, A. C.; NOVAK, R. O.; BACKUS, M. P. A new species of *Neurospora* from soil. **Mycologia**, v.56. p.384-392, 1964.
- NELSON, M. A. Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. **Elsevier Science**, v.12, n.2, p.69-74, 1996.
- OKAFOR, N; IJIOMA, B.; OYOLU, C. Studies on the microbiology of cassava retting for foo-foo production. **Journal of Applied Bacteriology**, v.56, p.1-13, 1984.
- OSHEROV, N.; GREGORY, S. M. **Optimization of protein extraction from *Aspergillus nidulans* for gel electrophoresis**. Disponível na Internet:
<http://www..seqnet.dl.ac.uk/research/fgsc/fgn45/45osherov.html>. 20 maio 1997.
- OUELLET, T.; SEIFERT, K. A. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. **Genetics**, v.83, n.9, p.1003-1007, 1993.
- PANDIT, A.; MAHESHWARI, R. Life-history of *Neurospora intermedia* in a sugar cane field. **Journal Bioscience**, v.21, n.1, p.57-79, 1996.
- PANDIT, N. N.; RUSSO, V. E. A. **Simple methods for crossing and genetic analysis of *Neurospora crassa* strains**. Disponível na Internet:
<http://www.kumc.edu/research/fgsc/fgn/ pandit.html>. 28 set. 1996.

- PARK, Y. K.; ZENIN, C. T. UEDA, S; MARTINS, C. O; MARTINS, J. P. Microflora in beiju and their biochemical characteristics. **Journal Fermentation Technology**, v.60, n.1, p.1-4, 1982.
- PASTORE, G. M.; PARK, Y. K.; MIN, D. B. Production of fruity aroma by *Neurospora* from beiju. **Mycology Research**, v.98, n.11, p.1300-1302. 1994.
- PECCHIA, S.; MERCATELLI, E.; VANNACCI, G. PCR amplification and characterization of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA in *Pyrenophora graminea*. **FEMS Microbiology Letters**, v.166, p.21-27, 1998.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. Vol. 1. McGraw-Hill (Ed.). 1980.
- PERKINS, D. D.; TURNER B. C. *Neurospora* from natural populations : towards the population biology of a haploid eukaryote. **Experimental Mycological**, v.12, p.91-131, 1988.
- PERKINS, D. D. *Neurospora*: The organism behind the molecular revolution. **Genetics**, v.130, p.687-701, 1992.
- PERKINS, D. D. How should the infertility of interspecies crosses be designated? **Mycologia**, v.86, n.6, p.758-761, 1994.
- PERKINS, D. D. **Hints and precautions for the care, feeding and breeding of *Neurospora***. Disponível na Internet:
<http://www.seqnet.dl.ac.uk/research/fgsc/methods/perkins.html>. 17 maio 1996.
- PERKINS, D. D.; TURNER, B. C.; BARRY, E. G. Strains of *Neurospora* collected from nature. **Evolution**, v.30, p.281-313, 1976.

- PINHEIRO, J. C. D. A tiquira de mandioca. *Lavoura Arrozeira*, v.34, n.331, p.68-70, 1981.
- PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, v.8, p.151-156, 1989.
- PRESCOLT, H. *Microbiology*. Cap.20: Microbial Taxonomy, p.404-425. 1993.
- PRIEST, F.; AUSTIN, B. *Modern bacterial taxonomy*. London: Chapman & Hall. 1993.
- RAJU, N. B. Genetic control of the sexual cycle in *Neurospora*. *Mycological Research*, v.96, n.4, p.241-262, 1992.
- RATH, P. M.; KAMPHOFF, S.; ANSORG, R. Value of different methods for the characterisation of *Aspergillus terreus* strains. *Journal Medical Microbiology*, v.48, p.161-166, 1999.
- REDDY, M. M.; THRELKELD, S. F. H. Genetic studies of isozymes in *Neurospora*. I. A study of eight species. *Canadian Journal Genetic Cytology*, v.13, p.298-305, 1971.
- RISTAINO, J. B.; MADRITCH, M.; TROUT, C. L.; PARRA, G. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Applied Environmental Microbiology*, v.63, n.3, p.948-954, 1998.
- SAMELIS, J.; MAUROGENAKIS, F.; MATAXOPOULOUS, J. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *International Journal of Food Microbiology*, v.23, p.179-196, 1994.
- SELANDER, R. K.; CAUGANT, D. A.; ONCHMAN, H.; MUSSER, J. M.; GILMOUR, M. N.; WHITTAM, T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial

- population genetic and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, p.873-884, 1986.
- SEVILLA, M. R.; ORBACH, M. J. **Isolation in pure culture, dilution, and spore counting**. Disponível na Internet: <http://ag.arizona.edu/classes/plp427L/lab2.html>. 10 jun. 1996.
- SHAMBUYI, M.; BEUCHAT, L.R.; HUNG, Y.; NAKAYAMA, T. Evaluation of substrates and storage conditions for preparing and maintaining starter cultures for tempeh fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, p.77-85, 1992.
- SHAW, D. E. Blooms of *Neurospora* in Australia. **Mycologist**, v.4, p.6-13, 1990.
- SHEAR, C. L.; DODGE, B. O. Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sithophila* group. **Journal of Agricultural Research**, v.34, n.11, p.1019-1042, 1927.
- SMITH, M. L.; DUCHESNE, L. C.; BRUHN, J. N.; ANDERSON, J. B. Mitochondrial genetics in a natural population of the plant pathogen *Armillaria*. **Genetics**, v.126, p.576-582, 1990.
- SOKOLOVSKY, V.; KALDENHOFF, M. R.; RUSSO, V. E. A. **Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa***. Disponível na Internet: <http://www.seqnet.dl.ac.uk/research/fgsc/fgn37/soko1.html>. 30 maio 1997.
- SPATAFORA, J. W. Ascomal evolution of filamentous ascomycetes: evidence from molecular data. **Canadian Journal Botanic**, v.73(suppl), p.S811-S815, 1995.
- STANFORD *NEUROSPORA* METHODS. Disponível na Internet:

- <http://www.seqnet.dl.ac.uk/research/fgsc/methods/stanford.html>. 7 jul. 1997.
- SYMOENS, F.; VIVIANI, M. A.; NOLARD, N. Typing by immunoblot of *Aspergillus fumigatus* from nosocomial infections. **Mycoses**, v.36, p.229-237, 1993.
- TAI, F. L. Two new species of *Neurospora*. **Mycologia**, v.27, p.328-330, 1935.
- TORTORA, G. J.; BERDELL, R. F.; CHRISTINE, L. C. **Microbiology: An Introduction**. Addison Wesley (Ed.). 1997.
- TOWNER, K. J.; COCKAYNE, A. **Molecular Methods for Microbial Identification and Typing**. 1.ed. London: Chapman & Hall. 1993. 201p.
- TURNER, B. C.; FAIRFIELD, A. A putative fifth heterothalic species in *Neurospora*. Disponível na Internet: <http://www/kummc.edu/research/fgsc/fgn37/turner1.html>. 28 set. 1997.
- TURNER, B. C. **Identification of the fragrant strain ATCC 46892 as *Neurospora sithopila***. Disponível na Internet: <http://www/kumc.edu/research/fgsc/fgn39/turner.html>. 10 jun. 1995.
- TWIDDY, D. R. Volatiles as indicators of fungal growth on cereal grains. **Tropical Science**, v.34, p.416-428, 1994.
- TYRREL, M. Advances in natural flavors and materials. **Perfumer & Flavorist**, v.20, p.13-21, 1995.
- UNGER, L. Basic business trends in the worldwide flavor and fragrance industry (1987-1990). **Perfumer & Flavorist**, v.14, n.3, p.42-45, 1989.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M. D.; VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy a consensus approach to bacterial systematic. **Microbiological**

Reviews, v.60, p.407-438, 1996.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.

WESTEGARD, M.; MITCHELL, H. K. *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. **American Journal of Botany**, v.34, p.573-577, 1947.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal DNA genes. In: INNIS, D. H.; SNINSKY, J. J AND WHITE, T.J. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p.315-322.

YAMAUCHI, H.; AKITA, O; OHATA, T.; AMAUCHI, T.; HARA, S.; YOSHIZAWA, K. Production and application of a fruity odor in a solid-state culture of *Neurospora* sp. using pregelatinized polished rice. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v.53, p.2881-2886, 1989a.

YAMAUCHI, H.; OHATA, T.; AMAUCHI, T.; AKITA, O; HARA, S.; YOSHIZAWA, K. Cell-free synthesis of ethyl hexanoate by extract from *Neurospora* sp., containing a novel acyl coenzyme A: alcohol acyltransferase. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v.53, n.3, p.821-825, 1989c.

YAMAUCHI, H.; HASUO, T.; AMACHI, T.; AKITA, O; HARA, S.; YOSHIZAWA, K. Purification and characterization of Acyl Coenzyme A: Alcohol acyltransferase of *Neurospora* sp. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v.53, n.6, p.1551-1556, 1989b.

YAMAUCHI, H.; OHATA, T.; AMAUCHI, T.; HARA, S. Production of characteristics

odors by *Neurospora*. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v.55, n.12, p.3115-3116, 1991.

YASSIN, S.; WHEALS, A. *Neurospora* species in bakeries. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, p.377-380, 1992.

YOSHIZAWA, K.; YAMAUCHI, H.; HASUO, T.; AKITA, O.; HARA, S. Production of a fruity odor by *Neurospora sp.* **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v.52, n.8, p.2129-2130, 1988.