

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**ESPÉCIES DE *Aspergillus* ASSOCIADAS À PODRIDÃO VERMELHA
DO CAULE DO SISAL**

PATRÍCIA OLIVEIRA DOS SANTOS

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
MARÇO - 2011**

**ESPÉCIES DE *Aspergillus* ASSOCIADAS À PODRIDÃO
VERMELHA DO CAULE DO SISAL**

PATRÍCIA OLIVEIRA DOS SANTOS

BIÓLOGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA, 2008

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza

Co-orientador: Phellippe A. S. Marbach

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

MARÇO, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

S237 Santos, Patrícia Oliveira dos.
Espécies de *Aspergillus* associadas à podridão vermelha do caule do sisal/ Patrícia Oliveira dos Santos. _ Cruz das Almas - BA, 2011.
68 f.; il.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza.
Co-Orientador: Phellippe A. S. Marbach

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola..

1. Sisal – Fitopatologia. 2. Sisal – Controle Biológico. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 633.577

Ficha catalográfica elaborada pela seção técnica da biblioteca central da
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Cruz das Almas.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
Patrícia Oliveira dos Santos**

Dr. Jorge Teodoro de Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(Orientador)

Dr. Carlos Ivan Aguilar Vildoso
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC

Dra. Karina Peres Gramacho
Centro de Pesquisas do Cacau - CEPEC

Dissertação homologada pelo colegiado do Curso de Mestrado em Microbiologia
Agrícola em _____

À Deus e à minha Família,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que proporciona força e sabedoria necessária para enfrentar as dificuldades e que conforta a alma;

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado;

Aos professores do Mestrado em Microbiologia Agrícola, profissionais excelentes, pelas contribuições e ensinamentos;

Ao Dr. Jorge Teodoro de Souza, meu orientador, pela competência, amizade e confiança em meu trabalho;

À Dra. Mariza Queiroz, por ter aberto as portas da Universidade Federal de Viçosa para mim, o que enriqueceu de conhecimentos novos a minha jornada acadêmica;

Ao Dr. Fabiano Martins, por disponibilizar os equipamentos necessários para realização da análise morfológica;

À Dra. Ana Cristina Firmino, pelos ensinamentos e por ter doado as mudas para o desenvolvimento do trabalho;

À minha família, principalmente meu pai, minha vó e minha tia Dita, pelo amor e cuidados;

Ao meu namorado, Bruno Mello, pelo amor e carinho;

Aos colegas de curso, por me acompanharem nessa caminhada tornando o trabalho mais prazeroso e alegre;

Aos amigos que conquistei durante o curso: Aline, Juan, Adailson, Adriane, Manuela, Jackeline, Neide e Beth, que bom ter conhecido vocês;

À Elida, Augusto, e Jurema que merecem um agradecimento especial, pois foram pessoas que muito contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho. Sempre solícitos, e me incentivando, se tornaram grandes amigos;

Aos colegas de laboratório, principalmente Valter e Jeferson, que me ajudaram muito e também tornaram a rotina mais divertida;

À Lene, técnica do Laboratório de Microbiologia, por estar sempre disposta a ajudar e ser um exemplo de profissional e pessoa;

Aos amigos que estão longe, mas que sempre carrego em meus pensamentos;

À Lorena Meneses, amiga sempre presente, que me suporta quando eu tou nervosa, me ouve quando eu preciso, e me coloca pra cima sempre;

À Ivete Simões, que já considero da minha família, pelos cuidados e carinho;

À FAPESB, pela concessão da bolsa durante todo o período do curso;

Por fim, à todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho;

Muito obrigada!!!

"De tudo ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando
A certeza de que é preciso continuar
E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminarmos.
Devemos fazer da interrupção um caminho novo,
Da queda um passo de dança,
Do medo uma escada,
Do sonho uma ponte."

(Fernando Sabino)

ÍNDICE

Resumo
Abstract

Introdução.....1

Capítulo 1: Taxonomia de *Aspergillus* sp. seção *Nigri* e a podridão vermelha do caule do sisal.....3

Resumo.....4

Abstract.....5

1.1 O sisal (*Agave sisalana*).....6

1.2 A cultura do sisal: aspectos sócio-econômicos.....6

1.3 Podridão vermelha do caule do sisal.....8

1.4 Outras doenças de plantas causadas por *Aspergillus*.....10

1.5 Taxonomia de *Aspergillus* seção *Nigri*.....11

Capítulo 2: Análise morfológica e identificação molecular de *Aspergillus* associados ao sisal.....18

Resumo19

Abstract.....20

Introdução21

Material e Métodos23

Resultados.....30

Discussão.....42

Considerações finais.....45

Referências.....46

RESUMO

Santos, P. O. Espécies de *Aspergillus* associadas à podridão vermelha do caule do sisal.

Nos últimos dez anos, a produção de sisal no sertão da Bahia vem declinando devido à ocorrência da podridão vermelha do caule. Nos Estados da Bahia e Paraíba, *Aspergillus niger* foi isolado de plantas com sintomas da doença. Entretanto, a identificação do patógeno foi feita somente com base em características morfológicas. Atualmente, sabe-se que existem diversas espécies de *Aspergillus* semelhantes e algumas são indistinguíveis de *A. niger* através do uso de caracteres morfológicos. Por serem extremamente difíceis de serem distinguidas com base na morfologia, essas espécies fazem parte do “complexo *A. niger*”. Ferramentas moleculares tais como sequenciamento de genes que codificam proteínas têm sido aplicadas para resolver questões taxonômicas, e para o gênero *Aspergillus* sequências de β -tubulina são utilizadas com frequência. Noventa e um isolados foram identificados ao nível de espécie por meio de análises filogenéticas, morfológicas e testes de patogenicidade. As espécies *Aspergillus niger*, *A. foetidus*, *A. tubingensis*, *A. aculeatus*, *A. brasiliensis* e *A. alabamensis* foram identificadas associadas ao sisal. Dessas, somente *A. aculeatus* e *A. alabamensis* não foram patogênicos ao sisal. Essas informações poderão ser importantes para programas de melhoramento visando à resistência ao patógeno e na busca de outras alternativas de controle da doença.

Palavras-chave: Etiologia, Podridão vermelha do caule, Análise morfológica, Identificação molecular, Complexo *A. niger*, Espécies crípticas.

ABSTRACT

Santos, P. O. *Aspergillus* species associated to sisal bole red rot disease.

Over the last decade the production of sisal in the semi-arid region of Bahia has been decreasing due to the incidence of sisal bole red rot disease. In Bahia and Paraíba states *Aspergillus niger* was isolated from plants with symptoms of the disease. However, the identification of the pathogen was done only through morphological characteristics. Currently, it is known that there are several species of *Aspergillus* that are indistinguishable from *A. niger* by using morphological characters. Because they are extremely difficult to differentiate based on morphology, these species are part of the "aggregate *A. niger*". Molecular tools such as sequencing genes that encode proteins have been applied to solve taxonomic issues and for the genus *Aspergillus* β -tubulin sequences are frequently used. Ninety-one isolates were identified to the species level by pathogenicity tests, phylogenetic, and morphological analyses. The isolates *Aspergillus niger*, *A. foetidus*, *A. tubingensis*, *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, and *A. alabamensis* were identified in association with sisal. Only *A. aculeatus* and *A. alabamensis* were not pathogenic to sisal. This information will be important to develop resistant varieties and in the search for alternative control methods.

Key-words: Aethiology, Red rot disease, Morphological analysis, Molecular identification, Aggregate *A. niger*, Cryptic species.

INTRODUÇÃO

O Sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma monocotiledônea pertencente à família Agavaceae, subfamília Agavoidea (BELTRÃO, 2006). Trazido do México por volta de 1903, somente a partir do final da década de 1930 o sisal passou a ser visto como uma alternativa econômica (SUINAGA et al., 2006). A planta foi introduzida nos estados da Paraíba, Bahia e Rio Grande do Norte, em virtude das condições climáticas propícias. A exploração do sisal no Brasil é concentrada no semi-árido nordestino, geralmente em áreas de pequenos produtores, com condições climáticas pouco favoráveis a exploração de outras culturas que ofereçam resultados econômicos satisfatórios (SUINAGA, 2006). Seu principal produto é a fibra tipo dura, com elevados teores de celulose e lignina, que oferecem inúmeras aplicações. As folhas do sisal produzem uma fibra altamente resistente que é utilizada para produzir artesanatos, vassouras, sacos, bolsas, chapéus, barbantes, cordas, capachos e tapetes, bem como na fabricação de celulose para a produção de papel Kraft e outros tipos de papel fino. Além dessas aplicações, há possibilidade de utilização da fibra na indústria automotiva, de móveis, de eletrodomésticos, de geotêxteis, na mistura com polipropileno, em substituição à fibra de vidro e na construção civil (ALVES et al., 2005). Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de sisal. A importância da cultura do sisal decorre da geração de emprego que possibilita a fixação do homem no campo em regiões semi-áridas, onde vivem comunidades carentes e também pelo seu poder econômico, já que seus produtos, especialmente a fibra, são importantes fontes de divisas por meio de sua exportação e/ou comercialização interna. Nos últimos dez anos, a produção de sisal no sertão da Bahia vem decrescendo devido à ocorrência da podridão vermelha do caule (COUTINHO et al., 2006). Nos municípios produtores do Estado da Bahia tem-se observado elevada devastação dos plantios de sisal devido à essa doença, que resulta na morte da planta e perda da qualidade da fibra. Coutinho et al. (2006) e Soares et al. (2006) identificaram *Aspergillus niger* como o agente causal da podridão vermelha do caule do sisal nos Estados da Paraíba e Bahia. Entretanto, em todos estes casos, a identificação do patógeno foi feita somente com base em características morfológicas.

Existem diversas espécies de *Aspergillus* semelhantes e algumas são indistinguíveis de *A. niger* através do uso de caracteres morfológicos (GIRAUD et al., 2007). É muito comum que todos os isolados de *Aspergillus* desenvolvendo colônias de coloração negra sejam identificados como *A. niger*, e às vezes o mesmo isolado é preservado em coleções de cultura sob nomes de diferentes espécies (ABARCA, 2004). Por serem extremamente difíceis de serem distinguidas com base nos dados de morfologia, essas espécies fazem parte do “complexo *A. niger*”. Nos últimos anos, várias ferramentas bioquímicas e abordagens moleculares diferentes têm sido utilizadas para desenvolver métodos rápidos e confiáveis para a identificação de *Aspergillus* de coloração negra (ABARCA, 2004). Técnicas moleculares tais como sequenciamento de genes que codificam proteínas, têm sido aplicadas para resolver questões taxonômicas (GEISER et al., 2007). Para o gênero *Aspergillus* sequências de β -tubulina e calmodulina são utilizadas com frequência (SAMSON et al., 2004).

No primeiro capítulo deste trabalho foram abordados aspectos da cultura do sisal, além de peculiaridades referentes à podridão vermelha do caule. Aspectos sobre a taxonomia dos *Aspergillus* seção *Nigri* foram revisados, mostrando a complexidade da classificação dos fungos que pertencem a esse grupo.

No capítulo 2, apresentam-se resultados da patogenicidade, análise morfológica e identificação molecular de isolados obtidos da região sisaleira da Bahia. A identificação do patógeno com base em métodos moleculares é importante para o desenvolvimento cultivares resistentes e para desenvolver alternativas de controle da doença. Com isso, esse trabalho espera contribuir na aquisição de conhecimentos essenciais sobre a podridão vermelha do sisal, que são escassos na literatura científica.

CAPÍTULO 1
TAXÔNOMIA DE *Aspergillus* SEÇÃO *NIGRI* E A PODRIDÃO
VERMELHA DO CAULE DO SISAL

RESUMO

Santos, P. O. Taxonomia de *Aspergillus* seção *Nigri* e a podridão vermelha do caule do sisal.

O sisal (*Agave sisalana*) é originário da península de Yucatan, no México. A cultura do sisal gera empregos e divisas, possibilitando a fixação do homem nas regiões semi-áridas. O Estado da Bahia é o maior produtor nacional, com 94% da produção. Nos últimos 10 anos, a produção de sisal no sertão da Bahia vem decrescendo devido à ocorrência da podridão vermelha do caule. Nos municípios produtores, tem-se observado uma elevada devastação dos plantios de sisal devido a essa doença, que resulta na morte da planta e perda da qualidade da fibra. *Aspergillus niger* foi identificado como o agente causal da podridão vermelha do sisal nos Estados da Paraíba e Bahia. Entretanto, em todos estes casos, a identificação do patógeno foi feita somente com base em características morfológicas. As espécies do táxon *Aspergillus* seção *Nigri*, são morfológicamente semelhantes, tornando sua taxonomia complicada. Técnicas baseadas em análises moleculares são necessárias para a correta identificação das espécies. Nesse capítulo foi realizada uma revisão sobre a cultura do sisal, a podridão vermelha do caule e a taxonomia de *Aspergillus* seção *Nigri*.

Palavras-Chave: Sisal, Semi-árido, Podridão vermelha do caule, Etiologia, Taxonomia, *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

Santos, P. O. Taxonomy of *Aspergillus* section *Nigri* and sisal bole red rot disease.

Sisal (*Agave sisalana*) is native to Yucatan, Mexico. This crop contributes to the creation of jobs and revenues turning possible the settlement of farmers in the Northeastern semi-arid region. Bahia state is the major national producer of sisal accounting for 94 % of the production. In the last 10 years the production of sisal in Bahia has decreased due to the incidence of the red rot disease of sisal. Devastating damages are being observed in the producing municipalities because the disease induces plant death and losses in fiber quality. *Aspergillus niger* was identified as the causal agent of red rot disease of sisal in the states of Paraíba and Bahia. However, the identification of the pathogen was done only on the basis of morphological characteristics. The species of the taxon *Aspergillus* section *Nigri* are morphologically similar, making the taxonomy difficult. Techniques based on molecular analyses are necessary for the correct identification of *Aspergillus* species. In this chapter a review on the sisal crop, bole red rot disease, and the taxonomy of *Aspergillus* section *Nigri* was done.

Key-words: Sisal, Semi-arid region, Red rot disease of sisal, *Aspergillus niger*, Aethiology, Taxonomy.

1.1 A cultura do Sisal

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma monocotiledônea pertencente à família Agavaceae, subfamília Agavoidea (BELTRÃO, 2006). É originário da península de Yucatan, no México, sendo amplamente distribuído nas regiões Nordeste do Brasil e Leste da África (SUINAGA et al., 2006). Essa espécie apresenta bom desenvolvimento em locais com altitude de até 600 m e regime de precipitação pluvial de 450 a 1200 mm/ano (BELTRÃO, 2006). É uma planta xerófila, portanto, resistente a secas prolongadas e altas temperaturas. Perene, plurianual, porém monocárpica, esta espécie, fenece depois do processo de frutificação, que demora de 5 a 15 anos para ocorrer e se completar (MEDINA, 1954). Possui características morfológicas que ajudam na adaptação ao semi-árido como: folhas carnosas, número reduzido de estômatos e epiderme fortemente cutinizada (SILVA, 1999).

Seu principal produto é a fibra tipo dura, com elevados teores de celulose e lignina, que oferecem inúmeras aplicações. As folhas do sisal produzem uma fibra altamente resistente que é utilizada para produzir artesanatos, vassouras, sacos, bolsas, chapéus, barbantes, cordas, capachos e tapetes, bem como na fabricação de celulose para a produção de papel Kraft e outros tipos de papel fino (para cigarro, filtro, papel dielétrico, absorvente higiênico, fralda). Além dessas aplicações, há possibilidade de utilização da fibra na indústria automotiva, de móveis, de eletrodomésticos, de geotêxteis, na mistura com polipropileno, em substituição à fibra de vidro e na construção civil (ALVES et al., 2005). Outros subprodutos do sisal, que hoje praticamente não são aproveitados, podem ter inúmeros usos. A mucilagem pode ser utilizada como complemento alimentar para rebanhos bovinos e caprinos; a bucha, como adubo orgânico; e o suco, é rico em hecogenina, fármaco que serve como medicamento e pode ser utilizado como bioinseticida. Além disso, no suco encontra-se a inulina que pode ser utilizada como adoçante. O substrato resultante do processamento do sisal pode ser aproveitado para o cultivo de cogumelos comestíveis (SILVA, 1999).

Trazido do México por volta de 1903, somente a partir do final da década de 1930 o sisal passou a ser visto como uma alternativa econômica (SUINAGA et al., 2006). A planta foi introduzida nos estados da Paraíba, Bahia e Rio Grande do Norte, em virtude das condições climáticas propícias. Por volta de 1940, houve

expansão da cultura em base econômica. Este fato foi baseado na demanda crescente de fibra durante a Segunda Guerra Mundial (SUINAGA et al., 2006). O sisal teve seu apogeu econômico durante a Crise do Petróleo nas décadas de 60 e 70. Apesar da existência e utilização das fibras sintéticas, a necessidade de preservação da natureza e a forte pressão dos grupos ambientalistas vêm contribuindo para o incremento da utilização de fios naturais, onde se destaca a fibra de sisal (WIKIPEDIA, 2010). Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de sisal, sendo a exploração concentrada no semi-árido nordestino, geralmente em áreas de pequenos produtores, com condições climáticas pouco favoráveis a exploração de outras culturas que ofereçam resultados econômicos satisfatórios (SUINAGA et al., 2006).

A importância da cultura do sisal vai além da geração de emprego que possibilita a fixação do homem no campo em regiões semi-áridas, onde vivem comunidades carentes, mas também pelo seu poder econômico, já que seus produtos, especialmente a fibra, são importantes fontes de divisas por meio de sua exportação e/ou comercialização interna (ABREU, 2010). Em 2005, foram produzidas 219.967 toneladas de fibra no Brasil (IBGE, 2010). O Brasil, com 47% da produção, seguido da Tanzânia (15%), China (15%) e Quênia (12%) são os maiores produtores mundiais de sisal. Os Estados Unidos e China são os principais importadores, absorvendo 45% e 22% da produção brasileira, respectivamente (SECEX, 2009). O cultivo ocorre em 112 municípios do Nordeste, sendo o estado da Bahia o maior produtor nacional, com 94% da produção. A cultura do sisal ocupa uma área 235.417 hectares na Bahia (IBGE, 2010). Em 2008, as exportações baianas do segmento de sisal e derivados foram de US\$ 93.975.22 (SINDIFIBRAS, 2010). A cultura é de fundamental importância na economia nordestina porque torna produtivas regiões semi-áridas, sem alternativas econômicas e baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), sendo fator de sobrevivência, pois emprega grande volume de mão-de-obra. Estima-se que a cadeia produtiva emprega cerca de 700 mil pessoas. O cultivo do sisal se estende por toda a região do semi-árido baiano, englobando o total de 16 microrregiões do Estado. Dentre estas, se destacam as microrregiões de: Serrinha, Senhor do Bonfim, Jacobina e Euclides da Cunha, que juntas perfazem 90% da área plantada no Estado (IBGE, 2010).

1.2 Podridão vermelha do caule do sisal

Embora a rusticidade da planta e a epiderme da folha, com sua cutícula espessa e cerosa, possa conferir uma barreira natural à penetração de microrganismos patogênicos, e ao ataque de insetos, o sisal pode ser afetado por várias doenças (SILVA, 2006). Apesar das várias doenças que afetam o sisal, apenas duas foram relatadas até o presente no Brasil: a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum agaves*, que não se constitui propriamente um problema fitossanitário de importância econômica (MEDINA 1954; SILVA, 2006), e a podridão vermelha do caule, também conhecida como podridão vermelha do sisal, podridão do cepo, podridão úmida do cepo ou ainda podridão parda do colo (LIMA et al., 1998; COUTINHO et al., 2006; SOARES et al., 2006; SILVA et al., 2006).

Nos últimos dez anos, a produção de sisal no sertão da Bahia vem decrescendo devido à ocorrência da podridão vermelha do caule (COUTINHO et al., 2006). Segundo estudos realizados na Paraíba e Bahia, a incidência da doença tem variado de 5 % a 65 % (LIMA et al., 1998; COUTINHO et al., 2006; ABREU et al., 2007). Nos municípios produtores do Estado da Bahia, cuja economia é baseada na exploração desta cultura, tem-se observado elevada devastação dos plantios de sisal devido à podridão vermelha do caule, que resulta na morte da planta e perda da qualidade da fibra. A doença apareceu pela primeira vez no Brasil no estado da Paraíba, segundo dados de Machado (1951), citado por Medina (1954).

Na Bahia, foi constatada pela primeira vez por pesquisadores da Embrapa Semi-árido e Empresa brasileira de desenvolvimento agrícola - EBDA, na fazenda Mandacaru, município de Santaluz, em um plantio comercial de 500 hectares de sisal (COUTINHO et al., 2006). A doença é caracterizada pela coloração vermelha que se estende do caule para a base das folhas (figura 1). A planta infectada fica amarelada e murcha, o caule apodrece e se desprende facilmente do solo, levando a planta à morte (SÁ, 2009).



Figura 1. Sintomas da podridão vermelha do caule do sisal. Planta com sintomas de amarelecimento e murcha (a); Coloração vermelha que se estende do caule para a base das folhas (b, c); Planta morta (d).

Apesar da doença ser fatal, as plantas de sisal infectadas pelo patógeno sobrevivem por algum tempo, por que o apodrecimento do caule, resultante da colonização pelo patógeno, ocorre de forma lenta (BOCK, 1965; SÁ, 2009). As folhas de plantas afetadas pela podridão vermelha não servem para o desfibramento e aproveitamento das fibras e as plantas sintomáticas morrem com o progresso da doença. Embora ainda existam dúvidas com relação à etiologia dessa doença, três microrganismos já foram relatados causando podridões no caule do sisal: *Pythium aphanidermatum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Aspergillus niger*. Apesar dos relatos sobre esses organismos como causadores de podridões no caule do sisal (BOCK, 1965; LIMA et al., 1998), Coutinho et al. (2006) e Soares et al. (2006) identificaram somente *Aspergillus niger* como o agente causal da doença nos estados da Paraíba e Bahia, sendo que apenas essa espécie teve a sua patogenicidade confirmada

(COUTINHO et al., 2006). Esse fungo é classificado como saprófita por se desenvolver principalmente decompondo resíduos, transformando-os em formas químicas mais simples. Pode ser classificado também como patógeno oportunista, em função de causar doença na planta dependendo de lesões de origem mecânica ou fisiológica e de condições ambientais adversas no hospedeiro para iniciar o processo de infecção (BOCK, 1965; LIMA et al., 1998; SILVA, 2006).

A identificação do patógeno foi feita somente com base em características morfológicas. Atualmente, sabe-se que existem diversas espécies de *Aspergillus* semelhantes e algumas são indistinguíveis de *A. niger* através do uso de caracteres morfológicos (GIRAUD et al., 2007). Portanto, é necessário confirmar que a espécie *A. niger* é o agente etiológico da podridão vermelha do sisal. Além disso, não existe nenhum estudo sobre a diversidade genética do agente etiológico da podridão vermelha do caule do sisal. A correta identificação do agente etiológico e informações acerca da diversidade genética do fungo são importantes no estudo da doença. É necessário conhecer a identidade e a diversidade do patógeno para desenvolver cultivares resistentes e buscar alternativas eficazes para controlar a doença.

1.3 Outras doenças de plantas causadas por *Aspergillus*

Apesar de não serem considerados agentes etiológicos principais, as espécies de *Aspergillus* são responsáveis por doenças em várias plantas e produtos vegetais. Eles podem contaminar produtos agrícolas em diferentes fases, incluindo pré-colheita, colheita, processamento e manuseio (PERRONE et al., 2007). Normalmente provoca doenças de pós-colheita tais como podridões em uva, figo, milho e cebola (FREIRE, 2006; SANTIN et al., 2004, NUNES et al., 1997). Em caju, é o agente etiológico da “Kernel rot” que afeta os frutos verdes, ocasionando a podridão seca da amêndoa (MELLO et al., 1999). Em amendoim, provoca a podridão do colo, principalmente em solos com baixos teores de matéria orgânica (MORAES et al., 1997 citado por ABREU, 2010). São fungos considerados oportunistas, que só penetram em tecidos injuriados do hospedeiro, necessitando de lesões de origem mecânica ou fisiológica para que ocorra a infecção (LIMA et al., 1998).

O mecanismo utilizado por *Aspergillus* para causar doenças em plantas parece ser a produção de enzimas hidrolíticas, que causam a desintegração dos componentes celulares das plantas, ou ainda, podem secretar toxinas resultando na morte e degradação das células (AGRIOS, 2005), porém não existem estudos detalhados sobre os mecanismos utilizados por esse fungo.

1.4 Taxonomia de *Aspergillus* seção *Nigri*

As espécies do táxon *Aspergillus*, são fungos filamentosos, mitospóricos, pertencente ao filo Ascomycota, à ordem Eurotiales, e a família Trichocomaceae e a fase sexuada é conhecida como *Emericella* (DEEPAKE, 2009). A classificação do gênero *Aspergillus* tem sido estudada por muitos taxonomistas. A primeira descrição deste gênero foi feita por Micheli em 1729 (SILVA, 2009). A seção *Nigri* do gênero *Aspergillus* foi criada para agrupar as espécies que se caracterizam pela produção de esporos assexuais marrom-escuros a pretos, com estruturas dos conidióforos uniseriadas ou biseriadas, vesículas esféricas e hifas hialinas ou levemente pigmentadas próximo ao ápice (KLICH & PITT, 1988).

Quando o conídio é diretamente ligado às fiálides, às espécies são denominadas de unisseriadas. Outras espécies apresentam estruturas especializadas que ficam entre a vesícula e as fiálides, designadas métulas, e a presença destas estruturas caracteriza estas espécies como biseriadas (figura 2) (RAPER & FENNELL, 1965; KLICH & PITT, 1988; KOZAKIEWICZ, 1989;).

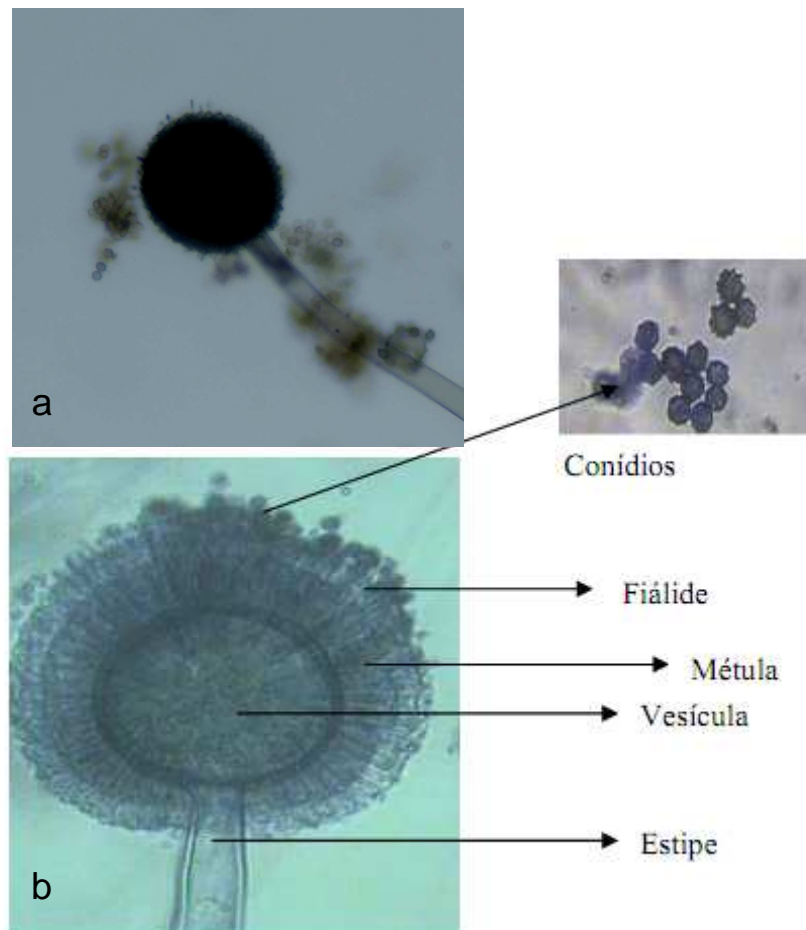


Figura 2. Estruturas morfológicas de *Aspergillus* seção *Nigri*. *Aspergillus uniserialis* (a); *Aspergillus biserialis* (b) (SILVA, 2009).

Membros da seção *Nigri* são distribuídos mundialmente e crescem em uma ampla variedade de substratos. Possuem crescimento aeróbico, são encontrados em abundância como saprofitas no solo, na serrapilheira e na matéria orgânica em decomposição (SCHUSTER et al., 2002). Várias espécies desta seção são utilizadas na indústria de fermentação para a produção de diferentes ácidos orgânicos e enzimas hidrolíticas. *Aspergillus niger* é a espécie desta seção reportada mais freqüentemente, e é amplamente utilizada em processos biotecnológicos (BIGELIS e LASURE, 1987 citados por FERRACIN, 2007).

De acordo com Schuster (2002), *A. niger* cresce na faixa de temperatura de 6 a 47 °C, com ótimo de temperatura variando entre 35 e 37 °C, e na faixa de pH entre 1,4 e 9,8. Rippel e Baldes (1955), citados por Deepake (2009) ressaltam que essas características, além da produção de conidiosporos e sua dispersão pelo ar, garantem que ele seja cosmopolita. Por ser um fungo necrotrófico, continua seu ciclo

de vida sobre a planta senecida ou em restos culturais sobre o solo. O micélio continua a colonizar os tecidos mortos, nutrindo as estruturas reprodutivas, as quais, por sua vez, produzem esporos por tanto tempo quanto existirem nutrientes para o fungo.

A taxonomia dos fungos pertencentes à seção *Nigri* é uma das mais complexas e confusas do gênero. É muito comum que todos os isolados de *Aspergillus* desenvolvendo colônias de coloração preta sejam identificados como *A. niger*, e às vezes o mesmo isolado é preservado em coleções de cultura sob nomes de diferentes espécies (ABARCA, 2004). A taxonomia da seção *Nigri* ainda não está totalmente esclarecida, provavelmente porque durante muitos anos a classificação foi essencialmente baseada em critérios morfológicos e, em alguns casos, as diferenças entre as espécies são muito sutis (FERRACIN, 2007). Espécies difíceis de serem distinguidas com base em morfologia são denominadas espécies crípticas. As espécies da seção *Nigri* que são muito semelhantes são agrupadas no “complexo *A. niger*” (FERRACIN, 2007). O número de taxa proposto para esse complexo varia entre os autores.

Dentre os caracteres morfológicos utilizados para a classificação de fungos desta seção, destacam-se forma e ornamentação conidiais, tamanho dos conídios, estruturas dos conidióforos, coloração das colônias e taxa de crescimento em meios de cultura característicos (RAPER e FENNEL, 1965). Em 1965, Raper e Fennell publicaram um artigo que reunia doze espécies e duas variedades dentro da seção *Nigri*: *A. aculeatus*, *A. awamori*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. ficuum*, *A. heteromorphus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. phoenicis*, *A. pulverulentus*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* var. *pallidus* e *A. foetidus* var. *acidus* (Tabela 1). Raper e Fennell (1965) reconheceram duas espécies unisseriadas: *A. aculeatus* e *A. japonicus*. Em 1980, Al-Musallam citado por Abarca (2004) revisou a taxonomia desta seção e dividiu os *Aspergillus* pretos em cinco espécies que são facilmente distinguíveis entre si: *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. helicothrix* e *A. japonicus*, e o complexo denominado “complexo *A. niger*”, formado por duas espécies: *A. foetidus* e *A. niger*, sendo esta última espécie dividida por sua vez, em seis variedades e duas formas. Kozakiewicz em 1989 se baseou em ornamentação de conídios e recomendou alterações na taxonomia da seção *Nigri*, sugerindo dezesseis taxa. Também apresentou uma nova proposta para o “complexo *A. niger*”, baseando-se na observação da ornamentação conidial através de microscopia eletrônica de

varredura, descrevendo dois padrões básicos de ornamentações: verrugosos e equinulados. A autora sugeriu, assim, a divisão do complexo em três espécies: *A. acidus*, *A. citricus* subdividida em variedades (*A. citricus* var. *acidus* e *A. citricus* var. *pallidus*) e *A. niger*, por sua vez subdividida em seis variedades (*A. niger* var. *niger*, *A. niger* var. *tubingensis*, *A. niger* var. *phoenicis*, *A. niger* var. *pulverulentus*, *A. niger* var. *awamori* e *A. niger* var. *ficuum*).

Nos últimos anos, varias ferramentas bioquímicas e abordagens moleculares diferentes têm sido utilizadas para desenvolver métodos rápidos e confiáveis para a identificação de *Aspergillus* de coloração preta (ABARCA, 2004). A necessidade de identificar corretamente as espécies desse grupo induziu a realização de uma série de estudos baseados em marcadores de DNA com a finalidade de esclarecer a confusa taxonomia da seção *Nigri*.

Kusters-van Someren et al. (1991) analisaram os perfis de PCR-RFLP de rDNA de vinte e três isolados de *A. niger* e observaram dois padrões distintos com a enzima de restrição *SmaI*. Os autores propuseram que os perfis obtidos caracterizassem espécies, denominadas *A. niger* e *A. tubingensis*. Estes dados posteriormente foram confirmados por Mégnégneau et al. (1993). Mégnégneau et al. (1993) e Visser et al. (1996) puderam distinguir *A. japonicus* e *A. aculeatus* digerindo o rDNA com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI-SalI*. Baseados em RFLPs e considerando as enzimas de restrição utilizadas, Parenicová et al. (1997; 2000) puderam distinguir os referidos taxa. Técnicas como RFLP de rDNA, DNA mitocondrial (mtDNA) e análises de RAPD, possibilitam diferenciar claramente *A. carbonarius* dos demais *Aspergillus* pretos (PARENICOVÁ et al., 2000, 2001; VARGA et al., 2000). Parenicová et al. (2000), separaram facilmente *A. carbonarius* de outras espécies de *Aspergillus* que produzem esporos pretos através de seqüências de nucleotídeos de rDNA, visto que, de 18 a 51 diferenças entre pares de bases separam *A. carbonarius* dos demais taxa.

Analisando fungos do “complexo *A. niger*” através de perfis de RFLP, Varga et al. (1994) confirmaram os perfis encontrados pelos dois autores mencionados acima e descreveram um terceiro perfil. Este último perfil descrito por Varga et al. (1994) foi encontrado para seis linhagens isoladas de solos brasileiros. Esses isolados foram posteriormente descritos como *A. brasiliensis* (Parenicová, 2001). O “complexo *A. niger*” foi então dividido em quatro espécies morfologicamente idênticas,

denominadas *A. niger*, *A. foetidus*, *A. tubingensis* e *A. brasiliensis* (Parenicová et al., 2001).

Accensi et al. (1999), seqüenciaram a região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de isolados de *A. niger* e *A. tubingensis*. Embora as seqüências fossem similares, os autores encontraram uma região alvo para a enzima de restrição *RsaI* na posição 75 da seqüência de *A. niger* e a sua ausência na seqüência de *A. tubingensis*. Deste modo, dois padrões de RFLP foram descritos (N e T). No padrão N (que apresentava dois fragmentos, um de 519 bp e outro de 76 bp), agruparam-se isolados com o mesmo padrão que *A. niger*, enquanto para o padrão T (o qual mantinha o perfil com um fragmento de 595 bp), agrupavam-se isolados com padrão igual a *A. tubingensis*. Pode ser observado também que *A. foetidus* apresentou perfil de restrição com *RsaI* tipo T, ao passo que o isolado *A. brasiliensis* mostrou padrão N. De acordo com a revisão de Abarca et al. (2004) a análise de seqüências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2 das espécies propostas para o “complexo *A. niger*” mostra um pequeno número de variações pontuais entre as espécies. Somente três nucleotídeos diferenciam *A. niger* de *A. tubingensis*. *Aspergillus foetidus* e *A. tubingensis* são separados por apenas dois nucleotídeos, ao passo que cinco foram as diferenças entre *A. niger* e *A. foetidus*.

Dentre as espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri* bisseriadas, *A. helicothrix*, *A. ellipticus* e *A. heteromorphus* são espécies incomuns, pois existe apenas um isolado de cada espécie no “International Culture Collections”. *Aspergillus helicothrix* apresenta como características, produção de escleródios de tamanhos grandes e coloração marrom; *A. ellipticus* tem conídios elipsoidais e notavelmente equinulados (ABARCA et al. 2004) e *A. heteromorphus* apresenta descrições de características muito variáveis (ABARCA et al. 2004). Parenicová et al. (2000) relatam que seqüências de nucleotídeos das regiões ITS de *A. ellipticus* e *A. heteromorphus* são altamente semelhantes, apresentando apenas seis nucleotídeos diferentes. Baseando-se em análises filogenéticas de dados moleculares e em características morfológicas e culturais, Varga et al. (2003) sugeriram que à seção *Nigri* pertencem as espécies: *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. ellipticus*, *A. carbonarius*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. japonicus*, *A. niger* e *A. tubingensis*. Uma vez que *A. brasiliensis*, *A. foetidus*, *A. niger* e *A. tubingensis* são morfologicamente indistinguíveis, estas quatro espécies pertencem ao “complexo *A. niger*”. Um importante trabalho publicado por Samson et al. (2004) sugere quinze taxa para a seção *Nigri*: *A.*

aculeatus, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricaensis*, *A. ellipticus*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger* e *A. vadensis*. Estes autores sugeriram pela primeira vez as novas espécies *A. costaricaensis*, *A. lacticoffeatus*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger*. Dados moleculares das seqüências de nucleotídeos das regiões ITS e β -tubulina mostram que *A. vadensis* é altamente similar às espécies, *A. tubingensis* e *A. foetidus*.

A seguir apresenta-se uma tabela contendo a lista de isolados considerados por cada autor mencionado nessa revisão.

Tabela 1. Espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* de acordo com diferentes autores.

Raper e Fennell (1965)	Al-Musallam (1980)	Kozakiewicz (1989)	Análise de RFLP*	Samson et al. (2004)
<i>A. japonicus</i>	<i>A. japonicus</i> var <i>japonicus</i>	<i>A. japonicus</i>	<i>A. japonicus</i>	<i>A. japonicus</i>
<i>A. aculeatos</i>	<i>A. japonicus</i> var <i>aculeatos</i>	<i>A. atroviolaceus</i>	<i>A. aculeatos</i>	<i>A. aculeatus</i>
<i>A. carbonarius</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. carbonarius</i> <i>A. fonsecaeus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. carbonarius</i>
<i>A. heteromorphus</i>	<i>A. heteromorphus</i>	<i>A. heteromorphus</i>	<i>A. heteromorphus</i>	<i>A. heteromorphus</i>
<i>A. ellipticus</i>	<i>A. ellipticus</i> <i>A. helicothrix</i>	<i>A. ellipticus</i> <i>A. helicothrix</i>	<i>A. ellipticus</i>	<i>A. ellipticus</i> <i>A. sclerotioniger</i> <i>A. homomorphus</i>
Complexo A. niger				
<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> var <i>niger</i>	<i>A. niger</i> var <i>niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i> var <i>niger</i> f. <i>Hennebergii</i>	<i>A. niger</i> var <i>tubingensis</i>	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. tubingensis</i>
<i>A. phoenicis</i>	<i>A. niger</i> var <i>phoenicis</i>	<i>A. niger</i> var <i>phoenicis</i>	<i>A. foetidus</i>	<i>A. foetidus</i>
<i>A. pulverulentus</i>	<i>A. niger</i> var <i>phoenicis</i> f. <i>pulverulentus</i>	<i>A. niger</i> var <i>pulverulentus</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. brasiliensis</i> (Varga et al 2007)
<i>A. awamori</i>	<i>A. niger</i> var <i>awamori</i>	<i>A. niger</i> var <i>awamori</i>		<i>A. costaricaensis</i>
<i>A. ficuum</i>	<i>A. niger</i> var <i>nanus</i>			<i>A. lacticoffeatus</i>
<i>A. foetidus</i>	<i>A. niger</i> var <i>usamii</i>	<i>A. niger</i> var <i>ficuum</i>		<i>A. piperis</i>
<i>A. foetidus</i> var. <i>pallidus</i>	<i>A. niger</i> var <i>intermedius</i>	<i>A. citrus</i> var <i>citrus</i>		<i>A. vadensis</i>
<i>A. foetidus</i> var. <i>acidus</i>	<i>A. foetidus</i>	<i>A. acidus</i> <i>A. citrus</i> var <i>pallidus</i>		<i>A. ibericus</i> (Serra et al. 2006) <i>A. uvarum</i> (Perrone et al. 2008)

Fonte: Perrone et al, 2007. *Resultados de várias analyses de RLFP por diferentes autores: Kusters-van Someren et al. (1991); Megnegneu et al. (1993); Varga et al. (1993, 1994); Accensi et al. (1999) e Parenicova et al. (1997, 2001).

Após o trabalho de Samson et al. (2004), uma outra espécie da seção *Nigri* foi descrita por Serra et al. (2006). *Aspergillus ibericus* foi isolado de uvas e/ou frutas secas da Espanha e Portugal. Os autores relatam que isolados desta espécie se assemelham morfológicamente a *A. carbonarius*. Esta espécie possui características morfológicas que permitem distingui-la de outras espécies da seção *Nigri*, particularmente em relação ao tamanho dos conídios (5 a 7 µm). A confirmação deste novo taxon é suportada com base em análises de seqüências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e parte do gene da calmodulina, além da análise de padrões gerados pela técnica de AFLP (análise de polimorfismo de fragmentos amplificados). Uma espécie nova do *Aspergillus* seção *Nigri*, *Aspergillus uvarum*, foi descrita por Perrone et al, 2008. Esta espécie pode ser diferenciada dos outros *Aspergillus* pretos com base em ITS, no gene β -tubulina, seqüências do gene da calmodulina e análises de AFLP. *Aspergillus uvarum* é estreitamente relacionado com *Aspergillus aculeatus*, e foi isolado a partir de bagas de uva em Portugal, Itália, França, Israel, Grécia e Espanha. Silva (2009), propos uma nova espécie da Seção *Nigri* isolada de uma caverna brasileira, denominada de *Aspergillus caveniger*. Esta espécie se assemelha a *A. costaricensis*.

Nos últimos anos técnicas baseadas em DNA mostram sem qualquer dúvida o elevado grau de variabilidade dos membros do complexo *A. niger*. Tais estudos são uma ferramenta muito valiosa na identificação de espécies desse grupo.

CAPÍTULO 2
ANÁLISE MORFOLÓGICA, PATOLÓGICA E IDENTIFICAÇÃO
MOLECULAR DE *Aspergillus* ASSOCIADOS AO SISAL

RESUMO

Santos, P. O. Análise morfológica, patológica e identificação molecular de *Aspergillus* associados ao sisal.

Nos últimos dez anos, a produção de sisal no sertão da Bahia vem declinando devido à ocorrência da podridão vermelha do caule. *Aspergillus niger* foi identificado como o causador da doença na Bahia e Paraíba. Existem diversas espécies de *Aspergillus* semelhantes e algumas são indistinguíveis de *A. niger* através do uso de caracteres morfológicos. Por serem difíceis de serem distinguidas com base em morfologia, essas espécies fazem parte do “complexo *A. niger*”. Para a identificação das espécies de *Aspergillus* associadas ao sisal foram obtidas sequências de um fragmento do gene β -tubulina de 91 isolados. Além disso, as características morfológicas e a patogenicidade dos isolados em sisal foram estudadas. As espécies *A. niger*, *A. foetidus*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. aculeatus*, e *A. alabamensis* foram encontradas em plantas de sisal e em solo da rizosfera dessas plantas. Foi confirmada a patogenicidade de *A. niger* em sisal, e de outras espécies filogeneticamente próximas a *A. niger*. As espécies *A. foetidus*, *A. tubingensis* e *A. brasiliensis* são constatados pela primeira vez como potenciais patógenos da podridão vermelha do sisal.

Palavras-chave: Podridão vermelha, Análise morfológica, β -tubulina, Identificação molecular, Complexo *A. niger*, Etiologia.

ABSTRACT

Santos, P. O. Morphological and pathological analyses and molecular identification of *Aspergillus* associated to sisal.

Over the past ten years sisal production is declining in the semi-arid region of Bahia state due to a disease known as red rot. *Aspergillus niger* was identified as the aethiological agent of the disease in Bahia and Paraíba states. There are several species of *Aspergillus* morphologically indistinguishable from *A. niger*. Because of their morphological similarity, these species belong to the aggregate *A. niger*. To identify the species of *Aspergillus* associated to sisal, sequences of a fragment of the β -tubulin gene was obtained for 91 isolates. Furthermore, morphological analyses and pathogenicity tests were conducted on these isolates. The species *A. niger*, *A. foetidus*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. aculeatus*, and *A. alabamensis* were found in association with soil and sisal plants. The pathogenicity of *A. niger* and other phylogenetically-related species was confirmed. The species *A. foetidus*, *A. tubingensis* and *A. brasiliensis* are reported for the first time as potential agents of sisal red rot disease.

Key-words: Sisal red rot disease, Morphological analyses, β -tubulin, Molecular identification, Aggregate *A. niger*, Aethiology.

INTRODUÇÃO

O sisal (*Agave sisalana*) é originário da península de Yucatan, no México e adaptou-se muito bem as regiões semiáridas do nordeste brasileiro onde é cultivado em largas extensões. O Estado da Bahia é o maior produtor, contribuindo com aproximadamente 94% da produção nacional (IBGE, 2004). O sisal representa o segundo produto na pauta de exportações agrícolas baianas, tendo uma grande importância social por empregar aproximadamente 700 mil trabalhadores, em uma das regiões mais carentes do país (IBGE, 2010).

Nos últimos dez anos, a produção de sisal no sertão da Bahia vem declinando devido à ocorrência da podridão vermelha do caule (SINDIFIBRAS, 2006). Na literatura científica brasileira e mundial, dispõe-se de poucas informações acerca das doenças que incidem sobre a cultura do sisal. Nos últimos anos, nos municípios produtores do Estado da Bahia, cuja economia é baseada na exploração desta cultura, tem-se observado elevada devastação dos plantios de sisal devido a esta doença, que resulta na morte da planta e perda da qualidade da fibra. A doença induz o aparecimento dos seguintes sintomas: coloração vermelha que se estende do caule para a base das plantas, com amarelecimento das folhas. A planta infectada fica amarelada e murcha, o tronco apodrece e se desprende facilmente do solo, levando a planta à morte (COUTINHO et al., 2006). Na Bahia, foi constatada pela primeira vez por pesquisadores da Embrapa Semi-Árido e EBDA, na fazenda Mandacaru, município de Santa Luz, em um plantio comercial de 500 hectares de sisal (COUTINHO et al., 2006). *Aspergillus niger* foi isolado de plantas doentes na Bahia e Paraíba, sendo a patogenicidade da espécie confirmada (COUTINHO et al., 2006; SOARES et al., 2006). Entretanto, em todos estes casos, a identificação do patógeno foi feita somente com base em características morfológicas. Atualmente, sabe-se que existem diversas espécies de *Aspergillus* semelhantes e algumas são indistinguíveis de *A. niger* através do uso de caracteres morfológicos (GIRAUD et al., 2007). Por serem extremamente difíceis de serem distinguidas com base em morfologia, essas espécies fazem parte do “complexo *A. niger*”. Ferramentas moleculares tais como seqüenciamento de genes que codificam proteínas, têm sido aplicadas para resolver questões taxonômicas (GEISER et al., 2007). Para o gênero *Aspergillus* seqüências de β -tubulina e calmodulina são utilizadas com frequência

(FRISVAD et al., 2004; SAMSON et al., 2004). Portanto não é possível afirmar com certeza que a espécie *A. niger* é o agente etiológico da podridão vermelha do sisal baseando-se apenas em características morfológicas. A correta identificação do agente etiológico e informações sobre a diversidade genética são importantes para programas de melhoramento visando resistência à doença e para a seleção de variedades resistentes.

O trabalho objetivou, obter um número significativo de isolados de *Aspergillus* spp. da região sisaleira, verificar sua patogenicidade ao sisal, e fazer a identificação do patógeno com base em métodos moleculares, resultando na identidade do agente etiológico, contribuindo assim, para a aquisição de conhecimentos sobre esta doença, que ainda não existem na literatura científica.

MATÉRIAS E MÉTODOS

Isolamento de *Aspergillus*

Foi realizado o isolamento de *Aspergillus* a partir de amostras de caule, folha e raiz de plantas doentes de sisal, de solo e do ar, coletadas em dezesseis municípios da Região Sisaleira da Bahia: Araci, Barrocas, Campo Formoso, Capela do Alto Alegre, Conceição do Coité, Firmino da Costa, Gavião, Jacobina, Miguel Calmon, Mirangaba, Ouro-lândia, Retirolândia, Riachão do Jacuípe, São Domingos, Valente e Várzea Nova. Também foram obtidos isolados do município de Cruz das Almas, município que não está incluído na região sisaleira.

Para o isolamento de *Aspergillus* de plantas doentes, pedaços do tecido da planta com aproximadamente 2 cm² foram retirados, desinfestados primeiramente com álcool 70 % e posteriormente com hipoclorito de sódio 1 % por 2 min em cada e em seguida lavados duas vezes com água destilada esterilizada e transferidos para placas de Petri com meio BDA salino contendo 6 % de NaCl (BERJAK, 1984), que é semi-seletivo para *Aspergillus*. As placas com os fragmentos do tecido da planta já desinfestados, foram incubadas a 28 °C por cinco dias. Os fungos crescidos ao redor ou em cima dos fragmentos foram purificados. Os isolados do ar foram obtidos utilizando-se placas de Petri com meio de cultura BDA salino. Estas foram levadas ao campo, e abertas pelo período de 10 min. No laboratório, foram incubadas a temperatura ambiente por cinco dias. Os fungos crescidos no meio de cultura foram purificados. Para obter os isolados de *Aspergillus* das amostras de solo, utilizou-se a técnica de diluição seriada. Foi feita a diluição até 10⁻³ com solução salina (0,8 % NaCl). Então foi feito o plaqueamento, em duplicata, em meio BDA salino de todas as diluições realizadas. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por cinco dias, e então os fungos crescidos de colônias isoladas foram repicados para novas placas, obtendo culturas puras. Posteriormente, todos os isolados purificados, foram preservados em água destilada e óleo mineral, formando assim uma coleção de culturas. Um total 262 isolados de *Aspergillus* sp. foram obtidos da Região Sisaleira da Bahia e do município de Cruz das Almas (Tabela 1). Os isolados obtidos foram cultivados em meio BD líquido, liofilizados e preservados a -20°C para a posterior extração de DNA.

Tabela 1. Origem de isolados de *Aspergillus* obtidos de amostras do solo, do ar e de plantas doentes da região sisaleira.

Município	Nº de isolados	Material de origem
Araci	29	Folha, caule, solo
Barrocas	37	Folha, caule, solo
Campo Formoso	37	Folha, caule, raiz e solo
Campo do Alto Alegre	2	Caule
Conceição do Coité	28	Folha, caule, raiz e solo
Cruz das Almas	10	Ar e solo
Gavião	2	Caule
Jacobina	9	Folha, raiz e solo
Miguel Calmon	6	Caule e solo
Mirangaba	6	Solo
Ourolândia	4	Folha e solo
Retirolândia	52	Caule, folha, raiz e solo
Riaçãõ de Jacuípe	4	Folha e caule
São Domingos	9	Folha, raiz e solo
Valente	21	Folha, raiz, caule e solo
Várzea Nova	6	Caule, folha, raiz e solo
Total	262	

Extração e quantificação de DNA total

O DNA total dos isolados liofilizados foi extraído empregando-se o método proposto por Doyle e Doyle (1990) adaptado. Cerca de 100 mg de micélio foram macerados em nitrogênio líquido no cadinho com almofariz, e transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo 650 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaCl; 2 % CTAB; 1 % PVP; 0,2 % β-Mercaptoetanol; 50 µg.mL⁻¹ proteinase K). Os tubos foram misturados por inversão e incubados a 55°C por 1 hora em banho-maria, agitando-se a cada 15 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, e um volume 650 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foi adicionado. A mistura foi agitada manualmente por 2 min e em seguida centrifugada a 12.000 g por 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, e um volume igual de isopropanol gelado (cerca de 600 µL) foi acrescentado. A solução foi incubada a -80 °C por 15 min. Posteriormente procedeu-se a centrifugação a 12.000 g por 5 min, descartando-se a fase líquida. O DNA que já se encontrava aderido ao fundo do tubo, foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70 % e centrifugando a 12 000 g por 3 min. O *pellet*

foi ressuspenso em 50 µL de TE (10mM Tris HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA), contendo 10 µg/mL RNase. A concentração do DNA foi estimada por fluorimetria (DNA Quant 2000 Fluorometer, Amersham Biociences) ou por meio da comparação com padrões de DNA λ com concentração conhecida em um gel de agarose 0,8%. A concentração de DNA das amostras foi diluído para 5 ng/µL e usado para as reações posteriores.

Variabilidade genética dos isolados de *Aspergillus*

Seqüências repetidas em tandem (SSR), também conhecidas como microssatélites, foram utilizadas visando estudar a variabilidade genética em 234 isolados de *Aspergillus*. Esse trabalho foi realizado em uma pesquisa de doutorado (QUEIROZ, J.R., dados não publicados) em conexão com este trabalho. Seis pares de *primers*, desenvolvidos especificamente para *A. niger*: ACNM1, ACNM2, ACNM3, ACNM5, ACNM6 e ACNM7 (ESTEBAN et al., 2005) foram utilizados.

Após a realização da técnica de microssatélite, foram obtidos mais 28 novos isolados de *Aspergillus*. Para o estudo da variabilidade genética destes novos isolados foi utilizada a técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Foram testados 10 primers, sendo os três melhores selecionados: A1, A6 (ABED, 2008) e OPA4 (PEKAREKP et al., 2006). Para a realização da PCR foram utilizados 25 ng de DNA para uma reação de 25 µL, contendo: 2,5 µM de tampão (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl); 2,0 µL de dNTPs (2,5 mM); 2,0 µL do *primer* (10 pmol/µL); 2,0 µL MgCl₂ (50 mM), 0,3 µL Taq DNA polymerase (5 U/µL), 2 µL DNA (5 ng/µL) e 14,2 µL de água miliQ autoclavada. As amplificações foram feitas em termociclador (peqSTAR universal gradiente), empregando-se o programa com ciclo inicial de 92 °C por 4 min, seguido de 40 ciclos de 40 s a 92 °C, 1 min a 54 °C, 2 min a 72 °C e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Após o processo de amplificação, os produtos de RAPD foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2 %, em tampão TAE. Os géis foram corados com brometo de etídio 1 µg/mL e fotografados em fotodocumentador Locus biotechnology.

O programa FREE TREE (HAMPL et al., 2001) foi utilizado para a construção do dendograma empregando-se as distâncias de Nei e Li e o método Neighbor-

joining. A consistência dos nós foi obtida com o método de *bootstraps* utilizando-se 1.000 reamostragens.

Patogenicidade dos isolados de *Aspergillus*

Foram utilizados os 91 isolados de *Aspergillus* representando todos os grupos genéticos definidos pelas análises de SSR e RAPD. Cada isolado de *A. niger* selecionado foi multiplicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA, à temperatura ambiente. Após 10 dias de incubação, acrescentou-se 20 mL de água destilada esterilizada e uma gota de Tween 20[®] em cada placa e, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, as colônias foram raspadas e a suspensão contendo esporos e micélio do fungo foi filtrada em gaze esterilizada e armazenada a 4 °C. O ajuste da concentração de esporos na suspensão filtrada foi realizado com a contagem de esporos em câmara de Neubauer sob microscópio ótico (Zeiss Axiostar) e ajuste da diluição com água destilada esterilizada para 10⁷ conídios/mL.

Mudas foram obtidas por meio do plantio de bulbilhos de sisal colhidos no município de Retirolândia e plantados no campo. Quatro meses após o plantio as mudas foram retiradas da área experimental e tiveram suas raízes lavadas. A porção do caule das mudas foi perfurada com ferimentos padronizados (duas perfurações equidistantes, com 2 cm de profundidade e 1 mm de diâmetro, realizadas com uma agulha). Em seguida, 100 µL da suspensão (10⁷ conídios/mL) foi inoculada nos ferimentos em cada muda, com exceção das mudas utilizadas como controle, nas quais foi inoculada água destilada esterilizada. Após a inoculação das mudas, realizou-se o plantio destas em sacos de polietileno perfurados, com dimensões de 21 cm de altura x 14,5 cm de largura contendo 1 dm³ de solo. Trinta dias após o plantio das mudas foi realizada a avaliação da incidência da doença, colhendo e cortando-se a muda transversalmente, 0,5 cm acima do ponto de lesão, e observando-se a presença do sintoma de podridão vermelha no caule. Os tratamentos consistiram de mudas inoculadas com 91 isolados diferentes e com água (controle), totalizando 92 tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições.

Análise Morfológica

Os 91 isolados selecionados por meio de estudos de variabilidade genética com SSR e RAPD foram transferidos para placas de Petri contendo Czapeck Yeast Ágar (CYA) e ao MEA (Ágar Extract Malt) e incubados a 25 °C, por sete dias. A identificação destes isolados foi realizada de acordo com Klich (2002), Horn (1997), Peterson et al. (2001), Pildain et al. (2008) e Samson et al. (2007). Para a análise macroscópica foram utilizados os seguintes parâmetros: diâmetro, coloração e o reverso da colônia. Para avaliação das características microscópicas foram retiradas estruturas de placas com colônias esporulantes de *Aspergillus* após a lavagem com álcool 50 % para eliminar o excesso de esporos. As lâminas foram montadas com corante azul de lactofenol e observadas em microscópio de luz para observação e determinação das seguintes características: comprimento e forma das vesículas; forma, textura e tamanho dos conídios; organização das métulas e fiáldes (verificando se a estrutura é unisseriada ou bisseriada).

Com os resultados obtidos foi realizada uma análise de componentes principais (ACP) utilizando o programa XLSTAT – pro 2011 da Microsoft, buscando o agrupamento dos isolados utilizando o conjunto de características morfológicas. Para realizar a ACP foram utilizadas 9 variáveis: Fator 1, diâmetro de conídios; Fator 2, textura dos conídios; Fator 3, forma dos conídios; Fator 4, tipo de vesícula; Fator 5, forma da vesícula; Fator 6, diâmetro da vesícula; Fator 7, diâmetro da colônia em CYA; Fator 8, coloração da colônia em CYA e Fator 9, diâmetro da colônia em MEA.

Amplificação e sequenciamento de um fragmento do gene β -tubulina

Foram utilizados 91 isolados de *Aspergillus* para a identificação ao nível de espécie (Tabela 2). O DNA genômico dos isolados foi submetido à amplificação de um fragmento de aproximadamente 520 pb do gene que codifica para β -tubulina. Os primers Bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT TTC 3') e Bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3') descritos por Glass e Donaldson (1995) foram utilizados nas reações de amplificação. Para a realização da PCR em 25 μ L utilizou-se 2,5 μ L de tampão (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl); 2,0 μ L de dNTPs (2,5 mM); 1 μ L de cada primer (10 pmol/ μ L); 2,0 μ L MgCl₂ (50 mM), 0,3 μ L Taq DNA polymerase (5 U/ μ L), 2 μ L DNA (5 ng/ μ L) e 14,2 μ L de água miliQ autoclavada. As

amplificações foram feitas em termociclador (peqSTAR universal gradiente), empregando-se o programa com ciclo inicial de 94 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 58 °C, e 2 min a 72 °C; e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Após a amplificação as amostras foram submetidas a reações de sequenciamento.

Os produtos da PCR foram sequenciados através do método de Sanger et al. (1977) utilizando-se dos mesmos primers já descritos para a obtenção dos respectivos fragmentos. As reações foram feitas em um volume final de 10 µL, contendo 2,5 µL de DNA da amostra (5 ng/µL), 0,4 µL de primer (10 pM/µL) e 1,0 µL de BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems), 2,0 µL do tampão de seqüenciamento 5X (Applied biosystems) e 4,1 µL de água ultrapura. As amplificações foram realizadas em termociclador programado para uma desnaturação inicial a 96 °C por 1 min, seguida de 35 ciclos de três etapas: desnaturação (96 °C, 10 seg), anelamento (50 °C, 5 seg) e extensão (65 °C, 4 min). Após a amplificação, a precipitação foi realizada com 40 µL de isopropanol 65 %, centrifugando a 4.000 rpm por 40 min. Após a precipitação o DNA foi lavado com 200 µL de etanol 60 %. O DNA foi ressuspendido em 10 µL de formamida e aquecido a 93 °C por 3 min e resfriado rapidamente. Em seguida, foi submetido à eletroforese em seqüenciador do tipo ABI prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem). A condição de injeção das amostras foi de 2 Kv por 30 seg. A condição de eletroforese foi de 12 Kv por 120 min.

Caracterização molecular e análises filogenéticas

A edição e montagem das sequências foi feita com o programa Bioedit v.7.0.9 (HALL, 1999). Para realizar a identificação molecular, o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) foi usado para comparar as sequências obtidas de cada isolado com aquelas encontradas nos bancos de dados públicos. Sequências dos bancos de dados públicos foram incluídas nas análises para fins de comparação.

O alinhamento das sequências foi realizado no programa MAFFT versão 6.0 utilizando a estratégia FFT-NS-i (KATO et al., 2002). As análises filogenéticas foram feitas com o programa Paup 4.0, utilizando o modelo de substituição TVM+I selecionado no programa MrModeltest 2.2 (NYLANDER, 2004). Foram geradas árvores filogenéticas com o método de Máxima Parcimônia (PAR), Máxima

Verossimilhança (ML) e Neighbor-joining (NJ) com análises de *bootstrap* com 1.000 repetições. As árvores foram enraizadas com a sequência de *A. flavus*. As árvores foram visualizadas no programa TreeView (PAGE, 1996).

RESULTADOS

Variabilidade genética dos isolados de *Aspergillus*

Dos 262 isolados de *Aspergillus* obtidos da Região Sisaleira e do município de Cruz das Almas, 234 tiveram sua diversidade estudada com a utilização de seqüências repetidas em tandem (SSR). Dentre esses, 84 isolados representando todos os grupos genéticos definidos nas análises de SSR (QUEIROZ, J. R., dados não publicados) foram selecionados para a identificação das espécies (tabela 2). Outros 28 isolados, por terem sido obtidos posteriormente, foram estudados por RAPD. A análise de RAPD mostrou a formação de cinco grupos, apesar dos valores de bootstrap terem sido baixos (figura 1). Para representar todos os grupos, foram selecionados 7 isolados e adicionados aos estudos de identificação. Portanto, 91 isolados, sendo 84 provenientes da análise com microsatélites e 7 com RAPD, foram identificados ao nível de espécie por meio de análises filogenéticas, morfológicas e de patogenicidade.

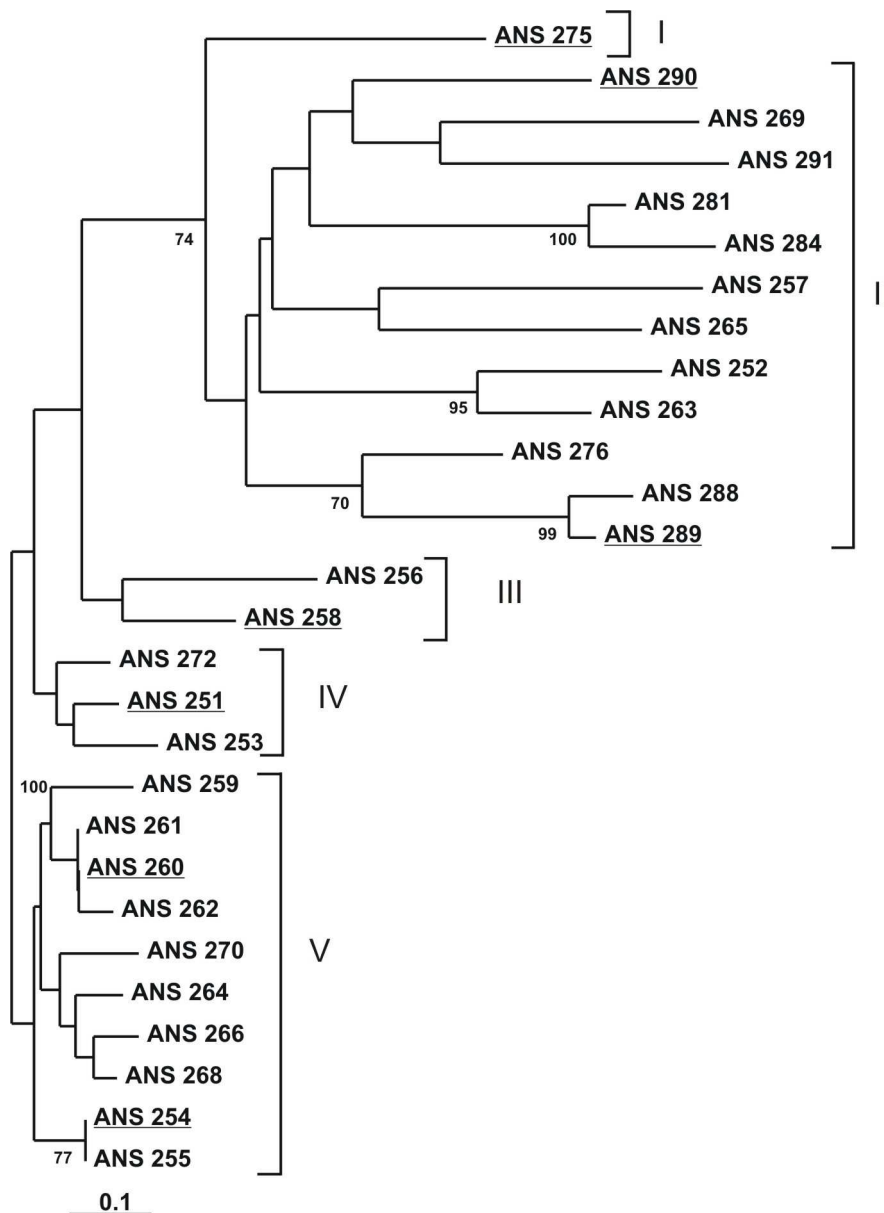


Figura 1. Dendrograma de *Aspergillus* sp. gerado com as distâncias calculadas de acordo com Nei & Li e com método de Neigbor-Joining. Foram utilizados dados de RAPD com três *primers* e 28 isolados de *Aspergillus*. Valores de *bootstrap* superiores a 70 % são apresentados. Os isolados sublinhados foram selecionados para a identificação ao nível de espécie e patogenicidade.

Tabela 2. Isolados de *Aspergillus* selecionados a partir de análises da variabilidade genética por meio de SSR e RAPD para a identificação ao nível de espécie. (Continua)

Isolados	Município	Origem	Isolados Adicionais**	Isolados*	Município	Origem	Isolados Adicionais**
ANS1	Valente	Caule	4	ANS 168	Retirolândia	Raiz	0
ANS 5	Valente	Ar	1	ANS 171	Valente	Solo	0
ANS 8	Campo formoso	Folha	0	ANS 172	Barrocas	Solo	0
ANS12	Mirangaba	Solo	0	ANS 173	São Domingos	Solo	0

Isolados	Município	Origem	Isolados Adicionais**	Isolados*	Município	Origem	Isolados Adicionais**
ANS 14	Cruz das Almas	Ar	0	ANS 177	Conceição do Coité	Caule	4
ANS 18	Araci	Caule	22	ANS 181	Valente	Solo	0
ANS 20	Campo Formoso	Folha	0	ANS 182	Retirolândia	Folha	3
ANS 21	Campo Formoso	Folha	9	ANS 189	Conceição do Coité	Folha	1
ANS 32	Araci	Folha	0	ANS 191	Barrocas	Solo	1
ANS 33	Coité	Caule	0	ANS 192	Araci	Solo	1
ANS 34	Barrocas	Caule	7	ANS 193	Valente	Solo	0
ANS 36	Retirolândia	Solo	0	ANS 195	Araci	Folha	6
ANS 40	Araci	Folha	23	ANS 196	Retirolândia	Folha	5
ANS 51	Campo Formoso	Folha	8	ANS 198	Barrocas	Caule	0
ANS 55	São Domingos	Caule	0	ANS 199	Retirolândia	Caule	0
ANS 74	Conceição do Coité	Folha	3	ANS 200	Retirolândia	Folha	0
ANS 85	Ouroândia	Folha	1	ANS 201	Retirolândia	Folha	1
ANS 86	Barrocas	Folha	0	ANS 202	Araci	Caule	1
ANS 95	Jacobina	Raiz	0	ANS 207	Araci	Caule	2
ANS 99	Miguel Calmon	Solo	0	ANS 217	Araci	Caule	0
ANS 103	Campo Formoso	Solo	1	ANS 220	Araci	Folha	2
ANS 104	Barrocas	Solo	0	ANS 221	Araci	Caule	0
ANS 105	Conceição do Coité	Solo	1	ANS 224	Araci	Folha	0
ANS 108	Campo Formoso	Raiz	0	ANS 225	Conceição do Coité	Solo	4
ANS 112	Campo Formoso	Solo	0	ANS 226	Conceição do Coité	Solo	0
ANS 113	Barrocas	Solo	0	ANS 228	Araci	Estolão	1
ANS 118	Araci	Folha	17	ANS 229	Retirolândia	Estolão	0
ANS 123	Barrocas	Caule	1	ANS 230	São Domingos	Solo	0
ANS 124	Barrocas	Solo	0	ANS 232	São Domingos	Caule	0
ANS 128	Riachão de Jacuípe	Folha	0	ANS 235	Barrocas	Folha	0
ANS 134	Barrocas	solo	2	ANS 236	Barrocas	Folha	0
ANS 139	Valente	Folha	1	ANS 238	Barrocas	Folha	0
ANS 142	Barrocas	Solo	4	ANS 241	Retirolândia	Folha	0
ANS 147	Conceição do Coité	Folha	0	ANS 242	Retirolândia	Folha	0
ANS 148	Jacobina	Ar	0	ANS 244	Retirolândia	Folha	0
ANS 149	Varzea Nova	Caule	0	ANS 246	Retirolândia	Folha	2
ANS 150	Miguel Calmon	Folha	0	ANS 247	Retirolândia	Folha	0
ANS 152	Barrocas	Solo	0	ANS 248	Retirolândia	Folha	1
ANS 154	Jacobina	Solo	0	<u>ANS 251</u>	Valente	Folha	-
ANS 156	Miguel Calmon	Solo	1	<u>ANS 254</u>	Valente	Folha	-
ANS 158	Ouroândia	Solo	0	<u>ANS 258</u>	Valente	Solo	-
ANS 159	Mirangaba	Solo	0	<u>ANS 260</u>	Cruz das Almas	Ar	-
ANS 160	Varzea Nova	Caule	1	<u>ANS 275</u>	São Domingos	Solo	-
ANS 164	Barrocas	Raiz	1	<u>ANS 289</u>	Cruz das Almas	Solo	-
ANS 165	Conceição do Coité	Caule	0	<u>ANS 290</u>	Cruz das Almas	Solo	-
ANS 166	Retirolândia	Caule	1				-

* Isolados grifados foram selecionados com base em análises de RAPD. ** Número de Isolados adicionais agrupados pela técnica de microssatélites.

Patogenicidade dos isolados de *Aspergillus*

As mudas de sisal utilizadas como controle, inoculadas com água estéril, não apresentaram sintomas da doença (Figura 2). Dos 91 isolados inoculados no sisal, três não foram considerados patogênicos, pois não desenvolveram nenhum sintoma da podridão vermelha na planta. São eles: ANS 05, ANS 113, ANS 181. Todos os 88 isolados restantes foram considerados patogênicos, pois de 60 % a 100 % das repetições desenvolveram sintomas da podridão vermelha 30 dias após as inoculações.

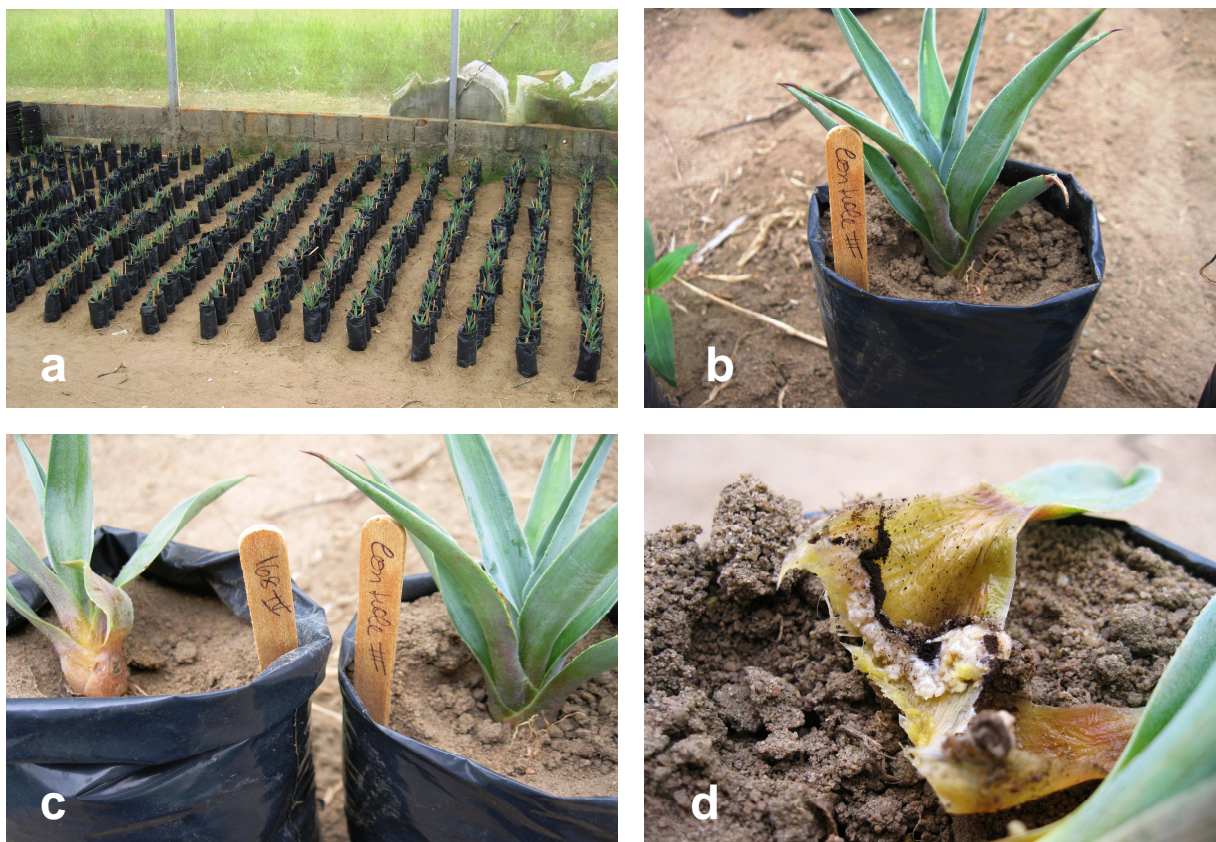


Figura 2. Patogenicidade de *Aspergillus* em mudas de sisal. Visão geral do experimento em casa-de-vegetação (a); Controle sem os sintomas da doença após 30 dias (b); Controle comparado com a planta inoculada com o isolado ANS 168 (c); Esporulação de *Aspergillus* sobre o tecido necrosado da planta com sintomas avançados da doença (d).

Análise morfológica

Foram observadas características macroscópicas e microscópicas dos 91 isolados estudados (tabela 3). Os isolados pertencentes à seção *Nigri* caracterizam-

se por apresentar conídios de coloração marrom-escuros a pretos, com estruturas dos conidióforos unisseriadas ou bisseriadas, vesículas esféricas e hifas hialinas ou levemente pigmentadas próximo ao ápice (KLICH e PITT, 1988 citados por SILVA, 2009). Quando os isolados foram crescidos em CYA, os pertencentes à seção *Nigri* apresentaram a coloração negra típica do grupo somente após dez dias de crescimento, enquanto que no meio MEA, a esporulação ocorreu mais rápido, antes de sete dias.

Tabela 3. Características culturais dos isolados da região sisaleira selecionados com base nos estudos de variabilidade genética. (Continua)

Isolados	Colônia em CYA 25°C			Colônia em MEA 25°C		
	Diâmetro da colônia (mm)	Cor	Cor do reverso	Diâmetro da colônia (mm)	Cor	Cor do reverso
ANS1	94-95	Marron escuro	Amarelo claro	90-93	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 5	80-83	Branco com conidióforos marrons	Amarelo ouro	93-95	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo
ANS 8	94-95	Marron escuro	Amarelo ouro	90-93	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS12	94-95	Marron escuro	Amarelo pálido	89-90	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 14	92-93	Marron escuro	Amarelo claro	52-60	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 18	87-89	Marron escuro	Amarelo claro	56-60	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 20	85-87	Marron escuro	Amarelo claro	80-82	Micélio branco com aspecto de algodão, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 21	77-80	Marron escuro	Amarelo claro	90-92	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 32	80-84	Marron escuro	Amarelo claro	55-60	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo
ANS 33	92-93	Branco com conidióforos marrons	Amarelo pálido	75-70	Micélio branco transparente, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 34	84-88	Marron escuro	Amarelo ouro	93-95	Micélio branco, esporos pretos.	Amarelo ouro
ANS 36	90-94	Branco com conidióforos marrons	Amarelo claro	93-95	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo
ANS 40	92-93	Marron escuro	Amarelo claro	60-62	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 51	95	Marron escuro	Amarelo ouro	47-50	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 55	87-89	Marron escuro	Amarelo claro	94-95	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 74	93-95	Marron escuro	Amarelo claro	80-85	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 85	95	Marron escuro	Amarelo claro	92-94	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 86	95	Marron escuro	Amarelo claro	64-62	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo

(Continua)

Colônia em CYA 25°C				Colônia em MEA 25°C		
Isolados	Diâmetro da colônia (mm)	Cor	Cor do reverso	Diâmetro da colônia (mm)	Cor	Cor do reverso
ANS 95	94-95	Branco com conidióforos marrons	Amarelo pálido	93-95	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 99	93-94	Branco com conidióforos marrons	Amarelo pálido	80-85	Micélio branco com aspecto de algodão, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 103	87-89	Branco com conidióforos marrons	Amarelo claro	93-95	Micélio branco com aspecto de algodão, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 104	93-95	Branco com conidióforos marrons	Amarelo pálido	94-95	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 105	85-86	Marron escuro	Amarelo claro	90-92	Micélio branco transparente, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 108	92-95	Marron escuro	Amarelo claro	93-95	Micélio branco transparente, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 112	92-93	Marron escuro	Amarelo ouro	90-92	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 113	95	Marron claro com conidióforos marron escuro	Marron claro com o centro Marron escuro	94-95	Micélio branco, esporos pretos	Transparente
ANS 118	80-85	Marron escuro	Amarelo claro	87-89	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 123	90-93	Marron escuro	Amarelo claro	80-84	Micélio branco com aspecto de algodão, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 124	94-95	Marron escuro	Amarelo claro	90-91	Micélio branco, esporos preto	Amarelo ouro
ANS 128	90-92	Marron escuro	Amarelo claro	90-91	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 134	94-95	Branco com conidióforos marrons	Amarelo pálido	80-84	Micélio branco, esporos preto	Amarelo claro
ANS 139	93-95	Branco com conidióforos marrons	Amarelo claro	95	Micélio branco transparente, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 142	94-95	Marron escuro	Amarelo claro	93-95	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 147	90-92	Marron escuro	Amarelo claro	60-62	Micélio branco, esporos preto	Amarelo
ANS 148	50-52	Marron escuro	Amarelo ouro	58-60	Micélio branco, esporos preto	Amarelo
ANS 149	56-60	Marron escuro	Amarelo ouro	58-60	Micélio branco, com aspecto de algodão, esporos pretos	Amarelo
ANS 150	86-90	Marron escuro	Amarelo ouro	90-93	Micélio branco, esporos preto	Amarelo ouro
ANS 152	93-95	Marron escuro	Amarelo claro	92-93	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 154	70-72	Branco	Amarelo ouro	74-77	Micélio branco com aspecto gelatinoso, esporos preto	Amarelo claro
ANS 156	93-95	Branco com conidióforos marrons	Amarelo pálido	91-94	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 158	82-86	Branco com conidióforos marrons	Amarelo claro	62-65	Micélio branco, com aspecto gelatinoso e esporos pretos	Amarelo claro
ANS 159	93-95	Marron escuro	Amarelo claro	89-91	Micélio branco, esporos preto	Amarelo ouro
ANS 160	90-92	Marron escuro	Amarelo ouro	93-95	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo ouro

Colônia em CYA 25°C				Colônia em MEA 25°C		
Isolados	Diâmetro da colônia (mm)	Cor	Cor do reverso	Diâmetro da colônia (mm)	Cor	Cor do reverso
ANS 164	80-82	Branco com conidióforos marrons	Amarelo pálido	91-93	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 165	95	Marron escuro	Amarelo claro	87-89	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 166	80-84	Marron escuro	Amarelo claro	78-91	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 168	94-95	Marron escuro	Amarelo claro	75-78	Micélio branco, esporos pretos	Branco transparente
ANS 171	91-93	Marron escuro	Amarelo claro	86-89	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 172	89-92	Marron escuro	Amarelo claro	79-81	Micélio branco com aspecto de algodão, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 173	92-95	Marron escuro	Amarelo claro	80-81	Micélio branco com aspecto de algodão, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 177	94-95	Marron escuro	Amarelo ouro	85-87	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 181	49-50	Rosa claro quase branco	Marron escuro	39-43	Rosa claro quase branco	Marron
ANS 182	75-77	Branco, com esporos pretos	Amarelo ouro	60-62	Micélio branco, esporos preto	Amarelo claro
ANS 189	66-70	Branco	Amarelo ouro	55-57	Micélio branco, com aspecto de algodão, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 191	75-78	Branco	Amarelo claro	60-62	Micélio branco, esporos preto	Amarelo
ANS 192	65-70	Branco, com esporos pretos	Amarelo ouro	63-65	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 193	78-80	Branco	Amarelo claro	50-53	Micélio branco, esporos preto	Amarelo ouro
ANS 195	64-69	Marron escuro	Amarelo ouro	68-71	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 196	76-80	Marron escuro	Amarelo ouro	93-95	Micélio branco, esporos preto	Amarelo ouro
ANS 198	70-72	Marron escuro	Amarelo ouro	75-80	Micélio branco transparente, esporos pretos	Amarelo
ANS 199	74-80	Marron escuro	Amarelo ouro	65-66	Micélio branco, esporos preto	Amarelo
ANS 200	74-79	Marron escuro	Amarelo claro	78-80	Micélio branco, esporos preto	Amarelo
ANS 201	85-87	Marron escuro	Amarelo claro	62-65	Micélio branco, esporos preto	Amarelo claro
ANS 202	88-90	Marron escuro	Amarelo claro	78-80	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 207	89-92	Marron escuro	Amarelo claro	78-81	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 217	65-70	Marron escuro	Amarelo ouro	68-69	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 220	67-70	Branco, com esporos pretos	Amarelo ouro	75-78	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 221	72-75	Marron escuro	Amarelo ouro	90-92	Micélio branco transparente, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 224	92-95	Marron escuro	Amarelo ouro	68-70	Micélio branco com aspecto de algodão, esporos pretos	Amarelo
ANS 225	70-72	Branco, com esporos pretos	Amarelo ouro	78-81	Micélio branco, com esporos pretos	Amarelo claro
ANS 226	48-50	Branco	Amarelo ouro	65-67	Micélio branco, com esporos pretos	Amarelo claro

(Fim)

Colônia em CYA 25°C				Colônia em MEA 25°C		
Isolados	Diâmetro da colônia (mm)	Cor	Cor do reverso	Diâmetro da colônia (mm)	Cor	Cor do reverso
ANS 228	95	Branco com conidióforos marrons	Amarelo pálido	92-93	Micélio branco, com esporos pretos	Amarelo claro
ANS 229	93-94	Branco com conidióforos marrons	Amarelo pálido	93-95	Micélio branco, esporos preto	Amarelo ouro
ANS 230	90-93	Branco com conidióforos marrons	Amarelo pálido	90-92	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 232	95-95	Marron escuro	Amarelo ouro	90-92	Micélio branco, esporos preto	Amarelo ouro
ANS 235	82-84	Branco	Amarelo claro	63-65	Micélio branco com aspecto gelatinoso, esporos preto	Branco
ANS 236	58-60	Branco	Amarelo ouro	60-65	Micélio branco, esporos preto	Amarelo claro
ANS 238	73-75	Branco	Amarelo ouro	78-80	Micélio branco, esporos preto	Amarelo claro
ANS 241	95-95	Marron escuro	Amarelo pálido	92-93	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 242	92-94	Marron escuro	Amarelo pálido	89-91	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 244	57-59	Branco	Amarelo pálido	65-67	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 246	73-75	Branco	Amarelo claro	58-60	Micélio branco, com aspecto de algodão, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 247	95	Branco com conidióforos marrons	Amarelo pálido	90-93	Micélio branco, esporos preto	Amarelo ouro
ANS 248	95	Branco com conidióforos marrons	Amarelo pálido	62-63	Micélio branco com aspecto gelatinoso, esporos preto	Branco
ANS 251	95	Marron escuro	Amarelo claro	89-92	Micélio branco trANSparente, esporos pretos	Branco transparente
ANS 254	95	Marron escuro	Amarelo claro	50-53	Micélio branco com aspecto de algodão, esporos pretos	Amarelo ouro
ANS 258	92-94	Branco com conidióforos marron	Amarelo pálido	75-78	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 260	80-83	Marron escuro	Amarelo claro	60-62	Micélio branco, esporos preto	Amarelo claro
ANS 275	90-92	Marron escuro	Amarelo ouro	85-89	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 289	83-85	Marron escuro	Amarelo ouro	78-81	Micélio branco, esporos pretos	Amarelo claro
ANS 290	95	Branco com conidióforos marrons	Amarelo pálido	95	Micélio branco com aspecto de algodão, esporos pretos	Branco transparente

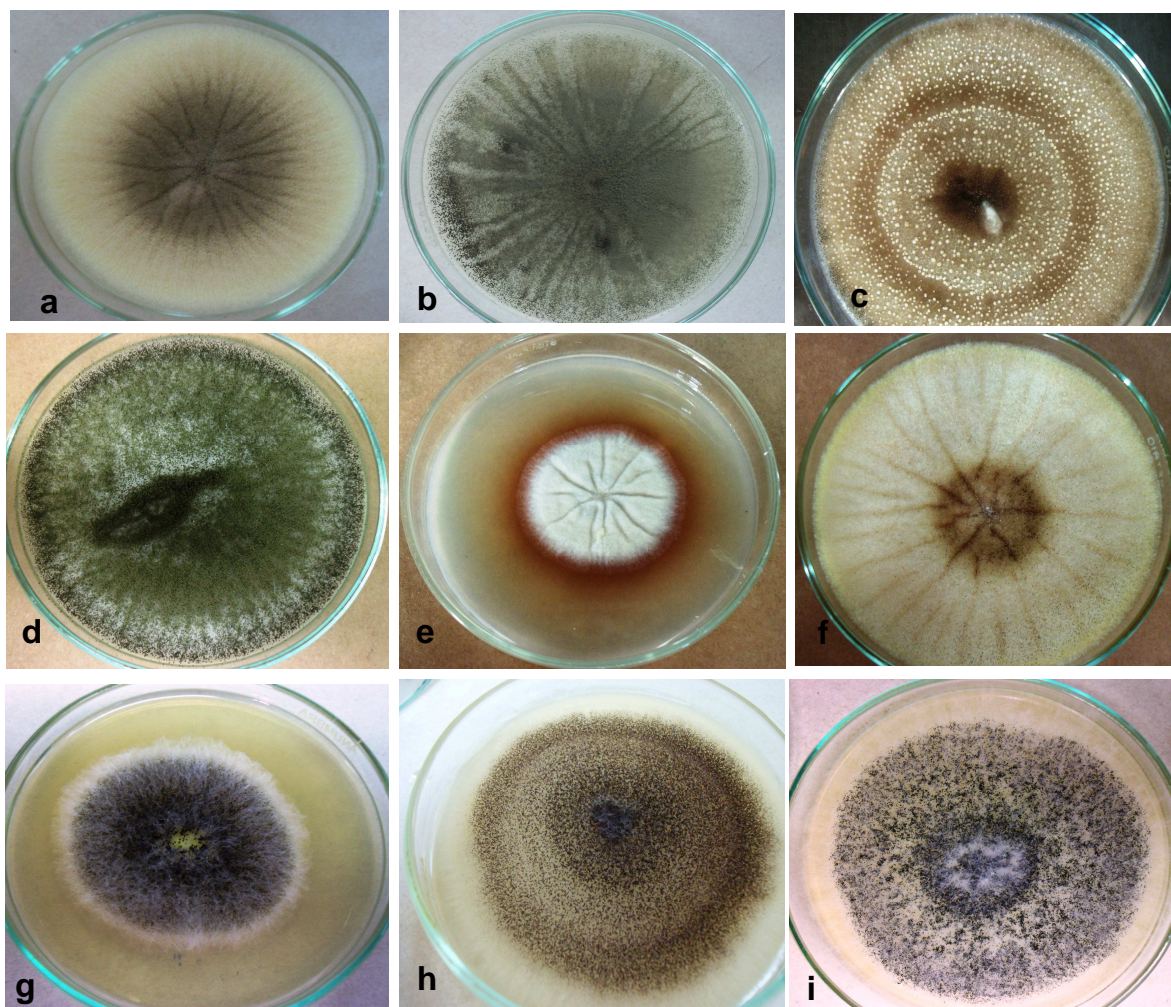


Figura 3. Colônias após sete dias de crescimento em meio CYA. ANS 05, *Aspergillus foetidus* (a); ANS 12, *Aspergillus tubingensis* (b); ANS 113, *Aspergillus aculeatus* (c); ANS 103, *Aspergillus niger* (d); ANS 181, *Aspergillus alabamensis* (e); ANS 275, *Aspergillus brasiliensis* (f). Colônias após sete dias de crescimento em meio MEA. ANS 103, *Aspergillus niger* (g); ANS 113, *Aspergillus aculeatus* (h); ANS 275, *Aspergillus brasiliensis* (i).

Tabela 4. Características microscópicas dos isolados obtidos da região sisaleira da Bahia, e selecionados a partir dos estudos de variabilidade genética. (Continua)

	Diâmetro de conídios (µm)	Textura dos conídios	Forma conídios	Organização das Fiálides	Forma da vesícula	Diâmetro vesícula (mm)
ANS1	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	75
ANS 5	4	espinhoso	globoso	bisseriado	globosa	60
ANS 8	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	125
ANS12	4	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	55
ANS 14	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	120
ANS 18	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	60
ANS 20	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	65
ANS 21	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	78
ANS 32	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	85
ANS 33	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	130

(Continua)

	Diâmetro de conídios (µm)	Textura dos conídios	Forma conídios	Organização das Fiárides	Forma da vesícula	Diâmetro vesícula (mm)
ANS 34	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	57,5
ANS 36	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	62,5
ANS 40	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	75
ANS 51	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	60
ANS 55	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	65
ANS 74	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	65
ANS 85	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	110
ANS 86	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	55
ANS 95	4	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	87
ANS 99	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	113
ANS 103	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	85
ANS 104	4	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	75
ANS 105	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	60
ANS 108	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	100
ANS 112	4	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	85
ANS 113	5	espinhoso	globoso	unisseriada	globosa	60
ANS 118	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	65
ANS 123	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	65
ANS 124	4	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	65
ANS 128	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	60
ANS 134	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	130
ANS 139	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	110
ANS 142	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	75
ANS 147	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	60
ANS 148	4	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	50
ANS 149	4	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	95
ANS 150	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	75
ANS 152	4	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	62,5
ANS 154	4	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	110
ANS 156	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	140
ANS 158	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	120
ANS 159	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	100
ANS 160	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	67,5
ANS 164	4	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	87,5
ANS 165	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	75
ANS 166	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	85
ANS 168	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	75
ANS 171	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	95
ANS 172	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	50
ANS 173	4	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	75
ANS 177	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	95
ANS 181	2	liso	elíptico	bisseriada	hemisferica	40
ANS 182	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	60
ANS 189	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	85
ANS 191	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	95
ANS 192	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	85
ANS 193	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	75
ANS 195	4	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	60
ANS 196	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	100
ANS 198	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	85
ANS 199	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	75
ANS 200	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	85
ANS 201	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	70
ANS 202	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	73
ANS 207	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	75
ANS 217	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	75
ANS 220	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	110

	Diâmetro de conídios (µm)	Textura dos conídios	Forma conídios	Organização das Fiálides	Forma da vesícula	Diâmetro vesícula (mm)
ANS 221	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	120
ANS 224	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	110
ANS 225	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	35
ANS 226	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	125
ANS 228	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	120
ANS 229	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	50
ANS 230	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	130
ANS 232	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	73
ANS 235	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	110
ANS 236	4	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	125
ANS 238	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	110
ANS 241	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	110
ANS 242	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	110
ANS 244	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	95
ANS 246	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	75
ANS 247	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	135
ANS 248	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	110
ANS 251	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	75
ANS 254	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	95
ANS 258	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	110
ANS 260	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	60
ANS 275	4	espinhoso	globoso	bisseriada	globosa	100
ANS 289	5	rugoso	globoso	bisseriada	globosa	100
ANS 290	4	espinhoso	globoso	bisseriada	globosa	80

O isolado ANS 113 apresentou conídios com textura espinhosa e organização unisseriada (tabela 4, figura 4), características da espécie *A. aculeatus* (KLICH et al., 2002). O isolado ANS 181 apresentou esporos menores que os demais com textura lisa e forma elíptica com vesícula hemisférica e todas as estruturas hialinas, sendo essas características típicas da espécie *A. alabamensis* (BALAJEE et al., 2009). No isolamento foi possível observar que essa espécie parece ser antagônica aos *Aspergillus* pretos. Não foi possível identificar os outros isolados com coloração preta por meio da análise morfológica.

Na análise de componentes principais foram obtidas séries de autovalores com números iguais aos de variáveis estudadas, sendo escolhidas os Fatores 1 e 2 que explicam a maior parte da variância (figura 5), para realizar as representações da distribuição das variáveis em espaços bidimensionais. A figura 6 ilustra a distribuição das variáveis em diagramas de dispersão definidos por pares de componentes principais (fator 1 = eixo x e fator 2 = eixo y). Observando o gráfico gerado a partir da análise de componentes principais (figura 6), pode-se perceber que os isolados ANS 113 e o ANS 181 foram nitidamente diferenciados dos demais isolados associados ao

sisal e são muito diferentes entre eles, o que está em concordância com identificação morfológica e molecular. Os outros isolados formam um grupo homogêneo para as características morfológicas avaliadas.

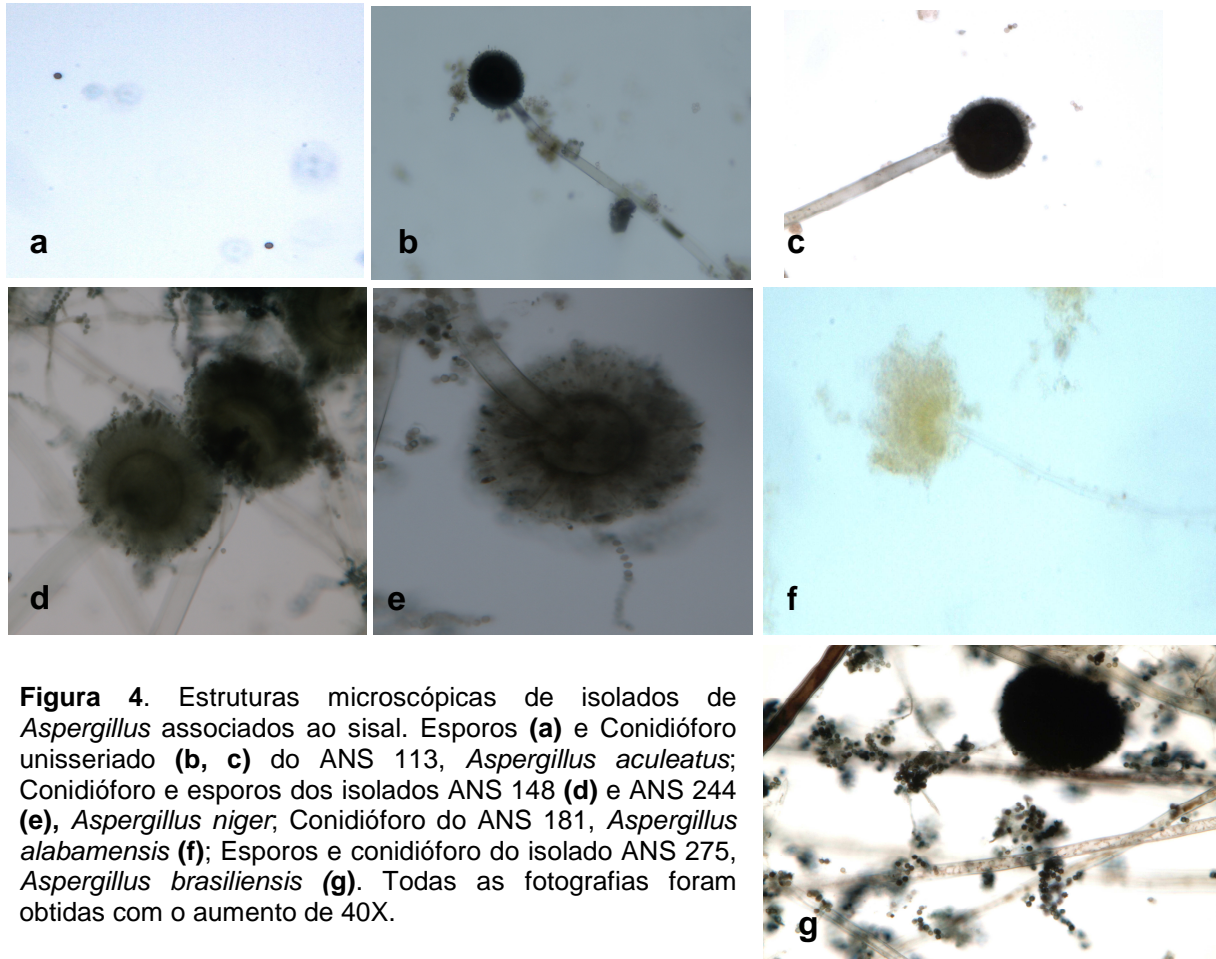


Figura 4. Estruturas microscópicas de isolados de *Aspergillus* associados ao sisal. Esporos (a) e Conidióforo unisseriado (b, c) do ANS 113, *Aspergillus aculeatus*; Conidióforo e esporos dos isolados ANS 148 (d) e ANS 244 (e), *Aspergillus niger*; Conidióforo do ANS 181, *Aspergillus alabamensis* (f); Esporos e conidióforo do isolado ANS 275, *Aspergillus brasiliensis* (g). Todas as fotografias foram obtidas com o aumento de 40X.

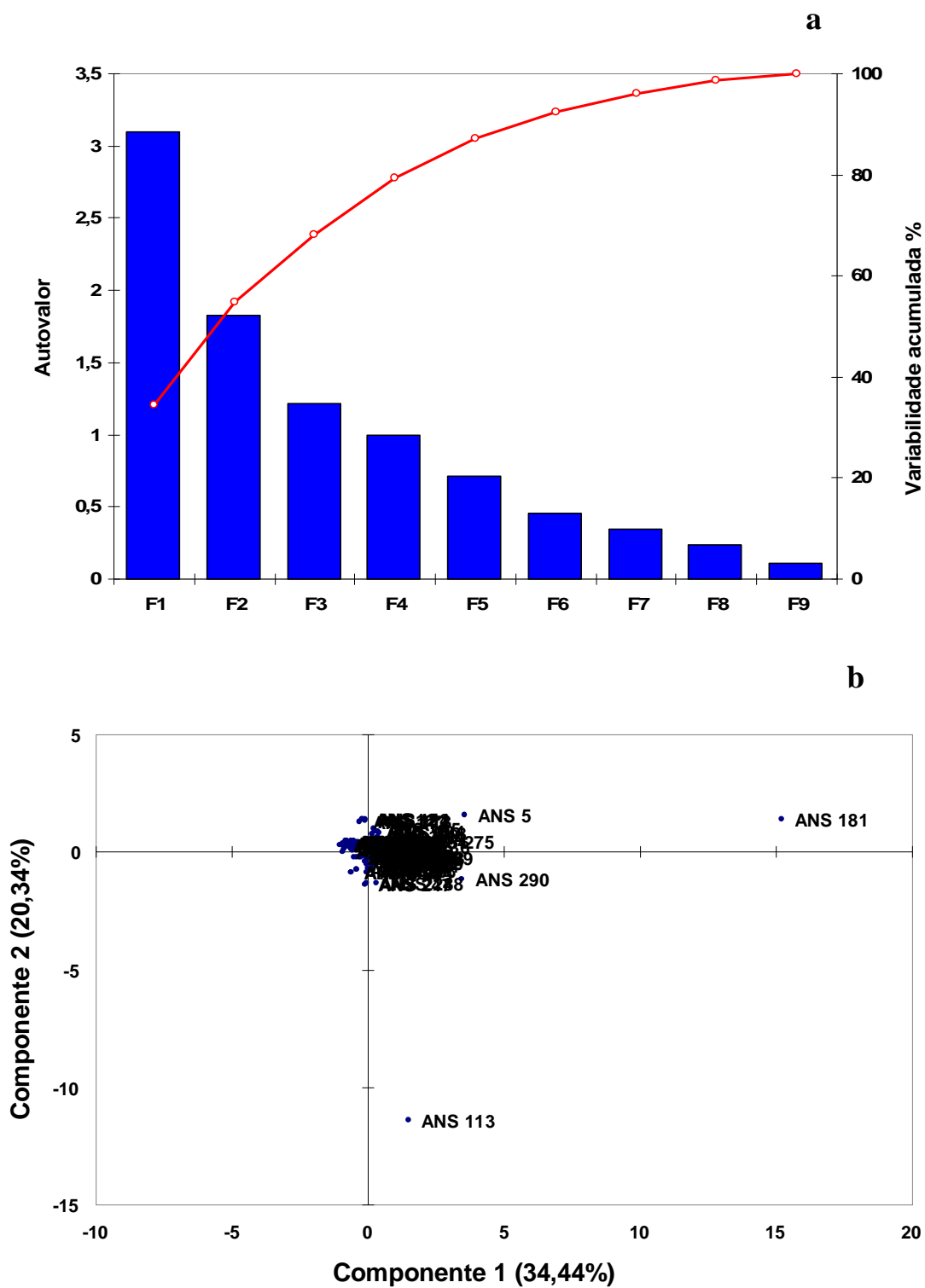


Figura 5. Análise dos dados morfológicos dos isolados de *Aspergillus* associados a sisal por componentes principais. Contribuição dos componentes principais para a variabilidade **(a)**. Diagrama de dispersão dos isolados em função das duas componentes principais **(b)**.

Identificação Molecular

Árvores filogenéticas foram construídas com os métodos de Máxima Verossimilhança (ML); Parcimônia (PAR); e Neighbor-Joining (NJ) (Figura 6). As árvores de Máxima Verossimilhança e Parcimônia apresentaram uma topologia semelhante. Nessas árvores ocorreu a formação de seis grupos distintos com diferenças na formação de subclados. Na árvore de Máxima parcimônia, o isolado ANS 275, (*Aspergillus brasiliensis*) foi agrupado com o subclado formado pelos isolados ANS5, e ANS12, identificados como *A. foetidus* e *A. tubingensis*, respectivamente, enquanto que na árvore de ML, este isolado foi agrupado com o subclado formado pelos isolados da espécie *A. niger*.

A árvore gerada por Neighbor-Joining apresentou uma topologia distinta das outras. Essa árvore foi dividida em seis grupos principais, onde o isolado ANS 113 (*A. aculeatus*) formou um clado com o isolado ANS 181 (*A. alabamensis*). *A. aculeatus* é uma espécie da seção *Nigri*, e nesta árvore, ficou separado das outras espécies desta seção, e formou um grupo, com uma espécie de outra seção, com características morfológicas muito distintas. Essa associação teve um valor de bootstrap considerado baixo.

A análise das sequências do fragmento do gene β -tubulina possibilitaram a identificação de todas as espécies de *Aspergillus* provenientes de sisal. Os isolados ANS 5 e ANS 290 foram identificados como *A. foetidus*, ANS 12 como *A. tubingensis*, ANS 113 como *A. aculeatus*, ANS 275 como *A. brasiliensis*, ANS181 como *A. alabamensis*. Todos os demais isolados foram identificados como *A. niger*. Todas as identificações foram confirmadas com valores de identidade de 99 a 100 %, quando comparadas com sequências de β -tubulina dos bancos de dados públicos.

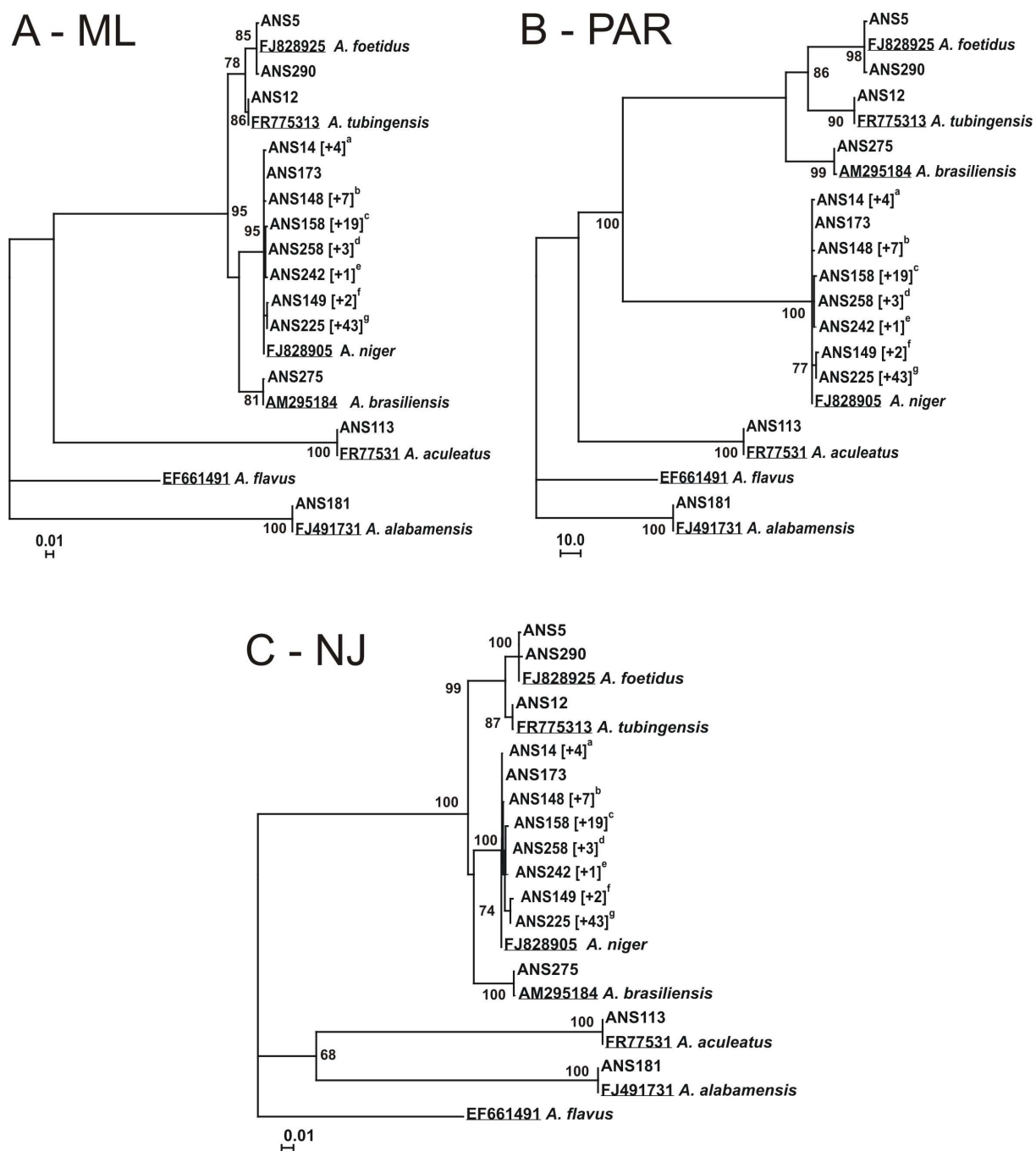


Figura 6. Árvores filogenéticas geradas a partir de 529 nucleotídeos alinhados de sequências de um fragmento do gene β -tubulina. Árvore de Máxima verossimilhança - ML (**A**); Árvore de Parcimônia, gerada com 210 sítios informativos - PAR, Comprimento 363, CI 0,86 e RI 0,908 (**B**); Árvore de Neighbor-joining - NJ (**C**). O comprimento dos ramos é estimado pelas escalas na base das árvores e os valores de bootstrap (1000 repetições) em porcentagem são indicados nos ramos correspondentes. Isolados com sequências idênticas em cada ramo terminal indicado entre colchetes : ^aANS 14, ANS 32, ANS 166, ANS 200; ^bANS 34, ANS 85, ANS 150, ANS 159, ANS 160, ANS 177, ANS 220; ^cANS 33, ANS 99, ANS 95, ANS 103, ANS 104, ANS 134, ANS 158, ANS 164, ANS 171, ANS 191, ANS 193, ANS 228, ANS 229, ANS 230, ANS 244, ANS 246, ANS 247; ^dANS 154, ANS 242; ^eANS 232, ANS 235, ANS 241, ANS 258; ^fANS 128, ANS 149, ANS 195; ^gANS 1, ANS 8, ANS 18, ANS 20, ANS 21, ANS 40, ANS 51, ANS 55, ANS 74, ANS 86, ANS 105, ANS 108, ANS 112, ANS 118, ANS 123, ANS 124, ANS 139, ANS 142, ANS 147, ANS 152, ANS 165, ANS 168, ANS 172, ANS 182, ANS 189, ANS 192, ANS 196, ANS 198, ANS 199, ANS 201, ANS 202, ANS 207, ANS 217, ANS 221, ANS 224, ANS 225, ANS 226, ANS 236, ANS 238, ABS 251, ANS 254, ANS 260, ANS 266, ANS 289. Sequências grifadas foram obtidas dos bancos de dados públicos.

DISCUSSÃO

Aspergillus niger foi identificado com base em observações morfológicas como o agente causal da podridão vermelha do sisal na Bahia e na Paraíba (COUTINHO et al., 2006; SOARES et al., 2006). No entanto, ainda existiam dúvidas quanto à identidade do patógeno, pois a taxonomia de *Aspergillus* seção *Nigri* é complexa devido às semelhanças entre as espécies (ABARCA et al., 2004).

Nesse trabalho, uma abordagem polifásica, incluindo análises morfológicas, testes de patogenicidade e análises filogenéticas, foram utilizadas para a identificação das espécies de *Aspergillus* associadas ao sisal. Noventa e um isolados de *Aspergillus* foram estudados, porém esse número representa um total de 262 (Tabela 1 e 2). As coletas para a obtenção desses isolados foram representativas das áreas produtoras de sisal do semi-árido baiano (ABREU, 2010).

Além de ter sido confirmada a identidade de *A. niger* em sisal, foi possível identificar outras espécies filogeneticamente próximas a *A. niger* que também foram patogênicas em testes realizados em condições experimentais. As espécies *A. foetidus*, *A. tubingensis* e *A. brasiliensis* foram constatados pela primeira vez como capazes de desenvolver os sintomas da podridão vermelha do sisal. Todas essas espécies são morfologicamente indistinguíveis, pertencendo ao complexo *A. niger* e foram relatadas anteriormente como causadoras de podridões pós-colheita e como produtoras de ocratoxinas em diversas culturas, incluindo café, cereais, pimenta, cacau, uva, tâmara, tomate e frutas em conserva (PERRONE et al., 2007). Fungos do gênero *Aspergillus* são classificados como saprófitas em função de serem dependentes de lesões de origem mecânica ou fisiológica e de condições ambientais adversas para iniciar o processo de infecção (BOCK, 1965; LIMA et al., 1998; SILVA, 2006). Estudos adicionais estão sendo conduzidos para compreender os mecanismos de patogenicidade dessas espécies de *Aspergillus* em sisal.

Os testes de patogenicidade realizados indicam que *A. niger*, *A. brasiliensis*, *A. foetidus*, e *A. tubingensis* podem ser patogênicos. No entanto, apenas *A. niger* foi isolado inicialmente de plantas doentes, os demais foram obtidos de amostras de solo. Portanto, ainda não é possível afirmar com certeza se essas espécies desempenham um papel significativo para a epidemiologia da doença no campo. Os isolamentos realizados nesse trabalho indicam que *A. niger* é a espécie mais

frequentemente isolada de solo e de plantas doentes na região sisaleira da Bahia. *A. aculeatus* foi uma das espécies isoladas do solo, porém no experimento de patogenicidade, o mesmo não causou doença. Esta espécie, apesar de fazer parte da seção *Nigri*, assim como *A. niger*, não faz parte do complexo *A. niger*. Esta espécie é unisseriada, e é menos próxima filogeneticamente do que as outras espécies obtidas que causaram doença.

O isolado ANS 275, identificado através de ferramentas moleculares como *Aspergillus brasiliensis*, diferiu da descrição morfológica de Varga e colaboradores (2007), em relação ao tamanho da vesícula. Varga et al., (2007) relataram que o tamanho da vesícula dessa espécie pode variar de 35 a 40 μm , enquanto o isolado estudado neste trabalho, teve uma vesícula com tamanho médio de 100 μm . As demais características morfológicas desse isolado foram iguais às descritas na literatura.

Dentre as espécies de *Aspergillus* identificadas, *A. alabamensis*, que pertence à seção *Terrei* e não foi patogênica ao sisal, parece ter sido antagônica aos *Aspergillus* pretos, de acordo com observações realizadas em laboratório (SÁ, J.O.; Queiroz, J.R., dados não publicados). Esse antagonismo poderia ser explorado em estudos futuros para o desenvolvimento de controle biológico da podridão vermelha, à semelhança do que ocorre no controle biológico de *Fusarium* na rizosfera de diversas plantas com isolados não patogênicos do mesmo gênero. Contudo, em sua primeira identificação, a espécie *A. alabamensis* foi obtida em amostras de análises clínicas (LEMANCEAU et al., 1993), dificultando a sua utilização para o controle biológico, além de exigir um grande cuidado na manipulação do isolado.

Dois isolados de *A. niger* obtidos do ar, incluindo um do município de Cruz das Almas, foram capazes de causar a doença em sisal (Tabela 2). Portanto, a espécie *A. niger*, independente da origem, parece possuir os mecanismos de patogenicidade necessários para causar a podridão vermelha em sisal. Por outro lado, um dos isolados de *A. foetidus* não foi capaz de causar a doença, enquanto que o outro isolado da mesma espécie foi patogênico. É possível que esse resultado tenha sido obtido devido à perda de patogenicidade acarretada por cultivos sucessivos em laboratório (AGRIOS, 2007). Outra possibilidade, como esses isolados possuem tamanho da vesícula e diâmetro da colônia diferentes, é que esses não sejam da mesma espécie. Nesse caso, o seqüenciamento do fragmento do gene da β -tubulina não teria sido suficiente para diferenciar estas duas espécies.

De qualquer maneira, os experimentos de patogenicidade com essa espécie, bem como com os outras que causaram doença serão repetidos para a confirmação dos resultados. Será realizada a última etapa dos postulados de Koch, o re-isolamento. Os isolados obtidos nessa etapa serão re-sequenciados, já que com a morfologia não é possível a diferenciação entre as espécies, e assim a patogenicidade poderá ser confirmada.

As análises filogenéticas realizadas nesse trabalho, por meio dos métodos de máxima verossimilhança e parcimônia mostraram uma topologia semelhante à encontrada por outros autores (SAMSON, 2007; GEISER, 2007; VARGA, 2007; PERRONE 2007; PETERSON, 2008; SILVA, 2009; FERRACIN 2009). A utilização de sequências de um fragmento de apenas um gene parece ter sido suficiente para a identificação molecular ao nível de espécie. Esse fato ocorreu devido à escolha do gene β -tubulina para as análises, concordando com a sugestão de outros autores que realizaram trabalhos de filogenia molecular de *Aspergillus* em outras espécies de plantas (FRISVAD et al., 2004; SAMSON et al., 2004; SAMSON, 2007; GEISER, 2007; VARGA, 2007; PERRONE 2007; PETERSON, 2008; SILVA, 2009; FERRACIN 2009).

Em resumo, nesse trabalho detectou-se uma grande diversidade de *Aspergillus* associados ao sisal. Dentre as espécies identificadas por uma abordagem polifásica, *A. niger*, *A. brasiliensis*, *A. foetidus*, e *A. tubingensis* desenvolveram sintomas da podridão vermelha do caule do sisal. Esses resultados poderão ser úteis para o desenvolvimento de cultivares de sisal resistentes à essa doença, bem como para a busca de alternativas de controle para a doença.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos futuros deverão considerar a realização da última etapa dos postulados de Koch, o re-isolamento, para as espécies citadas pela primeira vez nesse trabalho como possíveis patógenos, para assegurar que essas são realmente patogênicas.

Apesar da análise filogenética com sequências de β -tubulina ter se mostrado suficiente para a identificação molecular de *Aspergillus*, sequências de um fragmento do gene calmodulina estão sendo obtidas para tornar as análises mais robustas por meio da concatenação dos fragmentos.

Diversas espécies de *Aspergillus* do complexo *A. niger* são produtoras de ocratoxina A (OTA) (FERRACIN, 2007; PERRONE et al., 2007). Será interessante verificar se essa substância é produzida pelas espécies associadas ao sisal e estudar o papel da OTA na contaminação de animais domésticos que se alimentam de resíduos de sisal.

Estudos para o desenvolvimento de métodos de controle, incluindo melhoramento visando resistência à doença e controle biológico utilizando espécies antagonicas podem ser realizados em projetos subsequentes.

REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 86, p. 33-49, 2004.

ABED, K. F. Differentiation of *Aspergillus niger* by random amplification of polymorphic DNA. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, vol 35, p. 1027-1032. 2008.

ABREU, K. C. L.; SOARES, A. C. F.; TORRES, C. N.; LARANJEIRA, F. F.; CARDOSO, E. L.; CANDEIAS, E. L. Prevalencia e incidencia da podridao vermelha do pseudocaulo do sisal na microrregiao de Serrinha. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 218, 2007.

ABREU, K. C. L. M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no estado da Bahia**. Tese (Doutorado em Ciências agrárias na Universidade Federal da Bahia). Cruz das Almas – BA, 106 p, 2010.

ACCENSI, F.; CANO, J.; FIGUERA, L.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, p. 191-196, 1999.

ACCENSI, F.; ABARCA, M. L.; CANO, J.; FIGUERA, L.; CABAÑES, F. J. Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 365-370, 2001.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005. 922p.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ALVES, M. O.; SANTIAGO E. G. Tecnologia e relações sociais de produção no setor sisaleiro nordestino. Artigo apresentado no **XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural**, ocorrido em Ribeirão Preto (SP), 24 a 27 de julho e 2005.

BALAJEE, S. A.; Baddley, J. W.; Peterson, S. W.; Nickle, D.; Varga, J.; Boey, A.; Lass-Flörl, C.; Frisvad, Jens C.; Samson, R. A. *Aspergillus alabamensis*, a New Clinically Relevant Species in the Section *Terrei*. **Eukaryotic Cell**, Vol. 8, p. 713-722, 2009.

BERJAK, P. Report of the seed storage committee working group on the effects of storage fungi on seed viability. **Seed Science and Technology**, v. 12, p. 233-253, 1984.

BELTRÃO, N.E.M. A planta. In: ANDRADE, W. (Ed.). O Sisal do Brasil. 1. ed. Salvador: SINDIFIBRAS; Brasília: APEX-Brasil, 2006. p.25-28. SILVA, O. R. R. da. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 1999.

BOCK, K.R. Diseases of sisal. **World Crops**, v.17, n.1, p.64-67, 1965.

COUTINHO, W.M.; SUASSUNA, N.D.; LUZ, C.M.; SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F. Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p. 605, 2006.

DEEPAKE, U. Aero-microbiological studies of Moisture Affected Buildings in the Indoor Environment. **Journal of Young Investigators**, v. 19, 2009.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v 12, p. 13-15, 1990.

ESTEBAN, A; LEONG, SU-LIN L; TRAIN-DINH, N. Isolation and characterization of six polymorphic microsatellite loci in *Aspergillus niger*. **Molecular Ecology Notes**, v 5, p. 375-377, 2005.

FERRACIN, L. M. **Identificação e caracterização molecular de isolados do complexo *Aspergillus niger* obtidos de frutas secas.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Londrina), Londrina, 77p, 2007.

FREIRE, F. C. O.; PARENTE, G. B.; CARDOSO, B. B. **Doenças da figueira (*Ficus carica* L.) no Estado do Ceará**, Circular Técnica online, n.26, Embrapa Dezembro, Fortaleza, 2006.

GEISER, D.M.; KLICH, M.A.; FRISVAD, J.C.; PETERSON, S.W.; VARGA, J.; SAMSON, R.A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 1–10. 2007.

GIRAUD, F.; DUPONT, J.; HAON, M.; BOUZID, O.; ALIBEU, O.; NAVARRO, D.; SAGE, L.; SIGLE-MURANDI, F.; ASTHER, M.; LESAGE-MEESSEN, L. Phylogenetic analysis of the *Aspergillus niger* aggregate in relation to feruloyl esterase activity. **Research in Microbiology**, v.158, 413-419, 2007.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1323-1330, 1995.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids. Symp**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMPL, V.; PAVLICEK, A.; FLEGR, J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.731-735, 2001.

HORN, B. W. *Aspergillus caelatus*, a new species in Section Flavi. **Mycotaxon**, Netherlands, v. 61, p. 185-191, 1997.

IBGE. **Brasil: Sisal ou Agave – produção, área colhida e rendimento médio – 1990 a 2005.** Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.Br> Acesso em: 05 de novembro de 2010.

KATOH, K., MISAWA, K., KUMA, K., MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v. 30, 2002.

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

KLICH, M. A.; PITT, J. I. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and Their Teleomorphs. **CSIRO Division of Food Science and Technology**, North Ryde, New South Wales, Australia, p. 164, 1988.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. **Mycological Papers**, v. 161, p. 1-188, 1989.

KUSTERS-VAN SOMEREN, M.; SAMSON, R. A.; VISSER, J. The use of RFLP analyses in classification of the black aspergilli: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate. **Current Genetics**, v. 19, p. 21-26, 1991.

LEMANCEAU, P.; BAKKER P. A. H. M.; KOGEL; W. J.; ALABOUVETTE, C. ; SCHIPPERS, B. Antagonistic Effect of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and Pseudobactin 358 upon Pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. **Applied. Environmental Microbiol**, v. 59, p. 74–82, 1993.

LIMA, E. F.; MOREIRA, J. de A. N.; BATISTA, F. A. S; SILVA, O. R. R. F. da; FARIAS, F. J. C.; ARAUJO, A. E. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 2, n. 2, p.109-112, 1998.

MEDINA, J. C. **O Sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Diretoria de Publicidade Agrícola, 286 p, 1954.

MÉGNÉGNEAU, B.; DEBETS, F.; HOEKSTRA, R. F. Genetic variability and relatedness in the complex group of black Aspergilli based on random amplification of polymorphic DNA. **Current Genetics**, v. 23, p. 323-329, 1993.

MELLO, Q. M. S.; TEIXEIRA, L. M. S.; BLEICHER, E.; RODRIGUES, S. M. M. **Artrópodes e microrganismos associados ao cajueiro**, Documentos, n.33, Novembro, Fortaleza: Embrapa,- CNPAT, 27 p., 1999.

NYLANDER, J. A. A. **MrModeltest. Version 2**. Uppsala, Sweden: Evolutionary Biology Centre, Uppsala Univ., 2004.

NUNES, M. E. T.; KIMATI, H. Doenças do alho e da cebola. In: KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M.', **Manual de Fitopatologia**, v.2: Doenças de plantas cultivadas, ed. 3ª, Editora Agronômica Ceres, 776 p. São Paulo, 1997.

PAGE, R. D. M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v 12, p. 357-358,1996.

PARENICOVÁ, L.; BENEN, J. A. E.; SAMSON, R. A.; VISSER, J. Evaluation of RFLP analysis of the classification of selected black aspergilli. **Mycological Research**, v. 101, p. 810-814, 1997.

PARENICOVÁ, L.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R. A.; ROSSEN, L.; VISSER, J. Genotypic and phenotypic variability among black Aspergilli. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (eds), **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, p 413-424, 2000.

PARENICOVÁ, L.; SKOUBOE, P.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; ROSSEN, L.; ter HOOR- SUYKERBUYK, M.; VISSER, J. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. **Applied Environmental Microbiological**, v. 67, p. 521-527, 2001.

PERRONE, G.; VARGA, J.; SUSCA, A.; FRISVAD, J. C.; STEA, G.; KOCSUBÉ, S.; TÓTH,; KOZAKIEWICZ, Z.; SAMSON, R. A. *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1032–1039, 2008.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRLICH, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; SAMSON, R. A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycological**, v. 59, p. 53-66, 2007.

PETERSON, S. W.; ITO, Y.; HORN, B. W.; GOTO, T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, Tokyo, v. 93, p. 689-703, 2001.

PILDAIN, M. B.; FRISVAD, J. C.; VAAMONDE, G.; CABRAL, D.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 725-735, 2008.

RAPER, K. B.; FENNEL, D. I. (Ed). **The genus *Aspergillus***. Willians and Wilkins Company, Baltimore, Md. USA, p. 686, 1965.

SÁ, J. O. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp.** 2009, 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia), Cruz das Almas, 2009.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; FRANK, M. J.; FRISVAD, J. C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 50, p. 45-61, 2004.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTIN, J. A.; REIS, E. M.; MATSUMURA, A. T. S.; MORAES, M. G. Efeito do retardamento da colheita de milho na incidência de grãos ardidos e de fungos patogênicos, **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.2, p.182-192, 2004.

SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR – SECEX. **Exportações Brasileiras, 2009**. Disponível em:<www.desenvolvimento.gov.br.> Acesso em: 17 de julho de 2009.

SCHUSTER E., DUNN-COLEMAN N., FRISVAD J.C. AND VAN DIJCK P.W.M. On the safety of *Aspergillus niger*, a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p 426–435, 2002.

SERRA, R; CABANES, J; PERRONE, G; KOZAKIEWICZ, Z; CASTELLÁ, G; VENANCIO, A; MULÈ, G. *Aspergillus ibericus*: a new species of the Section *Nigri* isolated from grapes. **Mycologia**, v. 98, p 295–306, 2006.

SILVA, D. M. **Identificação de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* por taxonomia polifásica e descrição de duas novas espécies do gênero**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola na Universidade Federal de Lavras), Lavras, 76 p, 2009.

SILVA, O.R.R.F.; SUINAGA, F.A.; COUTINHO, W.M.; CARTAXO, W. V. Cadeia produtiva. In: ANDRADE, W. (Ed.) **O Sisal do Brasil**. 1.ed. Salvador: SINDIFIBRAS; Brasília: APEX-Brasil, 2006.

SILVA, O. R. R. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 1999.

SINDIFIBRAS. **O Projeto Sisal-Apex traz resultados positivos para as exportações baianas de sisal no primeiro trimestre do ano, que cresceram quase 40%**. Disponível em: <www.braziliANSisal.com> Acessado em: 08 junho de 2010.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. ***Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaule do sisal.** In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, BA, 2006.

SOUZA FILHO, F.B.; SANTOS FILHO, H.P.; ROBBS, C.F. Etiologia da queima das folhas do coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.4, n.1, p.5-10, 1979.

SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F.; COUTINHO, W.M. A história. In: ANDRADE, W. **O Sisal do Brasil**. 1.ed. Salvador: SINDIFIBRAS; Brasília: APEX-Brasil, p.19-21, 2006.

VARGA J., RIGÓ K., TÓTH B., TÉREN J. AND KOZAKIEWICZ Z. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology Biotechnology**, v 41, p. 29–36. 2003.

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; TÓTH, B.; FRISVAD, J. C.; PERRONE, G.; SUSCA, A.; MEIJER, M.; SAMSON, R. A. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** . v. 57, 2007.

VARGA, J.; KEVEI, E.; HAMARI, Z.; TOTH, B.; TEREN, J.; CROFT, H.; KOZAKIEWICZ, Z. Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: SAMSON, R.A.; PITT, J.I.; **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification.** Harwood Academic Publishers, Netherlands, p. 397–411. 2000.

VARGA, J.; KEVEI, F.; VRIESEMA, A.; DEBETS, F.; KOZAKIEWICZ, Z.; CROFT, J.H. Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate. **Canadian Journal Microbiology**, v. 40, p. 612–621, 1994.

VARGA, J.; KEVEI, F.; FEKETE, C.; COENEN, A.; KOZAKIEWICZ, Z.; CROFT, J.H. Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. **Mycological Research**, v. 97, p. 1207–1212. 1993.

WIKIPEDIA. **Sisal**. Disponível em: < <http://pt.wikipedia.org/wiki/Sisal>> Acesso em: 11/11/2010.