

GIOVANA GOMES COSTA

Utilização de marcadores ISSR para identificação molecular
de isolados ambientais de *Aspergillus*

Campo Grande - MS

2024

GIOVANA GOMES COSTA

Utilização de marcadores ISSR para identificação molecular
de isolados ambientais de *Aspergillus*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para a
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas pela Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, sob
orientação do Dr. Wellington S. Fava.

Campo Grande - MS

2024

Agradecimentos

Concluir este trabalho é, para mim, mais do que a finalização de um trabalho acadêmico; é a celebração de uma jornada cheia de desafios, superações e muitos aprendizados. Não poderia ter chegado até aqui sem o apoio de várias pessoas que tornaram essa caminhada muito mais leve, estiveram em todo momento ao meu lado, e à elas sou imensamente grata.

Em preeminência, agradeço a Deus, por ser a paz e o amor que sempre me acompanhou, me dando força nos momentos mais difíceis e luz, sustento e certeza nos dias de insegurança.

À minha família, aos de perto e aos de longe, que até mesmo antes de eu nascer, sempre construíram, sem medir esforços, o caminho que eu trilho hoje. Que fazem e sempre fizeram com que a minha jornada fosse, ao menos, minimamente, mais fácil.

À família que eu escolhi, as minhas amigas, minhas aliadas, que diariamente tornam a vida, seja acadêmica ou pessoal, tão mais possível de ser vencida. Com muito mais leveza, cuidado, carinho e cumplicidade. Carol, Liri, May, Dani, vocês moram em mim.

Ao meu orientador, Dr. Wellington Fava, por sua paciência, compreensão e generosidade que com o tempo foram fundamentais para que eu pudesse dar o meu melhor. Sou muito grata por sua orientação e por ter acreditado em mim ao longo de todo o processo.

“Only time is ours, the rest we’ll just wait and see.”

Ben Howard

—

Resumo

Aspergillus é um gênero de fungos filamentosos amplamente distribuído e de grande relevância ecológica, econômica e médica, devido à sua capacidade de adaptação a ambientes variados e ao potencial patogênico de algumas espécies. Este estudo avaliou a eficácia de marcadores ISSR na identificação molecular de espécies crípticas de *Aspergillus*, a partir de 12 amostras coletadas em 11 países da América Latina a partir do projeto LatAsp. Foram utilizadas técnicas como MALDI-TOF, sequenciamento genético e PCR. Embora os marcadores ISSR tenham acessado a diversidade de espécies, mas sua especificidade foi insuficiente para discriminar espécies crípticas, agrupando isolados de diferentes seções taxonômicas e até gêneros distintos, como *Penicillium*. Esses resultados reforçam a complexidade filogenética de *Aspergillus* e a necessidade de métodos moleculares e marcadores genéticos mais precisos. Destacando a importância de avanços na identificação de espécies, particularmente em contextos clínicos, para auxiliar no tratamento assertivo das aspergiloses.

Palavras-chave: *Aspergillus*, ISSR, espécies crípticas e aspergilose

Abstract

Aspergillus is a widely distributed genus of filamentous fungi with significant ecological, economic, and medical relevance due to its adaptability to various environments and the pathogenic potential of certain species. This study evaluated the effectiveness of ISSR markers in the molecular identification of cryptic *Aspergillus* species, using 12 samples collected from 11 Latin American countries as part of the LatAsp project. Techniques such as MALDI-TOF, genetic sequencing, and PCR were employed. Although ISSR markers revealed species diversity, their specificity was insufficient to discriminate cryptic species, grouping isolates from different taxonomic sections and even distinct genera, such as *Penicillium*. These results emphasize the phylogenetic complexity of *Aspergillus* and the need for more accurate molecular methods and genetic markers. The findings highlight the importance of advancements in species identification, particularly in clinical contexts, to support effective treatment of aspergillosis.

Keywords: *Aspergillus*, ISSR, cryptic species and aspergillosis.

Sumário

Introdução	08
Objetivo	12
Material e métodos	13
Resultados e discussão	17
Conclusão	19
Referências	21

Introdução

Aspergillus é um gênero de fungos filamentosos cosmopolitas pertencente ao Filo Ascomycota, Ordem Eurotiales e Família Trichocomaceae (Houbraken *et al.*, 2020). As espécies de *Aspergillus* são caracterizadas por seu crescimento rápido, formação de colônias pigmentadas e pela presença de estruturas de reprodução assexuada denominadas conidióforos, que produzem conídios em cadeias (Figura 1). A fase sexuada da reprodução ocorre por meio de ascósporos, enquanto a fase assexuada acontece através de esporos assexuais chamados conídios (Campos, 2019). Esses conídios são responsáveis pela dispersão, favorecendo sua ubiquidade em diversos ambientes, como solo, ar e matéria orgânica em decomposição. Não são seletivos quanto às condições do ambiente, sendo capazes de crescer em temperaturas variando de 6 a 55°C e suportar baixas umidades (Krijgsheld *et al.*, 2013), características pelas quais conferem ao fungo alta capacidade de dispersão e desenvolvimento. Amplamente distribuído nos mais diversos habitats e com grande importância econômica, ecológica e, principalmente, médica.

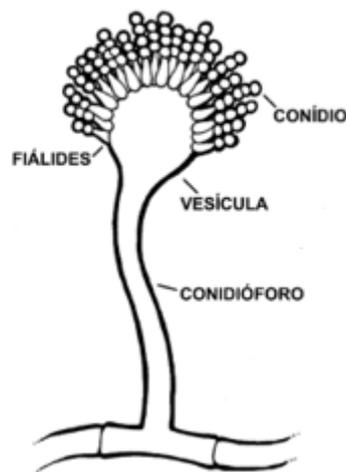


Figura 1: Ilustração da micromorfologia de *Aspergillus fumigatus*.

Fonte: Mesquita-Rocha, 2019.

O sistema de classificação infragenérica de *Aspergillus*, originalmente desenvolvido com base em características fenotípicas, utilizava principalmente a coloração dos conídios, a morfologia dos conidióforos e as taxas de crescimento em meios de ágar. Embora tenha sido substituído por métodos baseados em dados moleculares, ainda apresenta sobreposição com o sistema atual. (Raper & Fennell 1965, Houbraken & Samson 2011, Jurjevic *et al.* 2015, Chen *et al.* 2016a). Tendo em vista que o gênero possui complexidade filogenética significativa, muitas espécies compartilham características morfológicas semelhantes, tornando desafiadora a distinção baseada apenas em métodos convencionais. Com o avanço de técnicas moleculares, como o sequenciamento de genes e a análise de DNA, os estudos sobre a filogenia de *Aspergillus* têm avançado significativamente. Para

evitar ambiguidades e promover a estabilidade taxonômica, tornou-se necessário estabelecer um sistema formal de classificação infragenérica. Nesse contexto, o pesquisador Pitt, em 1980, substituiu a estrutura de 'grupos' em *Penicillium* por uma organização baseada em subgêneros e seções. Posteriormente, Gams et al. (1985) aplicaram mudanças semelhantes à classificação de *Aspergillus*. (Houbraken, 2020).

Sendo assim, o Gênero *Aspergillus* possui cerca de 446 espécies, 6 subgêneros (*Circumdati*, *Nidulantes*, *Fumigati*, *Aspergillus*, *Cremei* e *Polypaecilum*) e, aproximadamente, 27 seções. (Figura 2). Essa complexidade filogenética é especialmente crítica em contextos clínicos, onde a identificação precisa é essencial para o tratamento adequado.

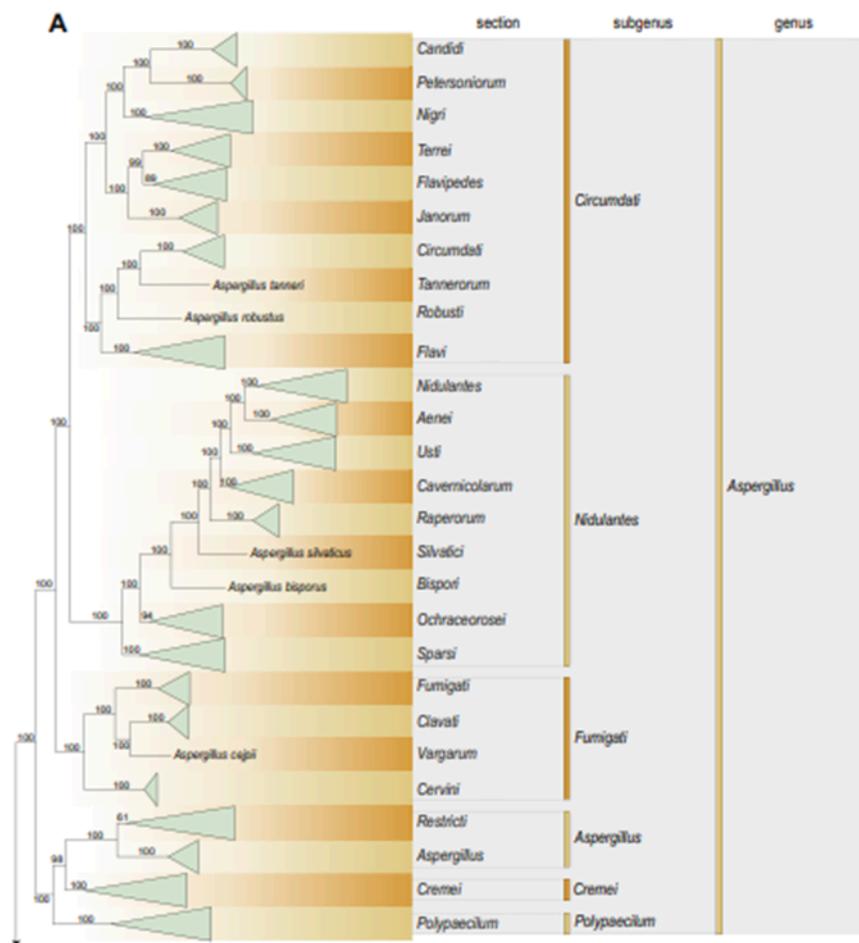


Figura 2: Filogenia do Gênero *Aspergillus*.

Fonte: Houbraken *et al.* (2020)

Todo esse sistema filogenético é necessário pois o gênero apresenta as chamadas espécies crípticas, indivíduos geneticamente distintos, porém morfologicamente semelhantes, cuja identificação só acontece através de técnicas moleculares, como o sequenciamento genético. Dentro de sua importância médica as espécies crípticas apresentam diferenças em patogenicidade, resistência a antifúngicos, sendo um grande

desafio para um tratamento eficaz nas manifestações clínicas que o fungo pode causar. Espécies crípticas são linhagens evolutivas independentes que possuem morfologia pouco diferenciada e não podem ser diagnosticadas apenas com base na aparência. Essas espécies foram frequentemente interpretadas erroneamente como pertencentes a uma única espécie. No caso do gênero *Aspergillus*, que causa doenças invasivas e resistência a medicamentos, a identificação e caracterização corretas desses fungos têm importância tanto epidemiológica quanto clínica (Lavanya R. *et al.*, 2022)

As aspergiloses são um grupo de doenças causadas pelos fungos do gênero *Aspergillus*, podem causar uma ampla gama de infecções em humanos, incluindo reações de hipersensibilidade, infecções pulmonares crônicas e infecções agudas com risco de vida, sendo estas últimas mais comuns em indivíduos imunocomprometidos. (Jenks, Jeffrey D., 2018). Dentre as 446 espécies, acredita-se que cerca de 40 são conhecidas por causarem infecções humanas, o principal agente causador é *Aspergillus fumigatus*, embora outras espécies, como *A. flavus* e *A. niger*, também possam estar envolvidas.

A infecção ocorre através da inalação dos conídios liberados no ambiente, que tanto seres humanos quanto animais inalam centenas de conídios durante o dia que estão presentes na ambiência. Nos indivíduos saudáveis, essas estruturas são suprimidas pelo sistema imune sem complicações, mas em indivíduos imunocomprometidos e/ou imunossuprimidos, pode desenvolver manifestações clínicas. Dentre elas destaca-se a aspergilose invasiva, que ocorre principalmente em pacientes imunocomprometidos, como aqueles submetidos a transplantes, em tratamento com quimioterápico e/ou portadores do vírus HIV. Outra forma é a aspergilose pulmonar crônica, onde os conídios colonizam as cavidades pulmonares e afeta indivíduos com histórico de doenças respiratórias, como a tuberculose, desenvolvendo uma bola fúngica, também conhecida como aspergiloma (Meis *et al.*, 2016). E a aspergilose alérgica bronco pulmonar, onde o desenvolvimento dos conídios obstruem as vias aéreas (Fortún *et al.*, 2012).

Correlacionando a importância médica e a complexa filogenia desse gênero, é muito importante destacar que para realizar o tratamento das aspergiloses é necessário a identificação precisa e correta da espécie do fungo para que o recurso terapêutico seja eficaz. Um dos métodos de identificação molecular é a utilização de marcadores ISSR, Inter-Simple Sequence Repeat (Inter Repetições de Sequência Simples), que se baseiam na amplificação de fragmentos localizados entre regiões de DNA repetitivo (Silva *et al.*, 2013), onde a amplificação é realizada utilizando um único primer, desenvolvido a partir de sequências de microssatélites que possuem entre 16 e 20 pares de bases (Faleiro, 2007). Introduzidos inicialmente em 1994 para estudos em cultivares, esses marcadores têm sido amplamente utilizados em diferentes organismos, incluindo animais e fungos (Wolfe, 2005). Sua aplicação em análises genéticas apresenta diversas vantagens, como a independência

de informações prévias sobre o genoma da espécie-alvo (Costa et al., 2015) e sem as limitações de outros marcadores moleculares. Exemplos dessas limitações incluem a baixa reprodutibilidade do RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA), o custo elevado do AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e a complexidade técnica do SSR (Simple Sequence Repeat) (Al-Hadeithi, 2015). Além disso, o método ISSR tem sido descrito como uma ferramenta eficaz na diferenciação de espécies e linhagens de fungos (Zhang et al., 2013) e tem sido especialmente utilizado em estudos com *Aspergillus flavus* (Haati et al., 2010; Zhang et al., 2013; Batista et al., 2008), contudo, os resultados sobre sua aplicação em outras espécies do gênero ainda estão sendo estudados.

Objetivo

O presente trabalho utilizou dados gerados dentro projeto LatAsp (Pesquisa Latino-Americana de Resistência aos Azóis em *Aspergillus fumigatus*) de identificação de isolados ambientais de *Aspergillus*. Podendo assim, avaliar a eficácia de marcadores ISSR na identificação de espécies de *Aspergillus*, podendo então estimar se os marcadores de microssatélites são eficazes para identificação molecular de espécies crípticas desse gênero.

Material e métodos

As amostras utilizadas neste trabalho foram provenientes do projeto LatAsp (Pesquisa Latino-Americana de Resistência aos Azóis em *Aspergillus fumigatus*). Por meio de um protocolo padronizado de ciência cidadã, foram obtidas 6.954 amostras de *Aspergillus fumigatus* em 11 países da América Latina, com exceção da Venezuela devido a restrições políticas. O método de coleta envolveu a exposição de tiras adesivas ao ar ambiente por cerca de 10 horas em quatro ocasiões distintas, realizadas entre julho de 2022 e agosto de 2023. Os participantes foram instruídos a realizar as coletas sempre no mesmo local, visando assegurar a consistência e a comparabilidade dos dados obtidos. Após a coleta, as amostras foram identificadas e encaminhadas aos laboratórios para análise microbiológica (Figura 3).

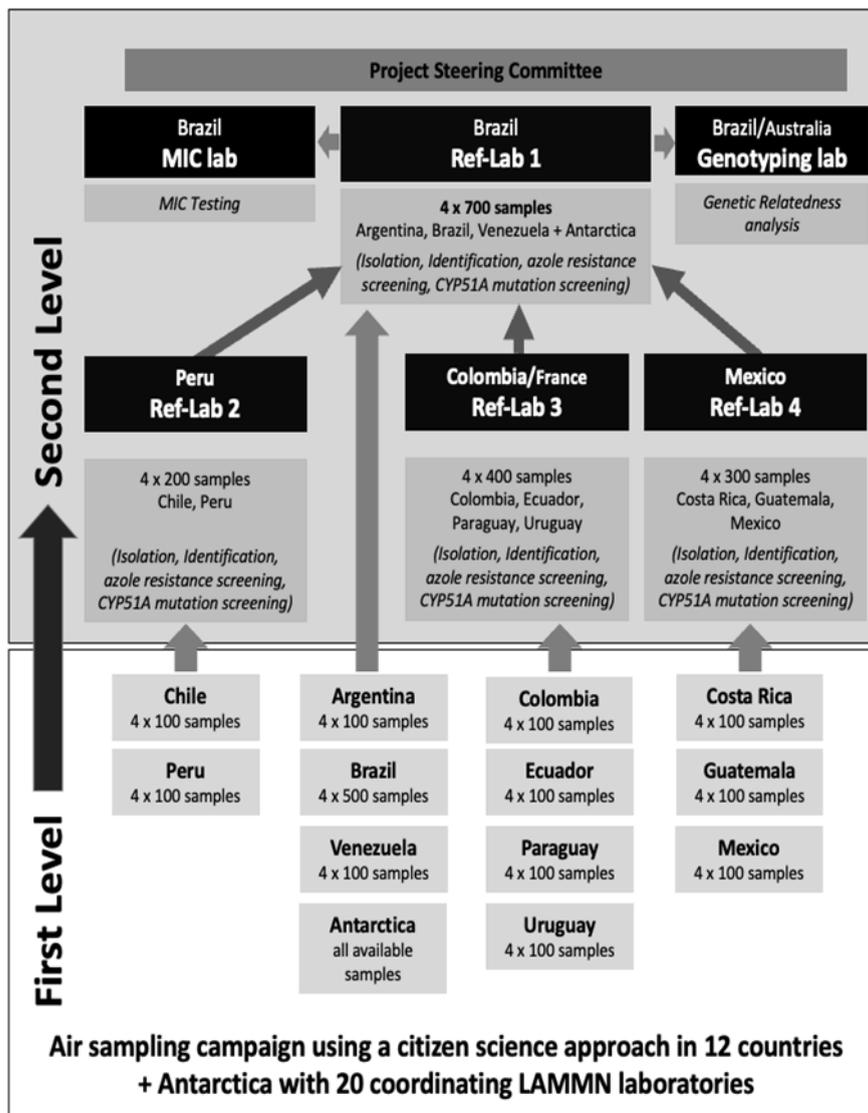


Figura 3: Fluxograma do projeto LatAsp.

Fonte: Relatório final do LatAsp, 2024 (Comunicação pessoal Dr. Wellington Santos Fava).

As amostras foram encaminhadas para laboratórios colaboradores localizados no Brasil, Peru, Colômbia e México, onde foram submetidas a procedimentos de isolamento e identificação em nível de espécie. A identificação foi realizada por espectrometria de massas utilizando a técnica MALDI-TOF ou, no caso de espécies crípticas pertencentes à seção Fumigati, pelo sequenciamento do gene da beta-tubulina.

Para este trabalho, foram utilizados 12 isolados, sendo oito do gênero *Aspergillus* e quatro do gênero *Penicillium*, que foram utilizados como grupo externo para análise posterior. O procedimento foi conduzido transferindo a amostra da tira adesiva para um tubo contendo meio de ágar batata inclinado, sendo inoculados em uma cabine de fluxo laminar, utilizando-se uma alça estéril descartável. Os tubos foram incubados em estufa a uma temperatura constante de 37°C por um período de 48 horas. Após a incubação, utilizando um swab estéril, foi preparada uma suspensão de conídios em água destilada contendo NaCl, ajustada para atingir uma concentração equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland.

Para a extração de DNA, as amostras foram transferidas para microtubos de 2 mL contendo beads de zircônio e 200 µL de água ultrapura. A maceração foi realizada em um macerador automático, utilizando três ciclos de maceração de 60 segundos cada, a uma velocidade de 4000x, com intervalos de 30 segundos entre os ciclos, seguida por centrifugação rápida (spin) de 15 segundos. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão de extração contendo 1 mM de EDTA, 10 mM de Tris (pH 8,0), 1% de SDS, 2% de Triton X-100 e 100 mM de NaCl, conforme descrito por Sepúlveda et al. (2017), além de 20 µL de Proteinase K. Após essa etapa, as amostras foram agitadas em vórtex por 30 segundos e incubadas a 65°C por 1 hora em termobloco com agitação, seguidas de nova centrifugação rápida de 15 segundos. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, com agitação em vórtex por 30 segundos. A mistura foi então centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL de isopropanol e 50 µL de acetato de amônio 3M, com homogeneização suave por inversão. O material foi mantido em freezer a -20°C durante a noite (overnight). No dia seguinte, os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 20 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o pellet preservado. Para lavar o pellet, foram adicionados 500 µL de etanol 70%, seguidos de nova centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado, mantendo o pellet intacto para as etapas subsequentes. Os microtubos foram deixados abertos em um termobloco ajustado a 37°C até a completa evaporação do etanol residual. Posteriormente, o DNA foi eluído com 100 µL de água ultrapura. As amostras obtidas foram armazenadas em freezer a -20°C para uso imediato ou em freezer a -80°C para armazenamento a longo prazo.

A região de microssatélites do DNA foi amplificada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando primers para ISSR disponibilizados pelo British Columbia University Biotechnology Laboratory (UBCBL). Embora vários primers tenham sido avaliados, apenas 6 demonstraram sucesso na amplificação da região alvo, sendo estes selecionados para as análises realizadas neste estudo (Tabela 1).

Tabela 1: Primers ISSR e suas respectivas sequências de nucleotídeos.

Primer	Sequência 5' – 3'
UBC809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UBC889	ACA CAC ACA CAC ACA CDB D
UBC891	TGT GTG TGT GTG TGT G

Cada reação de PCR foi preparada utilizando 7,8 µL de Master Mix (Thermo-Fisher Scientific), 2 µL de DNA, 0,5 µL de primer, 0,5 µL de DMSO a 5% e 0,2 µL de BSA a 5 µg/µL. A amplificação foi conduzida em um termociclador durante um período de 2 horas e 30 minutos, seguindo as etapas descritas na Tabela 2. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com GelRed. Como referência, foi utilizado um marcador molecular de 100 pb. Os géis foram submetidos a eletroforese por 1 hora, a 400 mA e 90 V, e posteriormente visualizados sob luz UV utilizando o sistema Gel Doc XR+ da Bio-Rad.

Tabela 2: Descrição das etapas da PCR.

Etapas	Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (hh:mm:ss)
Desnaturação Inicial	1	94	00:04:00
Desnaturação		94	00:01:00
Anelamento	45	50	00:00:45
Extensão		72	00:02:00
Extensão final	1	72	00:07:00

As imagens obtidas da eletroforese foram processadas no software Image Lab e exportadas, com as bandas sendo convertidas em barras correspondentes (Figuras 7 e 8). Essas barras foram então analisadas no software PyElph 1.4 para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados. Os dados resultantes foram exportados para o software PAST, onde foi realizado o Índice de Similaridade de Jaccard, que calcula a razão entre o número de bandas compartilhadas (interseção) e o número total de bandas presentes em ambas as amostras (união), avaliando a similaridade baseando-se na proporção entre a interseção e a união desses conjuntos. Valores próximos de 1 indicam alta similaridade entre as espécies, enquanto valores próximos de 0 sugerem diferenças genéticas consideráveis. A partir dessa análise, foi construído um dendrograma utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), permitindo a visualização do agrupamento filogenético das amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos marcadores ISSR revelou um perfil de similaridade baixo (menos de 40%) entre os isolados (Figura 9), sendo o ideal para identificação >70%. Isso mostra que estes marcadores são capazes de captar diferenças genéticas entre os organismos, mas não de modo específico, a identificação pode ser eficaz desde que seja encontrado o primer que se associa corretamente a amostra.

Batista *et al.* (2008) utilizaram marcadores ISSR para realizar a caracterização genética de isolados de *A. flavus* e encontraram que, dentre as cepas previamente identificadas como *A. flavus*, uma deveria ser *A. oryzae*, uma *A. parasiticus* e duas *A. tamarii*. Por outro lado, uma cepa previamente identificada como *A. parasiticus* deveria ser *A. flavus*. Todas essas cepas foram retestadas por métodos tradicionais e a nova identificação das espécies foi confirmada. Esses resultados apoiam fortemente a necessidade de usar marcadores moleculares como uma ferramenta auxiliar na diferenciação de espécies e cepas de fungos.

Os ISSR também foram utilizados para detectar estruturação populacional global de *Aspergillus terreus* (Neal *et al.*, 2011). Análises de máxima parcimônia, agrupamento por vizinhança e o agrupamento bayesiano dos dados de ISSR de 113 isolados de *A. terreus* confirmados por sequenciamento Sanger, demonstraram que um clado era composto exclusivamente por isolados da Europa e outro clado por isolados dos EUA.

Em relação ao acesso da diversidade genética, Zhang *et al.* (2013) demonstraram a capacidade dos marcadores ISSR para caracterizar a diversidade genética de *A. flavus*. Entretanto, os 24 isolados de *A. flavus* não foram agrupados com base em suas

capacidades de sintetizar aflatoxina ou produzir esclerócios. Alguns isolados com diferentes capacidades de produção de aflatoxina estavam no mesmo grupo.

Fato semelhante foi encontrado neste estudo. O dendrograma indicou que a separação dos grupos não coincidiu com a filogenia do grupo. Em outras palavras, a análise de similaridade com base nos perfis genéticos das amostras, representados por fragmentos amplificados, não seguiu a divisão esperada de acordo com a classificação taxonômica conhecida entre as espécies. Na figura 4, no dendrograma podemos ver que *Aspergillus lentulus* indivíduos da mesma espécie em agrupamentos diferentes e *Penicillium* agrupado junto com espécies de *Aspergillus*.

No Grupo 3, embora tenha agrupado isolados da seção Fumigati, também incluiu isolados de *Penicillium*. Este resultado sugere que os marcadores genéticos utilizados não são adequados para uma delimitação precisa das espécies estudadas. A presença de isolados de diferentes gêneros dentro do mesmo grupo reforça a necessidade de desenvolver ou utilizar marcadores mais específicos para uma classificação taxonômica mais precisa.

Esses achados destacam a complexidade da classificação taxonômica baseada em perfis genéticos e a importância de selecionar marcadores apropriados para estudos de filogenia e taxonomia. Esse resultado sugere que, embora as amostras tenham sido previamente identificadas, os marcadores ISSR não trouxeram um agrupamento coeso, ou seja, não executaram uma identificação precisa das espécies crípticas. Esse tipo de resultado destaca a complexidade da relação entre a similaridade genética e as relações filogenéticas em espécies de *Aspergillus*.

O uso dos marcadores ISSR não foi ideal para separar espécies crípticas baseado na filogenia já estabelecida, isso sugere a necessidade de análises e estudos complementares com mais marcadores e utilizando um banco de dados maior para uma validação correta dos ISSR, uma abordagem com mais isolados pertencentes da mesma espécie, também poderia melhorar a relação dos marcadores com a filogenia.

Figura 4: Dendrograma das amostras identificadas e analisadas pelo Índice de Jaccard.

Nome da espécie (Seção | Série)

Conclusão

Em conclusão, os resultados obtidos indicam que, embora as amostras compartilhem características genéticas semelhantes, a separação dos grupos analisados não segue estritamente a filogenia. Isso destaca a complexidade relações genéticas e morfológicas entre as espécies, que podem ser influenciadas pela presença de espécies crípticas. Esses achados reforçam a importância de integrar métodos moleculares e filogenéticos mais abrangentes para uma análise mais precisa, visto que os marcadores ISSR não apresentaram eficácia na identificação.

Referências

A formatação das referências bibliográficas seguiu as regras de formatação da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT NBR 6023/2018.

BATISTA, P. P. et al. Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. **Genet Mol Res**, v. 7, n. 3, p. 706-717, 2008.

NEAL, Carolyn OS et al. Global population structure of *Aspergillus terreus* inferred by ISSR typing reveals geographical subclustering. **BMC microbiology**, v. 11, p. 1-7, 2011.

ZHANG, Chu-Shu et al. The effectiveness of ISSR profiling for studying genetic diversity of *Aspergillus flavus* from peanut-cropped soils in China. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 147-153, 2013.

AL-HADEITHI, Z. Using ISSR markers to build a phylogenetic of Barley Genotypes. **Journal of Science**, v. 56, n. 2C, p. 1682–1688, 2015.

ARASTEHFAR, A.; CARVALHO, A.; HOUBRAKEN, J.; LOMBARDI, L.; GARCIA-RUBIO, R.; JENKS, J. D.; et al. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From basics to clinics. **Studies in Mycology**, v. 100, p. 100115, set. 2021.

ARBONA, S. I. Commercial Agriculture and Agrochemicals in Almolonga, Guatemala. **Geographical Review**, v. 88, n. 1, p. 47–63, 1 jan. 1998.

BATISTA, P. P.; SANTOS, J. F.; OLIVEIRA, N. T.; PIRES, A. P. D.; MOTTA, C. M. S.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 706–717, 2008.

BROOKS, G. F.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A.; et al. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. Porto Alegre: AMG, 2012.

BRÜHL, C. A.; ARIAS ANDRES, M.; ECHEVERRÍA-SÁENZ, S.; BUNDSCHUH, M.; KNÄBEL, A.; MENA, F.; et al. Pesticide use in banana plantations in Costa Rica – A review of environmental and human exposure, effects and potential risks. **Environment International**, v. 174, p. 107877, 1 abr. 2023.

BUIED, A.; MOORE, C. B.; DENNING, D. W.; BOWYER, P. High-level expression of cyp51B in azole-resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 3, p. 512–514, 2 dez. 2012.

CAMPOS, Carlos Alberto Passinho. Fungicidas agrícolas azólicos e pressão seletiva de fenótipos resistentes em *Aspergillus fumigatus*. 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. 2022. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd ed. **CLSI supplement M38M51S**. Clinical and Laboratory Institute, Wayne, PA.

- COSTA, D. F. D.; VIEIRA, F. D. A.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. D. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 4, p. 970–976, dez. 2015.
- DENARDI, L. B. *Aspergillus* spp.: **suscetibilidade aos antifúngicos isolados e em associação por diferentes metodologias e detecção de mecanismos de resistência a azólicos**. 2018. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Embrapa, 2007.
- FORTÚN, J.; MEIJE, Y.; FRESCO, G.; MORENO, S. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 4, p. 201–208, 1 abr. 2012.
- GONÇALVES, S. Global Aspects of Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus* with Focus on Latin American Countries. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 5, 10 fev. 2017.
- GUINEA, J. Updated EUCAST Clinical Breakpoints against *Aspergillus*, Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 343, 6 dez. 2020.
- HATTI, A. D.; TAWARE, S. D.; TAWARE, A. S.; PANGRIKAR, P. P.; CHAVAN, A. M.; MUKADAM, D. S. Genetic diversity of toxigenic and non-toxigenic *Aspergillus flavus* strains using ISSR markers. **International Journal of Current Research**, v. 5, p. 061-066, 2010.
- KERMANI, Firoozeh *et al.* Diversity, molecular phylogeny and fingerprint profiles of airborne *Aspergillus* species using random amplified polymorphic DNA. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 1-10, 2016.
- KRIJGSHELD, P. *et al.* Development in *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 74, n. 1, p. 1-29, 2013.
- LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 310–350, 1 abr. 1999.
- LEONARDELLI, F.; MACEDO, D.; DUDIUK, C.; CABEZA, M. S.; GAMARRA, S.; GARCIA-EFFRON, G. *Aspergillus fumigatus* Intrinsic Fluconazole Resistance Is Due to the Naturally Occurring T301I Substitution in CYP51A_p. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 9, p. 5420–5426, 1 set. 2016.
- MEIS, J. F.; CHOWDHARY, A.; RHODES, J. L.; FISHER, M. C.; VERWEIJ, P. E. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1709, p. 20150460, 5 dez. 2016.
- NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. **ASM Science Journal**, v. 9, n. 1, p. 30-39, 2015.
- PÉREZ-CANTERO, A.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, L.; GUARRO, J.; CAPILLA, J. Azole resistance mechanisms in *Aspergillus*: update and recent advances. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 1, p. 105807, 1 jan. 2020.

- PONTES, L. **Vigilância de resistência frente a antifúngicos azólicos de isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus***. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- RASSIN, N. K.; AL-JUDY, N.; DHEEB, B. Molecular Identification of *Aspergillus fumigatus* Using ISSR and RAPD Markers. **Iraqi Journal of Science**, v. 56, n. 4A, p. 2788–2797, 2015.
- REN, J.; JIN, X.; ZHANG, Q.; ZHENG, Y.; LIN, D.; YU, Y. Fungicides induced triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with mutations of TR46/Y121F/T289A and its appearance in agricultural fields. **Journal of Hazardous Materials**, v. 326, p. 54–60, mar. 2017.
- RESENDIZ-SHARPE, A.; DEWAELE, K.; MERCKX, R.; BUSTAMANTE, B.; VEGA-GOMEZ, M. C.; ROLON, M.; *et al.* Triazole-Resistance in Environmental *Aspergillus fumigatus* in Latin American and African Countries. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 292, 1 abr. 2021.
- SEPÚLVEDA, Victoria E. *et al.* Genome sequences reveal cryptic speciation in the human pathogen *Histoplasma capsulatum*. **MBio**, v. 8, n. 6, p. 10.1128/mbio.01339-17, 2017.
- SILVA, M. R. da; OLIVEIRA, M. do S. P. de; MOURA, E. F.; RODRIGUES, S. de M. Seleção de primers ISSR para uso em genomas de camucamuzeiro. In: **17º Seminário de Iniciação Científica e 1º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental**, Belém-PA, 2013.
- TASHIRO, Masato *et al.* Antifungal susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates obtained in Nagasaki, Japan. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 584-587, 2012.
- VERMEULEN, E.; LAGROU, K.; VERWEIJ, P. E. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 26, n. 6, p. 493–500, dez. 2013.
- WOLFE, A. D. ISSR Techniques for Evolutionary Biology. **Methods in Enzymology**, v. 395, p. 134–144, 2005.
- ZHANG, C. S.; XING, F. G.; SELVARAJ, J. N.; YANG, Q. L.; ZHOU, L.; ZHAO, Y. J.; *et al.* The effectiveness of ISSR profiling for studying genetic diversity of *Aspergillus flavus* from peanut-cropped soils in China. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 147–153, 4 maio 2013.
- R., L. *et al.* **Cryptic aspergillosis: a rare entity and a diagnostic challenge**. *Access Microbiology*, v. 4, n. 4, 19 abr. 2022.