



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LARISSA DE SOUZA FERRANTI

***Aspergillus* SECTION *Nigri* ISOLADOS DE UVAS  
CULTIVADAS NO BRASIL**

---

Londrina  
2017



**Universidade Estadual de Londrina**

**Instituto de Tecnologia de Alimentos**

LARISSA DE SOUZA FERRANTI

***Aspergillus* SECTION *Nigri* ISOLADOS DE UVAS  
CULTIVADAS NO BRASIL**

Londrina  
2017

LARISSA DE SOUZA FERRANTI

***Aspergillus* SECTION *Nigri* ISOLADOS DE UVAS  
CULTIVADAS NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Beatriz Thie Iamanaka

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ferranti, Larissa de Souza .

*Aspergillus* SECTION Nigri ISOLADOS DE UVAS CULTIVADAS NO BRASIL / Larissa de Souza Ferranti. - Londrina, 2017.  
102 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro.

Coorientador: Dra. Beatriz Thie Iamanaka.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2017.

Inclui bibliografia.

1. *Vitis labrusca* - Tese. 2. *Aspergillus section Nigri* - Tese. 3. Micotoxinas - Tese. 4. *Aspergillus labruscus* - Tese. I. Fungaro, Profa. Dra. Maria Helena Pelegrinelli. II. Iamanaka, Dra. Beatriz Thie. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

LARISSA DE SOUZA FERRANTI

***Aspergillus* SECTION *Nigri* ISOLADOS DE UVAS CULTIVADAS NO  
BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr<sup>a</sup>. Marta Hiromi Taniwaki  
Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITA

---

Dr<sup>a</sup>. Marciane Magnani  
Universidade Estadual da Paraíba - UEP

---

Dr<sup>a</sup>. Elisabete Yurie Sataque Ono  
Universidade Estadual de Londrina

---

Dr<sup>a</sup>. Marcia Cristina Furlaneto  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de abril de 2017.

Aos meus pais, por me ensinar que nas dificuldades devemos ser valentes e transformá-las em experiências de vida, e que nunca devemos desistir dos nossos objetivos.

Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer meus pais, Palmyro e Maria José, por sempre estarem ao meu lado, me aconselhando, apoiando e incentivando minhas escolhas e conquistas. Por nunca deixarem de acreditar na sua filha. Vocês são essenciais para mim!

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Fungaro, pela oportunidade, confiança e apoio durante todo o doutorado, pela competência científica, acompanhamento nos trabalhos, ensinamentos e incentivos, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação. Além de me ensinar a ser uma pessoa bem melhor e mais forte. "Minha vida se tornou muito mais lógica!".

À minha co-orientadora e amiga, Dr<sup>a</sup>. Beatriz Iamanaka, pelas orientações, ensinamentos, acompanhamento e auxílio no desenvolvimento do projeto, tal qual pelas críticas, correções e sugestões de grande importância para meu trabalho. Sobretudo pela sua amizade, confiança e incentivos. Pelas inúmeras conversas, por me ouvir e me aconselhar nos períodos difíceis.

À Dr<sup>a</sup>. Marta Taniwaki, pela oportunidade e confiança concedida, pelos ensinamentos e por toda sua competência científica, que durante todos esses anos fez com que eu me tornasse uma profissional mais qualificada.

Ao Dr. Jens Frisvad, da Technical University of Denmark, pela execução das análises de metabólitos por toda sua sabedoria compartilhada.

Um agradecimento mais que especial à amiga e companheira de trabalho Fernanda Massi, que me auxiliou no desenvolvimento das análises moleculares, pelas inúmeras extrações de DNA realizadas, sequências de DNA analisadas, árvores filogenéticas criadas, além das correções dos artigos científicos, meu sincero agradecimento.

Às estagiárias e mestrandas do laboratório de micologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Aline, Adriana, Gabriela, Joseane, principalmente a Cristina Akemi, a Cris, pelas incontáveis placas inoculadas, fungos isolados, lâminas montadas, tubos de sílica

e ágar *plugs* preparados, sem esquecer do preparo de meios de cultura, amostras e análises de atividade de água e micotoxinas.

Ao Josué e ao Rafael pela ajuda imprescindível das análises dos dados moleculares, além de suas amizades.

À minha querida amiga Daniele Sartori, pelos ensinamentos, companheirismo e paciência para ouvir e aconselhar durante todos esses anos.

Aos pesquisadores, técnicos, funcionários e estagiários do laboratório de Microbiologia do CCQA do ITAL, que tive o privilégio de conviver e aprender durante todos esses anos de desenvolvimento da tese.

Aos meus irmãos, Frederico e Cássia, que sempre compartilhamos momentos de alegrias e superações e que agora posso dividir mais essa conquista, tão importante da minha vida com vocês!

A todos os meus familiares e amigos que me apoiaram, incentivaram e torceram pela futura “doutora”.

Ao Programa de Pós-Graduação de Genética e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade e confiança.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) pela oportunidade de poder desenvolver parte do meu projeto em um laboratório de referência que se tornou praticamente a minha segunda casa!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto.

**A TODOS MEU SINCERO OBRIGADO!!**

*"O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou,  
mas sim pelas dificuldades que superou no caminho"*

Abraham Lincoln

FERRANTI, Larissa de Souza. *Aspergillus section Nigri* isolados de uvas cultivadas no Brasil. 2017. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina.

## RESUMO

O cultivo, comercialização e industrialização da uva e de seus derivados têm apresentado importante papel econômico-social no cenário brasileiro. As uvas são alimentos altamente suscetíveis à contaminação por fungos particularmente pelas espécies de *Aspergillus section Nigri*, que tem sido frequentemente detectados em uvas e recebem atenção especial, pois algumas espécies são capazes de produzir micotoxinas, tais como ocratoxina A (OTA) e fumonisina B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>). O objetivo deste estudo foi investigar a presença de espécies de *A. section Nigri* em uvas *Vitis labrusca* (variedades "Bordo", "Cora", "Violeta", "Coder", "Rudder" e "Niagara") e híbridos interespecíficos de *V. labrusca* x *V. vinifera*. (variedades Isabel) usadas para produzir vinho tinto de mesa e sucos de uva em quatro regiões produtoras do Brasil. Foram estudadas a capacidade dos isolados para produzir OTA e FB<sub>2</sub>, bem como a presença dessas micotoxinas nas uvas. Oitenta e oito amostras de uvas foram coletadas dos principais estados produtores de uva do Brasil: Rio Grande do Sul ( $n = 30$ ), Pernambuco ( $n = 21$ ), São Paulo ( $n = 21$ ) e Paraná ( $n = 16$ ). *Aspergillus* pertencentes à seção *Nigri* foram isolados e identificados combinando morfologia, análise de sequências de DNA e análise de perfil de metabólitos secundários. *A. section Nigri* foram encontrados em todas as amostras de uva colatadas nos estados de Pernambuco e São Paulo, com contaminação média de 66,3% e 18,2%, respectivamente. As uvas do Paraná e Rio Grande do Sul também mostraram a presença de *A. section Nigri*, no entanto em níveis mais baixos (8,5% e 4,5%, respectivamente). Um total de 2.042 cepas de *A. section Nigri* foram analisadas e organizadas em três grupos de acordo com a caracterização morfológica: *A. section Nigri* uniseriados (79,3%), *A. niger* "agregado" (18,2%) e *A. carbonarius* (2,4%). A fim de identificar as espécies encontradas, 248 isolados foram submetidos ao sequenciamento de uma porção do gene que codifica para calmodulina. Dentre os *A. niger* "agregado" foram identificadas as seguintes espécies: *A. niger sensu stricto*, *A. welwitschiae* e *A. vadensis*. Dentre os uniseriados de *A. section Nigri* as seguintes espécies foram reconhecidas: *A. japonicus*, *A. uvarum*, *A. brunneoviolaceus* e *A. aculeatus*. Neste trabalho destaca-se também a descrição pela primeira vez de uma espécie pertencente à *Aspergillus section Nigri* nomeada *A. labruscus*. Esta espécie apresentou características morfológicas, sequencias de nucleotídeos e perfil de metabólitos secundários distintos das demais espécies pertencentes à *Aspergillus section Nigri*. Esta nova espécie não se caracterizou como produtora de OTA e FB<sub>2</sub>, mas sim de ácido secalônico D. Quanto à capacidade de produção de micotoxinas, 3,2% do total de isolados de *Aspergillus section Nigri* ( $n = 2.042$ ) foram produtores de ocratoxina A, e de 373 *A. niger* "agregado" testados para fumonisina B<sub>2</sub>, 42,1% foram produtores. No entanto, as 88 amostras de uvas não estavam contaminadas com estas micotoxinas.

**Palavras-chave:** *Vitis labrusca*. *Aspergillus section Nigri*. Ocratoxina A. fumonisina B<sub>2</sub>. *Aspergillus labruscus*.

FERRANTI, Larissa de Souza. *Aspergillus* section *Nigri* isolated from grapes grown in Brazil. 2017. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina.

### Abstract

The cultivation, commercialization and industrialization of grapes and their derivatives has taken an important economic-social role in the Brazilian scenario. Grapes are highly susceptible to fungus contamination, particularly of the *Aspergillus* section *Nigri* species which have been frequently detected on grapes and receive special attention because some species are capable of producing mycotoxins, such as ochratoxin A and fumonisin B<sub>2</sub>. The objective of this study investigated the presence of *Aspergillus* species belonging to *A.* section *Nigri* on *Vitis labrusca* (varieties "Bordo", "Cora", "Violeta", "Coder", "Rudder" and "Niagara") and interspecific hybrids of *V. labrusca* x *V. vinifera*. (varieties "Isabel") used to produce red table wine and grape juice in four production regions of Brazil. The ability of the isolates to produce ochratoxin A (OTA) and fumonisin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) as well as the presence of these mycotoxins in grapes were studied. Eighty-eight samples were collected from the main grape producing states in Brazil: Rio Grande do Sul (*n* = 30), Pernambuco (*n* = 21), São Paulo (*n* = 21) and Paraná (*n* = 16). The *A.* section *Nigri* were isolated and identified combining morphology, DNA sequences and secondary-metabolite profile analysis. *A.* section *Nigri* were detected in all grape samples from Pernambuco and São Paulo, with average contamination of 66.3% and 18.2% respectively. Grapes from Paraná and Rio Grande do Sul also showed the presence of *A.* section *Nigri* but at lower levels (8.5% and 4.5% respectively). A total of 2,042 *A.* section *Nigri* strains was analyzed and clustered in three groups according to morphology characterization: *Aspergillus* section *Nigri* uniseriate (79.3%), *A. niger* "aggregate" (18.2%) and *A. carbonarius* (2.4%). In order to precisely identify the *Aspergillus* species, 248 strains were subjected to calmodulin sequencing. Among the *A. niger* "aggregate" representatives, the following species were identified: *A. niger sensu stricto*, *A. welwitschiae* and *A. vadensis*. Among the *A. sec Nigri* uniseriate group, the following species were recognized: *A. japonicus*, *A. uvarum*, *A. brunneoviolaceus* and *A. aculeatus*. In this work we also highlight the description of a species belonging to the *Aspergillus* section *Nigri* for the first time, named *A. labruscus*. This species showed morphological characteristics, nucleotide sequences and secondary metabolites profile distinct from the other species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. This species was not OTA and FB<sub>2</sub> producers but are able to produce secalonic acid D. Regarding mycotoxin-production capacity, 3.2% of the total isolates of *Aspergillus* section *Nigri* (*n* = 2,042) were OTA producers, and from 373 *A. niger* "aggregate" tested, 42.1% were FB<sub>2</sub> producers. However, the 88 grape samples were not contaminated with these mycotoxins.

**Keywords:** *Vitis labrusca*. *Aspergillus* section *Nigri*. ochratoxin A. fumonisin B<sub>2</sub>. *Aspergillus labruscus*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão da Literatura

- Figura 1** – (A) Características microscópicas das estruturas de *Aspergillus* sp (1000x); (B) Características macroscópicas de *A. niger* em CYA ..... 28
- Figura 2** – Árvore filogenética baseada em dados de sequências do gene parcial da calmodulina das 26 espécies de *A. section Nigri* descritas na literatura ..... 31
- Figura 3** – Estrutura química da OTA ..... 33
- Figura 4** – Estruturas química da FB<sub>2</sub> ..... 36
- Figura 5** – Comparação estabelecida entre os clusters de biossíntese de fumonisinas de *F. verticillioides* e de *A. niger* ..... 37
- ### Artigo Científico 1
- Figure 1** – Neighbor-Joining phylogenetic tree based on partial *CaM* gene sequence data for 189 *A. section Nigri* uniseriate obtained in the present study and those retrieved from GenBank for each *A. section Nigri* type strains ..... 50
- Figure 2** – Neighbor-Joining phylogenetic tree based on partial *CaM* gene sequence data for 59 *A. niger* "aggregate" obtained in the present study and those retrieved from GenBank for each *A. section Nigri* type strains. Jointly with the strains of *A. niger* and *A. welwitschiae* are included their ability to produce OTA and FB<sub>2</sub> ..... 51
- Figure 3** – Chromatogram: A) OTA standard; B) Grape sample not contaminated by OTA; C) FB<sub>2</sub> standard; D) Grape sample not contaminated by FB<sub>2</sub>..... 54

## Artigo Científico 2

- Figure 1** – Neighbor-Joining phylogenetic tree based on partial calmodulin gene sequence data for *Aspergillus* section *Nigri*. Bootstrap percentages (based on 1000 resampled datasets) are shown at nodes ..... 69
- Figure 2** – Sequence alignment of ITS1 from *Aspergillus labruscus*, *A. aculeatus*, *A. homomorphus*, *A. japonicus* and *A. saccharolyticus* ..... 70
- Figure 3** – *Aspergillus labruscus* sp. nov. CCT 7800. (a) Colonies on CYA at 25°C, (b) MEA at 25°C, (c) CREA at 25°C, (d) CYA at 33°C, (e) CYA at 30°C, (f) CYA at 20°C, (g) CYA at 15°C and (h) CYA at 10 °C ..... 73
- Figure 4** – *Aspergillus labruscus* sp. nov. CCT 7800. (a) Colonies on CYA, (b) colonies on MEA, (c) conidiophores under light microscopy, (d) conidia under light microscopy, (e-f) conidiophores as seen using SEM, (g) conidia as seen using SEM, (h) stipe as seen using SEM. Bars, 10 µm (c, f and h ), 5 µm (d and g), 50 µm (e)..... 73

## LISTA DE TABELAS

### Artigo Científico 1

<b>Table 1</b> - Water activity, frequency of occurrence, average of contamination and range of contamination by <i>A. section Nigri</i> for the states of Paraná, Rio Grande do Sul, Pernambuco and São Paulo .....	49
<b>Table 2</b> - Phenotypic characteristics of each <i>A. section Nigri</i> species isolated from grapes in the present study .....	53

### Artigo Científico 2

<b>Table 1</b> – Extrolite profiles of <i>Aspergillus labruscus</i> strains* .....	71
<b>Table 2</b> - <i>Aspergillus labruscus</i> isolates from grapes grown in Rio Grande do Sul State .....	75
<b>Table 3</b> – Incidence of <i>Aspergillus labruscus</i> on grape berry samples ( <i>Vitis labrusca</i> ) from Rio Grande do Sul, Brazil .....	76
<b>Table 4</b> – Production extracellular enzymes: tannase and caseinase of <i>A. labruscus</i> , <i>A. homomorphus</i> and <i>A. saccharolyticus</i> .....	77

## LISTA DE ABREVIACOES E UNIDADES

°C	Graus Celsius
μ	<i>micron</i>
μg	Micrograma
μL	Microlitros
μM	Micromolar
μm	Micrometro
A	Adenina
ABI	<i>Applied Biosystems</i>
AC	<i>Average of Contamination</i>
AF	Aflatoxina
AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
A <sub>w</sub>	Atividade de água
<i>benA</i>	Gene da β-tubulina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLASTN	<i>Nucleotide BLAST</i>
C	Citosina
<i>CaM</i>	Gene da calmodulina
CAPES	Coordenao de Aperfeioamento de Pessoal de Nível Superior
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CCT	Coleo de cultura da Fundao André Tosele
CFU	<i>Colony-forming Units</i>
Cm	Centímetros
cmd5	<i>Primer de Calmodulina forward</i>
cmd6	<i>Primer de Calmodulina reverso</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Co	<i>Company</i>
Cv	Cultivar
CYA	Meio de cultura <i>Czapek Yeast Autolysate agar</i>
CYAS	Meio de cultura <i>Czapek Yeast Autolysate agar with 5% NaCl</i>
CY20S	Meio de cultura <i>Czapek Yeast Extract 20% Sucrose agar</i>
CREA	Meio de cultura <i>Creatine Sucrose agar</i>
d	Dias

DG18	Meio de cultura <i>Dichloran 18% Glycerol agar</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
nrDNA	DNA nuclear ribossomal
dNTP	Trifosfato de desoxirribonucleotídeo
DRBC	Meio de cultura <i>Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar</i>
ELEM	Leucoencefalomalácia
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FB <sub>1</sub>	Fumonisina B <sub>1</sub>
FB <sub>2</sub>	Fumonisina B <sub>2</sub>
FB <sub>3</sub>	Fumonisina B <sub>3</sub>
FB <sub>4</sub>	Fumonisina B <sub>4</sub>
FB <sub>6</sub>	Fumonisina B <sub>6</sub>
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
Fig	Figura
FO	<i>Frequency of Occurrence</i>
<i>Fum</i>	Gene que codifica a fumonisina
G	Gramas
G	Guanina
GRAS	<i>Generally Regarded as Safe</i>
H	Horas
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBT	<i>Technical University of Denmark</i>
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Kb	Kilobase
Kg	Kilograma
L	Litro
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
Ltd	<i>Limited</i>
M	Molar

mm	Milímetros
mM	Milimolar
MEA	Meio de cultura <i>Malt Extract Autolysate agar</i>
Mg	Miligrama
Min	Minutos
mL	Mililitro
Mod	Modelo
N	Número
Nº	Número
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ng	Nanogramas
Nm	Nanômetros
NTD	<i>Neural Tube Defect</i>
OAT	Meio de cultura <i>Oatmeal agar</i>
OPA	Reagente <i>Ortho-phthaldialdehyde</i>
OTA	Ocratoxina A
p	Peso
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PKS	Gene da <i>Polyketide Synthases</i>
RC	<i>Range of Contamination</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RefSeq	<i>Reference Sequence</i>
RPB2	Gene da <i>RNA Polymerase II</i>
rpm	Rotação por minuto
rRNA	RNA ribossomal
RNA	Ácido ribonucleico
S	Subunidade
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
T	Timina
T	<i>Type</i>

TAN	Meio de cultura <i>Tannin Sucrose agar</i>
TLC	<i>Thin-layer Chromatography</i>
U	Unidades
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UHPLC-DAD	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detection</i>
UK	Reino Unido
USA	Estados Unidos da América
UV	Luz ultravioleta
v	Volume
YESA	Meio de cultura <i>Yeast Extract Sucrose agar</i>
w	<i>Watts</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	21
<b>2.1</b>	<b>Uva: Aspectos gerais e sua importância econômica</b>	21
<b>2.2</b>	<b>Fungos em uvas</b>	25
<b>2.3</b>	<b><i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i></b>	26
2.3.1	<u>Morfologia e fisiologia</u>	27
2.3.2	<u>Sequências de nucleotídeos</u>	28
2.3.3	<u>Metabólitos secundários</u>	31
<b>2.7</b>	<b>Micotoxinas produzidas por <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i></b>	32
2.7.1	<u>Ocratoxina A</u>	33
2.7.2	<u>Fumonisinás</u>	35
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	40
<b>3.1</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	41
<b>4.1</b>	<b>Artigo Científico 1: Diversity of <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> on the surface of <i>Vitis labrusca</i> grape varieties and its hybrids</b>	41
<b>4.2</b>	<b>Artigo Científico 2: <i>Aspergillus labruscus</i> sp. nov., a new species of <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> discovered in Brazil</b>	66
	<b>CONCLUSÕES FINAIS</b>	86
	<b>REFERÊNCIAS</b>	87

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo, comercialização e industrialização da uva e de seus derivados têm apresentado, no decorrer dos anos, importante papel sócioeconômico para vários países. Dentre as espécies de *Vitis* cultivadas no mundo, a de maior destaque é *Vitis vinifera* especialmente devido ao fato de permitir a obtenção de vinhos de alta qualidade. No Brasil, são várias as espécies cultivadas para consumo *in natura* ou processamento, porém dentre as 700 mil toneladas de uvas colhidas em 2015, 90% corresponderam a cultivares de *V. labrusca* ou de híbridos interespecíficos de *V. labrusca* x *V. vinifera*. Cerca de 50% da produção brasileira de uvas é destinada à obtenção de produtos processados, especialmente sucos de uva, vinhos finos e vinhos de mesa. Várias espécies fúngicas podem estar presentes nos vinhedos e, especialmente, no período da colheita algumas destas espécies podem encontrar condições favoráveis para infectar as uvas e produzir micotoxinas, tais como ocratoxina A (OTA) e fumonisinas (FB<sub>2</sub>, FB<sub>4</sub>, FB<sub>6</sub>).

A OTA é considerada nefrotóxica, teratogênica, imunotóxica e, possivelmente carcinogênica para humanos, conforme classificação da Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC). As fumonisinas são neurotóxicas, hepatotóxicas, nefrotóxicas e estão, possivelmente, associadas com o cancer de esôfago e defeitos no tubo neural em seres humanos. No Brasil, o Ministério da Saúde (ANVISA, 2011) por meio da Resolução RDC N<sup>o</sup>7, de 18 de Fevereiro de 2011, estabeleceu os limites máximos tolerados para ocratoxina A de 2 µg/Kg para vinhos, sucos e polpa de uva. Para as fumonisinas, até o presente momento, os limites máximos toleráveis para uvas e seus derivados, ainda não foram estabelecidos, uma vez que a descoberta da presença de fumonisinas em uvas é recente. Dentre os fungos produtores de ocratoxinas e fumonisinas estão algumas espécies de *Aspergillus* pertencentes à A. seção *Nigri*, os quais vêm sendo consideradas as responsáveis pela contaminação de uvas e seus derivados com as referidas micotoxinas.

Entretanto, a taxonomia de A. section *Nigri* tem sido considerada uma das mais confusas do gênero, pois algumas espécies são difíceis de identificar baseando-se apenas em seus caracteres morfológicos, sendo necessário a utilização de diferentes procedimentos (análises de morfologia, sequências de nucleotídeos, e de metabólitos secundários), os quais juntos vem sendo denominados de taxonomia polifásica, para a identificação até o nível de espécie. Até o momento, 26 espécies são descritas como

pertencentes a *A. section Nigri*, e dentre elas somente *A. sclerotium*, *A. niger stricto sensu*, *A. welwitschiae* e *A. carbonarius* são consideradas produtoras de ocratoxinas e/ou fumonisinas. *A. carbonarius* possui morfologia distinta das demais espécies da seção, porém *A. niger stricto sensu* e *A. welwitschiae* são espécies morfologicamente idênticas a várias outras espécies não produtoras de ocratoxinas e fumonisinas.

Considerando que OTA e FB<sub>2</sub> vem sendo detectadas com frequência em uvas de cultivares *V. vinifera* produzidas em vários países do mundo, e que existe uma escassez de dados acerca da presença destas micotoxinas e dos fungos produtores em *V. labrusca*, este trabalho teve como objetivo investigar a presença de *A. section Nigri* em amostras de uvas e solos coletados em vinhedos dos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Pernambuco. Além disso, constituiu-se como objetivo deste trabalho a análise da presença de OTA e FB<sub>2</sub> nas referidas amostras. Os resultados obtidos neste trabalho são apresentados na forma de dois artigos científicos. No primeiro deles descreve-se a incidência de *A. section Nigri* nas amostras analisadas, as espécies mais frequentemente encontradas, o percentual de isolados fúngicos toxigênicos e a presença/ausência de ocratoxina A e fumonisina B<sub>2</sub> nas uvas. Considerando que neste estudo foi encontrada uma espécie que até o momento não foi descrita na literatura, o segundo artigo trata da caracterização desta nova espécie, utilizando as ferramentas da taxonomia polifásica.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Uva: Aspectos gerais e sua importância econômica

A uva está entre as frutas mais cultivadas no mundo, com produção em torno de 75 milhões de toneladas na safra 2013/2014, segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO (FAOSTAT, 2014). O maior produtor mundial é a China (11,55 milhões de toneladas), seguida por Itália (8,01 milhões de toneladas), Estados Unidos (7,75 milhões de toneladas), Espanha (7,48 milhões de toneladas) e França (5,52 milhões de toneladas). Na América do Sul, o Brasil ocupa a terceira posição, com produção de 1,44 milhões de toneladas, seguido do Chile (3,30 milhões de toneladas) e da Argentina (2,88 milhões de toneladas).

A viticultura é atividade tradicionalmente desenvolvida em regiões de clima temperado, mas em função da adaptação da videira a uma grande diversidade de climas, no Brasil, o seu cultivo de uvas ocorre desde o extremo Sul, onde se registram temperaturas mais baixas até regiões de clima semiárido encontrados no Nordeste. Na viticultura de clima temperado, destacam-se as regiões Sul e Sudeste, abrangendo as regiões Norte e Central do Rio Grande do Sul, as regiões do Vale do Rio do Peixe e Planalto Sul de Santa Catarina, a região Sul de Minas Gerais, e a região Sudeste do Estado de São Paulo. Mais de 90% da produção de uvas em clima temperado são destinados ao processamento e fabricação de sucos, vinhos, e outros derivados (PROTAS; CAMARGO, 2011; IBRAVIN, 2017).

No entanto, nas últimas décadas tem ocorrido um crescente desenvolvimento do setor viticultor na região do Vale do São Francisco (Pernambuco), que devido ao seu clima semiárido, distingue-se das demais regiões tradicionais produtoras de uvas e vinhos de todo o mundo (PROTAS; CAMARGO, 2011; MELLO, 2016).

Conforme historiado por pesquisadores da Embrapa (PROTAS; CAMARGO, 2011; MELLO 2013) a primeira introdução da videira no Brasil foi feita pelos colonizadores portugueses em 1532, por meio de Martin Afonso de Souza, na então Capitania de São Vicente, hoje Estado de São Paulo. Por meio de introduções posteriores, a viticultura expandiu-se para outras regiões do país, sempre com cultivares de *V. vinifera* procedentes de Portugal e da Espanha. Nas primeiras décadas do século XIX, com a importação das uvas americanas procedentes da América do Norte, foram introduzidas as doenças fúngicas que levaram a viticultura colonial à decadência. A

partir de então, as cultivares americanas, especialmente aquela denominada “Isabel”, passaram a ser plantadas nas diversas regiões do país, tornando-se a base para o desenvolvimento da vitivinicultura comercial nos Estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo. A variedade Isabel é uma das mais antigas variedades americanas, mas sua exata origem tem sido objeto de muita especulação. Sabe-se que esta variedade descende de *V. labrusca*, entretanto há a hipótese de que não seja *V. labrusca* pura, mas sim um híbrido interespecífico *V. labrusca* x *V. vinifera* (ROBINSON; HARDING; VOUILLAMOZ, 2013).

Nas condições edafoclimáticas de várias regiões brasileiras, *V. labrusca* tem elevada produtividade devido a sua maior resistência às doenças que acometem os cultivares de *V. vinifera*, como o míldio, principal doença fúngica ocorrida em videira no Brasil. Assim, o cultivo de *V. labrusca* se consolidou como uma interessante alternativa para a produção de uvas para consumo *in natura* e para processamento (PROTAS; CAMARGO, 2011). Os frutos das variedades de *V. labrusca*, bem como das variedades híbridas (*V. labrusca* x *V. vinifera*) são até hoje conhecidos como "uvas rústicas" ou "uvas americanas".

O cultivo de uvas rústicas é uma atividade importante para a sustentabilidade de pequena propriedade rural no Brasil, se tornando relevante ao desenvolvimento de algumas regiões, com a geração de emprego e renda familiar, cultivando uvas de mesa e uvas para processamento. Na principal região produtora de uvas do Brasil, o Rio Grande do Sul, onde o clima temperado caracteriza-se por um ciclo anual, seguido de um período de dormência induzido pelas baixas temperaturas do inverno (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011), a viticultura está também fortemente ligada ao turismo (MELLO, 2013).

Em 2015, a produção brasileira de uvas destinadas ao processamento (vinho, suco e derivados) atingiu 781 milhões de quilos, representando 52,1% da produção nacional. O restante da produção (47,9%) foi destinado ao consumo *in natura*. A quantidade de uvas processadas para elaboração de vinhos e sucos apresentou aumento de 16% em 2015, comparativamente ao ano de 2014 (MELLO, 2016).

O aumento do consumo e da comercialização de suco de uva no Brasil é devido à expansão do cultivo da fruta e do crescimento populacional, além da divulgação de estudos que comprovam a relação entre o consumo diário desse produto com os benefícios à saúde humana (MELLO, 2013). A uva é importante fonte de carboidratos e vitaminas, C e do complexo B, além de apresentar sais minerais como ferro, cálcio e

potássio. A composição química e fenólica do suco de uva varia de acordo com a espécie, variedade, estágio de maturação, condições climáticas, condições de cultivo e de processamento (RIZZON; MENEGUZZO, 2007; JACKSON, 2008). Os principais compostos fenólicos presentes no suco de uva são os flavonóides, estilbenos e os ácidos fenólicos (ROMERO-PÉREZ et al., 1999; MALACRIDA; MOTTA, 2005; JACKSON, 2008). Os sucos de uva brasileiros são produzidos a partir de uvas americanas, principalmente das variedades Isabel, Bordô e Concord (RIZZON; MIELE, 2012). Conforme a legislação brasileira trata-se de uma bebida nutritiva e não fermentada, obtida do mosto simples, diluído ou concentrado, de uva sadias, frescas e maduras. É extraído da uva por meio de processo tecnológico adequado, e submetido a tratamento que assegure sua conservação até o consumo (BRASIL, 1988; BRASIL, 2000; RIZZON; MENEGUZZO, 2007). A legislação brasileira classifica o suco de uva em: integral, em que o açúcar provém exclusivamente da uva, sendo vedada sua adição na forma de sacarose; suco de uva reprocessado ou reconstituído que é aquele obtido através da diluição do mosto concentrado; e o suco concentrado que é obtido através de desidratação parcial com teor final mínimo de sólidos solúveis de 65 °Brix (BRASIL, 2004).

O processo para a produção do suco deve se preocupar em preservar ao máximo as características organolépticas da uva fresca, mantendo seu aroma, sabor, coloração, entre outras propriedades. Para isso, é necessário evitar as alterações de origem biológica e/ou as causadas por ação de enzimas presentes naturalmente no suco (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). Estudos revisados por Brewer et al. (2011) mostraram que os fabricantes de sucos de uva, nos últimos anos, vêm intensificando sua atenção em estabelecer condições ótimas de processo com o objetivo de aumentar a retenção das substâncias bioativas em seus produtos, que podem auxiliar na saúde dos consumidores, o que vem sendo uma tendência na indústria alimentícia.

As uvas *V. labrusca* também são utilizadas, no Brasil, para a produção de vinhos, denominados “vinhos de mesa”. O vinho de mesa é um vinho artesanal, possui sabor e aroma mais adocicado, comparado aos vinhos que utilizam as uvas europeias (*V. vinifera*). O consumo deste tipo de vinho está presente no hábito da população de algumas regiões brasileiras e apresenta grande importância econômica para o país. Em 2015, a produção de vinho de mesa no Rio Grande do Sul, o principal estado produtor no Brasil, atingiu 210 milhões de litros (IBRAVIN, 2016).

O vinho é uma bebida resultante da fermentação alcoólica completa ou parcial da uva fresca, esmagada ou não, ou do mosto simples ou virgem, com um conteúdo de álcool adquirido mínimo de 7% (BRASIL, 1988). Trata-se de uma das bebidas fermentadas mais antigas e que apresenta elevado valor cultural (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007). No entanto, diversos fatores podem influenciar a qualidade final de um vinho, dentre eles podemos citar: a variedade da uva, as práticas agrícolas, as condições climáticas de plantio, a maturação da uva, bem como pelas leveduras utilizadas no processo de fermentação (JACKSON; LOMBARD, 1993).

O setor brasileiro de vinho apresenta uma característica marcante que o distingue de outros mercados no restante do mundo. Enquanto o mercado externo exige uvas das variedades européias (*V. vinifera*), no Brasil, também são aceitos produtos originários das variedades americanas (*V. labrusca* e *V. bourquina*). Atualmente no país, cerca de 85% da produção de vinho é oriunda de variedades de *V. labrusca*, enquanto que as variedades de *V. vinifera* representam cerca de 15% (FAOSTAT, 2014; UVIBRA, 2016). Os vinhos de mesa fabricados a partir da variedade *V. labrusca* ou híbridas têm grande aceitação pela população brasileira e representam a maior parte da produção, porém, as uvas que dão origem a estes vinhos ainda foram pouco estudadas pela comunidade científica, e quase a totalidade dos artigos científicos publicados estão relacionados com as uvas *V. vinifera*, destinadas à produção de vinhos finos, que são aceitos pelos consumidores dos demais países do mundo.

O vinho é constituído quimicamente por uma grande variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas, dentre elas se destacam os compostos fenólicos que estão associados à redução de doenças cardiovasculares além de possuir atividade antioxidante e anti-inflamatória, combatendo o colesterol, envelhecimento precoce e prevenindo contra alguns tipos de câncer (PHARM et al., 2014). O resveratrol pode ser encontrado principalmente em uvas e seus derivados além de estar presente em alimentos como: amendoim, cacau, morangos e "*cranberries*" (PHARM et al., 2014; COUNET et al., 2006; BRADAMENTE; BARENGHI; VILLA, 2004). A produção do resveratrol em tecidos vegetais, é estimulada tanto por fatores abióticos (UV e ozônio) como fatores bióticos (bactérias e fungos) (JEANDET et al., 1995).

## 2.2 Fungos em uvas

A videira pode ser infectada por fungos que afetam as bagas e causam perda na qualidade das uvas. Alguns patógenos são capazes de destruir o tecido do fruto, outros impedem o amadurecimento do fruto, e alguns fungos produzem substâncias que podem conferir sabor e odor desagradáveis além das micotoxinas. As doenças ocorridas nas videiras podem se espalhar rapidamente se houver condições favoráveis podendo causar epidemias (KÖNIG; UNDEN; FRÖHLICH, 2009).

Várias espécies de fungos podem ocorrer nos vinhedos e dependendo das condições ambientais infectarem as bagas (PITT; HOCKING, 1997). Na superfície das bagas de uvas, o crescimento fúngico é dependente, principalmente, de fatores como: a umidade e a temperatura do ambiente, a variedade de uva, o estágio de maturação das bagas, a localização dos cachos de uva, os danos físicos causados por ataque de aves e insetos e a aplicação de agrotóxicos (fungicidas e inseticidas). A camada de cutícula cerosa presente na superfície externa da uva, também influencia no desenvolvimento de microrganismos, pois esta interfere na aderência das células microbianas e na sua capacidade de colonizar a superfície da uva (HARDIE; BRIEN; JAUDZEMS, 1996).

A revisão de literatura elaborada por Somma et al., (2012) apresenta que quando a umidade é alta e a temperatura varia entre 20-30°C os fungos mais comumente encontrados em uvas no campo são *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Cladosporium* e *Rhizopus*. No entanto, durante a maturação aumenta a incidência de fungos deterioradores, tais como *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Quando a temperatura é mais alta, os *A. section Nigri* predominam nas bagas das uvas e, principalmente, no momento da colheita os fungos encontram condições ótimas para a infecção das bagas.

*Aspergillus* spp. são amplamente distribuídos na natureza, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Estudos revelam que algumas espécies de *Aspergillus* são produtores de aflatoxinas (AF), ocratoxina A (OTA) e fumonisinas B<sub>2</sub>, B<sub>4</sub> e B<sub>6</sub> (FB<sub>2</sub>, FB<sub>4</sub> e FB<sub>6</sub>) dentre outras toxinas. Desta maneira a presença destes fungos nas uvas pode resultar em contaminação por micotoxinas nesta fruta e em seus produtos derivados (PITT; HOCKING, 2009). *A. section Flavi* tem sido raramente encontrados em videiras, no entanto, em um estudo realizado no Líbano, em que foram analisadas 470 amostras de uvas, 209 (43,1%) cepas de *A. section Flavi* foram isoladas, e dentre o total de isolados de *A. flavus*, 43,4% foram produtores de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)

(KHOURY et al., 2008). Da mesma forma, Bellí et al. (2006), encontraram uma baixa incidência de *A. section Circumdati*, com média de contaminação de 0,16%, em uvas (*V. vinifera*) coletadas em vinhedos da Espanha. *A. section Circumdati* não foram isolados de videiras portuguesas nem francesas (SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005; SAGE; GARON; SEIGLE-MURANDI, 2004). Por outro lado, *A. section Nigri* foram relatados como os principais fungos toxigênicos encontrados em uvas produzidas ao redor do mundo (MAGNOLI et al., 2003; SAGE; GARON; SEIGLE-MURANDI, 2004; MEDINA et al., 2005; BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2006; VISCONTI et al., 2008; KHOURY et al., 2008; SPADARO et al., 2012; CHIOTTA et al., 2013; MIKUŠOVÁ et al., 2014; GARCIA-CELA et al., 2015).

### **2.3 *Aspergillus section Nigri***

*A. section Nigri* também denominados “*black aspergilli*”, são de grande importância, devido ao fato, de muitas de suas espécies causarem deterioração de alimentos. Por outro lado, algumas de suas espécies como o *A. niger*, são utilizadas na indústria para produção de enzimas, na maturação de queijos, na fermentação de molhos, na produção de ácidos orgânicos e para biotransformação. Até o momento, *A. niger* possui certificação GRAS (Generally Regarded as Safe), pelo FDA (US Food and Drug Administration), ou seja, é considerada segura a utilização desses microrganismos em bioprocessos, embora alguns isolados sejam capazes de produzir micotoxinas.

*A. section Nigri* estão presentes no solo e são considerados os fungos mais comuns, causadores de deterioração de alimentos e biodegradação de materiais (ABARCA et al., 2004; SAMSON et al., 2004; FERRACIN et al., 2009). Estas espécies podem contaminar alimentos e rações em diferentes etapas, incluindo pré e pós-colheita, no processamento e durante a manipulação destes alimentos (ABARCA et al., 2004; SAMSON et al., 2004; COPETTI et al., 2011; TANIWAKI et al., 2017). Estudos mostraram que *A. niger*, juntamente com *A. carbonarius* e *A. japonicus*, são responsáveis por perdas econômicas na pós-colheita de frutas frescas como maçãs, peras, pêssegos, frutas cítricas, uvas, figos, morangos, tomates, melões e alguns vegetais, especialmente cebola, alho e inhame, sendo também um dos fungos mais comuns isolados em frutas secas, grãos, sementes e castanhas (JECFA, 2002).

Diversos estudos revelam que *A. section Nigri* são os mais importantes fungos toxigênicos presentes nas uvas, com médias de contaminação reportadas variando de 5 a

83% (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006; MAGNOLI et al., 2003; SAGE; GARON; SEIGLE-MURANDI, 2004; BELLÍ et al., 2004; BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2006; SERRA et al., 2005; TJAMOS; ANTONIOU; TJAMOS, 2006; BEJAOUI et al., 2006; PONSONE et al., 2007; LASRAM et al., 2012; SPADARO et al., 2012; CHIOTTA et al., 2013; MIKUŠOVÁ et al., 2014; GARCIA-CELA et al., 2015). As espécies de *A. section Nigri* mais frequentes nas uvas são bisseriadas, principalmente as espécies do grupo do agregado de *A. niger*. No entanto, estudos realizados com uvas argentinas e italianas demonstraram altos índices de contaminação por *A. section Nigri* que são uniseriados (LOGRIECO et al., 2009; MOGENSEN et al., 2010; VARGA et al., 2010; CHIOTTA et al., 2011).

Devido à complexidade, a taxonomia dos fungos pertencentes à *A. section Nigri* apresenta-se como uma das mais confusas do gênero (SAMSON et al., 2007), não havendo um método único de análise (morfológica, fisiológica ou molecular) que identifique perfeitamente todas as espécies da seção. Samson et al. (2007), sugeriram uma abordagem polifásica para identificação de *A. section Nigri* utilizando análise morfológica, molecular, e perfil de metabólitos secundários.

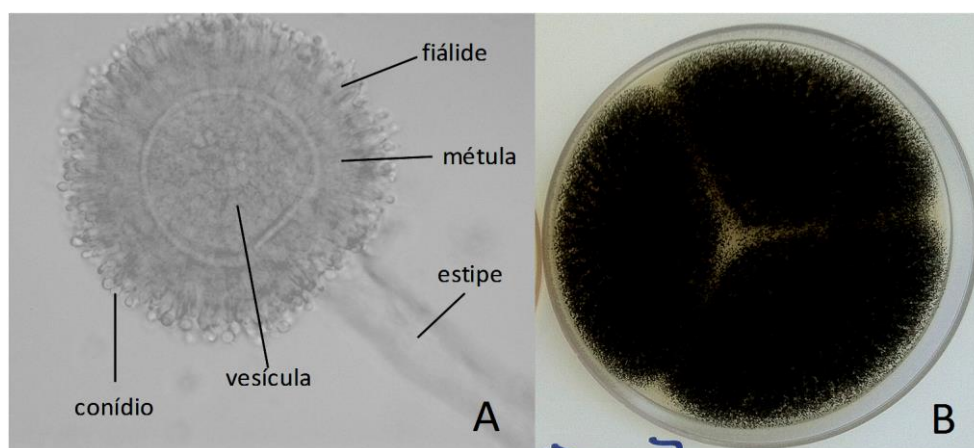
### 2.3.1 Morfologia e fisiologia

A morfologia constitui uma parte importante do conceito de espécie de fungos. Os caracteres de colônia usados para identificar as espécies incluem: taxas de crescimento, textura, grau de esporulação da colônia, produção de esclerócios, cores dos micélios, presença de pigmentos solúveis e exsudados, coloração do verso das colônias, presença de células Hülle e cleistotécios (PITT; HOCKING, 2009).

A reprodução sexual e assexual podem ocorrer em *Aspergillus* e as características microscópicas das estruturas envolvidas são de grande importância para a identificação taxonômica destas espécies. Os caracteres relacionados aos conidióforos, a presença ou ausência de métulas, estrutura entre a vesícula e as fiálides (uniseriados ou biseriados), a cor, dimensão, forma e textura das estipes, vesículas, conídios e células Hülle (quando presentes), que são estruturas relacionados à reprodução destes fungos são muito importantes para a identificação morfológica (Figura 1A). O mesmo se aplica para a presença de cleistotécio, ascos e ascósporos. Para cleistotécios, o desenvolvimento de ascomata e o modo como suas paredes são produzidas são também caracteres importantes. O tamanho e a morfologia dos ascósporos, particularmente a

ornamentação apresentada (rugosidade, bordas, asas e sulcos), também são importantes para a identificação de espécies desta seção (Figura 1B). Porém, é importante ressaltar que alguns destes caracteres fenotípicos citados podem sofrer influência dos meios de cultivo, da técnica de inoculação e das condições de incubação em que o fungo foi submetido (OKUDA, 1994; OKUDA et al., 2000; PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2014).

**Figura 1** – (A) Características microscópica das estruturas de *Aspergillus* sp (1000x); (B) Características macroscópicas de *A. niger* em CYA.



### 2.3.2 Sequências de nucleotídeos

A análise da sequência de nucleotídeos de determinados locos tem permitido uma rápida e precisa identificação de espécies fúngicas. Além disso, informações sobre sequência de nucleotídeos de determinadas regiões do genoma têm sido determinantes para a classificação de novas espécies do reino *Fungi*. Para que um dado loco seja utilizado para fins de identificação e/ou classificação é necessário que sua sequência de nucleotídeos seja suficientemente variável entre espécies, porém conservada entre os indivíduos de uma espécie. Dentre as regiões do DNA fúngico indicadas para a identificação de espécies pertencentes à *A. section Nigri*, destacam-se: 1) os Espaços Internos Transcritos (ITS - *Internal Transcribed Spacer*) do DNA nuclear ribossomal, 2) parte do gene que codifica para  $\beta$ -tubulina e, 3) parte do gene que codifica para calmodulina (VARGA et al., 2011).

Os genes ribossomais dos fungos se organizam adjacientemente ("*clusters*"), e estes "clusters" se repetem de 100 a 200 vezes no genoma, dependendo da espécie em questão. Cada "*clusters*" contém genes que codificam RNAs que compõem as subunidades menor (18S e 5,8S) e maior dos ribossomos (28S). Estes genes são separados por regiões denominadas "*Internal Transcribed Spacer*" (ITS1 e ITS2), as quais são transcritas e depois processadas para dar origem aos RNAs ribossômicos maduros. A região que compreende ITS1-5,8S-ITS2 é flanqueada pelos genes 18S e 28S, que possuem segmentos altamente conservados entre as espécies fúngicas. Estes segmentos conservados foram utilizados como molde para desenhos de "*primers*", ditos "universais" que quando utilizados em reações da polimerase em cadeia (PCR) funcionam como iniciadores da amplificação de ITS1-5,8S-ITS2. O produto amplificado poderá ser sequenciado com facilidade fazendo uso dos mesmos "*primers*" (RASTOGI; SANI, 2011). Como consequência disso, é grande o número de sequências ITS1-5,8S-ITS2 de fungos que estão disponíveis nos bancos de dados, e em 2012, esta região passou a ser considerada "o código de barras" oficial para fungos (SCHOCH et al., 2012).

Apesar da grande contribuição que a análise das sequências ITS tem dado para a identificação de fungos, para alguns grupos taxonômicos mais complexos a análise deste marcador não é suficiente para distinguir todas as espécies. Para *Aspergillus* a região ITS tem sido considerada pouco variável entre as espécies e o uso de marcadores secundários tem sido sugerido. O marcador secundário, de forma semelhante ao ITS, deve permitir o uso de "*primers*" universais, ser fácil de amplificar e fornecer sequências informativas para a discriminação de espécies. Para a identificação de espécies de *Aspergillus*, Samson et al. (2014), um dos maiores especialistas em taxonomia de *Aspergillus* do mundo, sugeriram a utilização do sequenciamento parcial dos genes que codificam para calmodulina (*CaM*) e/ou  $\beta$ -tubulina (*BenA*), dependendo da seção em questão. A calmodulina pertence a uma grande família de proteínas responsável na regulação do cálcio celular, participando de processos celulares envolvendo fosforilação/desfosforilação de proteínas, motilidade celular, arquitetura e função do citoesqueleto, reprodução celular, apoptose, entre outros (BERCHTOLD; VILLALOBO, 2014). Já a  $\beta$ -tubulina, codifica tubulinas, que são componentes principais dos microtúbulos que estão envolvidos em muitos processos celulares, tais como divisão celular, motilidade ciliar ou flagelar, e transporte intracelular em organismos eucarióticos (HAMMOND; CAI; VERHEY, 2008). A eficiência das

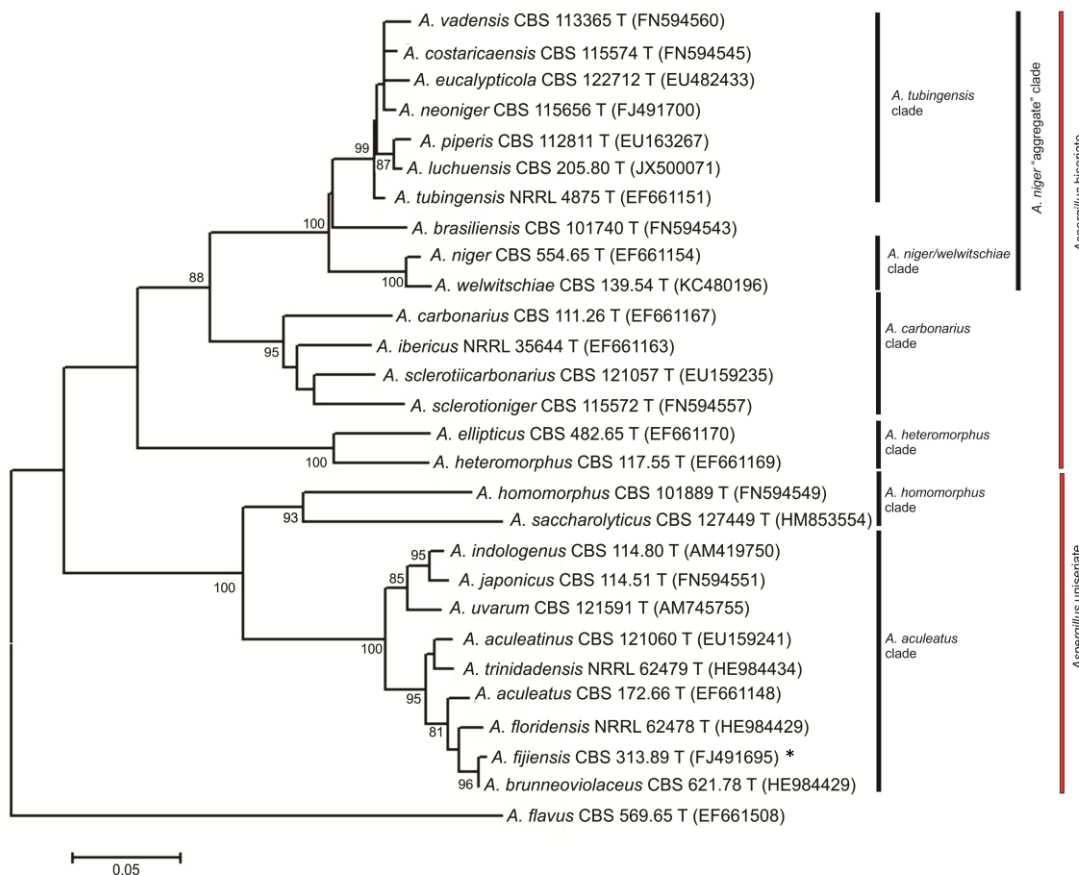
sequências dos genes *CaM* ou *BenA* para discriminar espécies de *Aspergillus* é variável entre as seções. Para *A. section Nigri*, Samson et al. (2014), recomendam o uso de sequências do gene *CaM* como marcador de identificação secundário.

Após o sequenciamento é necessário comparar a sequência de nucleotídeos obtida com as sequências depositadas em banco de dados, preferencialmente com a sequência de referência ("*Type*") da espécie. Atualmente, existem vários bancos de dados de sequências de nucleotídeos (DNA), mas o GenBank, que é administrado pelo NCBI - *National Center for Biotechnology Information*, tem sido considerado o de maior relevância por conter o maior número de sequências de diversos organismos descritos. No entanto, o uso deste banco de dados para identificação taxonômica deve ser feito com cautela, pois o GenBank é um banco público, que permite o depósito de todas as sequências apresentadas, por isso sequências de diversos organismos identificados erroneamente são frequentemente encontradas. Recomenda-se, portanto, que o alinhamento local de sequências de nucleotídeos (BLASTN) seja feito com as sequências de linhagens de referência ("*Type*") de cada espécie estudada.

Embora os valores de identidade obtidos após o BLASTN sejam informativos para auxiliar na identificação de uma espécie, em alguns casos é necessário recorrer às inferências filogenéticas. Para tanto, a sequência do organismo a ser identificado deve ser alinhada com as sequências das linhagens de referência que representam cada uma das espécies de uma dada seção (alinhamento múltiplo de sequências) para que se possa obter uma matriz que descreva a distância entre cada um dos pares de sequências. A partir da matriz obtida um método de agrupamento deve ser usado para construir uma árvore filogenética que coloca sequências estreitamente relacionadas sob o mesmo nó interior e cujo comprimento de ramo reproduz as distâncias observadas entre as sequências.

Após várias revisões, Samson et al. (2014) reconheceram 26 espécies pertencente a *A. section Nigri*. O agrupamento de sequências parciais do gene *CaM* (Figura 2) separa as espécies de *A. section Nigri* em uniseriadas e bisseriadas. As espécies uniseriadas se organizam em dois clados: clado *A. aculeatus* e clado *A. homomorphus*. As espécies bisseriadas se organizam em cinco clados: clado *A. tubingiensis*, clado *A. niger/A. welwitshiae*, clado *A. carbonarius*, clado *A. heteromorphus* e clado *A. brasiliensis*. Nos clados *A. tubingiensis* e *A. niger/A. welwitshiae* incluem todas as espécies do chamado *A. niger* "agregado".

**Figura 2** - Árvore filogenética baseada em dados de sequências do gene parcial da calmodulina das 26 espécies de *A. section Nigri* descritas na literatura.



\*atualmente *A. brunneoviolaceus* é considerado sinônimo de *A. fijiensis*.

Fonte: Adaptado de Samson et al., 2014.

### 2.3.3 Metabólitos secundários

Além dos dados morfológicos e de sequências de nucleotídeos, para que haja uma identificação precisa até o nível de espécie, tem sido recomendado por Samson e colaboradores a análise de perfis de metabólitos secundários (SAMSON et al. 2014).

Um metabólito secundário é um composto químico produzido por um número limitado de espécies de fungos de determinado gênero, ordem ou filo. Os metabólitos secundários podem ser produzidos em um ou mais meios de cultura e incluem toxinas, antibióticos e outros compostos (FRISVAD et al., 2008).

Os isolados de *Aspergillus* spp. produzem vários metabólitos secundários que são característicos das diferentes seções desse gênero. Samson et al. (2014) afirmaram que a produção de um metabólito secundário específico pode auxiliar na identificação

de uma determinada espécie à sua seção, enquanto que vários metabólitos secundários identificados podem ser muito eficientes na identificação de um isolado de *Aspergillus* até espécie. Um perfil de metabólitos secundários é obtido através de extratos fúngicos produzidos em um ou mais meios de cultura, podendo ser utilizado para diferenciar as espécies (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008).

No trabalho de Taniwaki et al. (2017), em que analisaram os metabólitos secundários de *A. section Nigri* isolados de castanhas-do-brasil, os autores constataram que os metabólitos mais comuns encontrados em *A. niger* foram atromentin, cycloleucomelon, funalenona, kotanina, nafto- $\gamma$ -pironas, piranonigrina A e tensidol B, enquanto a maioria dos isolados de *A. luchuensis* produziram cicloleucomelon, fonsecin, funalenona, nafto- $\gamma$ -pironas, piranonigrina A e tensidol B. Asperazina só foi produzida por isolados de *A. tubingensis*. O perfil de metabólitos secundários não distinguiu *A. welwitschiae* de *A. niger*. Isolados de *A. ibericus* produziram apenas nafto- $\gamma$ -pironas e piranonigrina A.

## **2.7 Micotoxinas produzidas por *Aspergillus section Nigri***

Dentre os metabólitos secundários estão as micotoxinas, que são compostos tóxicos sintetizados por fungos filamentosos que comumente contaminam alimentos e rações. São descritas cerca de 300 micotoxinas, sendo a maioria produzida por fungos do gênero *Aspergillus*, *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Penicillium* e *Alternaria*. A toxicidade desses metabólitos pode variar muito, no entanto, a maioria das micotoxinas é agente imunossupressor e algumas são cancerígenas, hepatotóxicas, nefrotóxicas e neurotóxicas. Algumas micotoxinas como aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, patulina, tricotecenos e zearalenona possuem sua toxicidade bem descrita e legislação que estabelece limites máximos permitidos em alguns alimentos (SAMSON et al., 2010; MARIN et al., 2013). É importante salientar que diferentes espécies de fungos podem produzir a mesma toxina, como também, uma única espécie de fungo pode produzir mais de uma toxina. Os efeitos tóxicos das micotoxinas podem ser potencializados pelo sinergismo que pode haver entre elas, e/ou com doenças, principalmente doenças imunossupressoras (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Alguns representantes de *A. section Nigri* se caracterizam como os mais importantes fungos toxigênicos de alguns alimentos, incluindo a uva. A principal micotoxina produzida por algumas espécies de *A. section Nigri* até 2007, era a

ocratoxina A (OTA), responsável pela contaminação de uvas e seus produtos, cereais, temperos, cerveja, frutas secas, café e cacau, sendo o foco de inúmeros estudos (CABANES et al., 2002; IARC, 1993; JECFA, 2002; SAMSON et al., 2004). No entanto, em 2007, Frisvad et al. (2007) detectaram, pela primeira vez, a produção de fumonisina B<sub>2</sub> por *A. niger*.

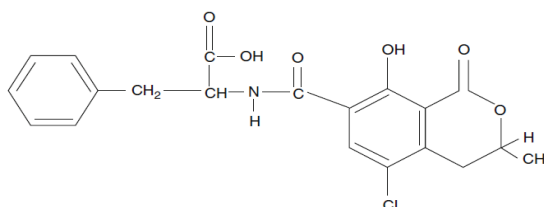
### 2.7.1 Ocratoxina A

Ocratoxina A (OTA) é um metabólito fúngico com potencial nefrotóxico, teratogênico e imunotóxico (KUIPER-GOODMAN; SCOOT, 1996; PETZINGER; ZIEGLER, 2000; MANTLE, 2002). A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC, 1993) classificou a OTA como um agente possivelmente carcinogênico para humanos (Grupo 2B).

A exposição humana à OTA, provavelmente ocorre pelo consumo de diferentes alimentos contaminados com baixo nível desta toxina. O processo de eliminação desse composto pelo organismo é lento, podendo haver acúmulo da toxina caso esta seja consumida diariamente, e conseqüentemente, uma concentração de OTA relevante no sangue (PERAICA et al., 1999; CREPPY, 2002).

A OTA consiste quimicamente em uma dihidro-isocumarina ligada, pelo grupo 7-carboxilo, a uma L-fenilalanina por uma ligação amida (Figura 3), apresentando um efeito inibitório sobre inúmeras enzimas que utilizam fenilalanina como substrato, resultando na inibição da síntese proteica (IARC, 1993).

**Figura 3** - Estrutura química da OTA.



Fonte: HUSSEIN; BRASEL, 2001.

A OTA foi originalmente descrita em 1965, por Van der Merwe et al., a partir de um cultivo de *A. ochraceus* durante uma extensa triagem (*screening*) de metabólitos

fúngicos com o objetivo de encontrar novas micotoxinas. Conforme revisto por Visagie et al. (2014), a partir de então, diversas outras espécies de *A. section Circumdatii* foram descritas como sendo produtoras de OTA: *A. affinis*, *A. cretensis*, *A. fresenii*, *A. muricatus*, *A. occultus*, *A. ochraceopetaliformis* (*A. flocculosus*), *A. ochraceus*, *A. pseudoelegans*, *A. pulvericola*, *A. roseoglobulosus*, *A. sclerotiorum*, *A. steynii*, *A. westerdijkiae*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. persii*, *A. salwaensis*, *A. sesamicola*, *A. subramanianii* e *A. westlandensis*.

Além dos *A. section Circumdati*, o estudo realizado por Abarca et al. (1994) mostrou pela primeira vez a produção de OTA por *A. niger*, pertencente a *A. section Nigri*. Com isso, houve um grande alerta por parte dos pesquisadores da área, devido ao fato de que esta espécie apresenta uma ampla distribuição na natureza, e é utilizada na indústria de biotecnologia para a obtenção de enzimas e ácido cítrico, destinados à indústria alimentícia (ADRIO; DEMAIN, 2014; ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013). No entanto, diversos autores têm demonstrado que uma porcentagem baixa de isolados de *A. niger* (0,2 - 17%) é capaz de produzir OTA (TANIWAKI et al., 2003; BELLÍ et al., 2004; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004; IAMANAKA et al., 2005; LEONG et al., 2007; MAGNOLI et al., 2007; MARTÍNEZ-CULEBRAS; RAMÓN, 2007; MASSI et al., 2016). Por outro lado, um fungo menos disseminado na natureza, o *A. carbonarius*, é considerado um importante produtor de OTA, pelo fato de cerca de 100% dos seus isolados serem produtores desta micotoxina (CABAÑES et al., 2002; BELLI et al., 2006; LASRAM et al., 2012; KIZIS et al., 2014). *A. carbonarius* é atualmente considerado o principal fungo responsável pela contaminação de OTA em uvas e seus derivados (BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2006; CHIOTTA et al., 2013; GARCIA-CELA et al., 2015; MAGNOLI et al., 2003; MIKUŠOVÁ et al., 2014; SAGE et al., 2004; SPADARO et al., 2012; TERRA et al., 2012; VISCONTI et al., 2008).

A título de exemplo, Chiotta et al. (2013) isolaram 70 cepas de *A. carbonarius* de amostras de uvas da Argentina, e todos os isolados foram produtores de OTA. Por outro lado, os isolados de *A. niger*, apenas (33,3%) apresentaram potencial ocratoxigênico (12/36). Lasram et al. (2012), estudando uvas provenientes da Tunísia, encontraram 99,5% dos isolados de *A. carbonarius* (268/270) produtores de OTA e apenas 2,3% de *A. niger* foram capazes de produzir essa micotoxina (29/934). Kizis et al. (2014) também relataram que 98,3% de *A. carbonarius* (59/60) isolados de uvas produzidas na Grécia, foram produtores de OTA.

A presença da ocratoxina A já foi relatada em vinhos produzidos com uvas *V. vinifera* em diferentes partes do mundo (ROSA et al., 2002; BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006; CHULZE; MAGNOLI; DALCERO, 2006; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006; TERRA et al., 2012; CHIOTTA et al., 2013; SOTO et al., 2014). Os níveis de contaminação foram altos, variando de 0,03 a 70,7 µg/Kg. Estudo realizado com suco de uva e polpas congeladas, produzidas com uva *V. labrusca*, revelou a presença de ocratoxina A em 29% e 12,5% das amostras respectivamente, apresentando contaminação baixas de OTA entre 0,021 a 0,1 µg/Kg (ROSA et al., 2004). Chiotta et al. (2013) avaliando a contaminação por ocratoxina A em amostras de uva (*V. vinifera*) relataram um nível baixo, variando de 0,1 a 5,4 µg/Kg.

### 2.7.2 Fumonisins

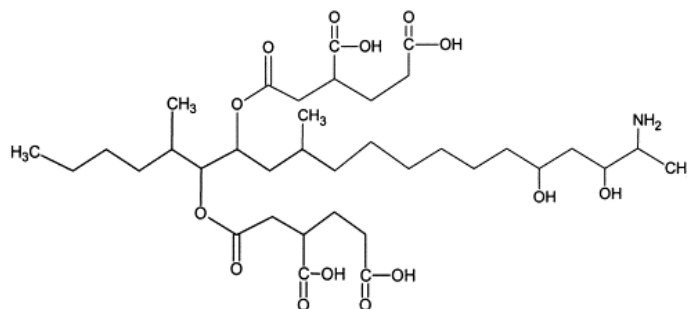
As fumonisinás são micotoxinas originalmente identificadas em *Fusarium verticillioides* (teleomorfo *Gibberella moniliformis*) (GELDERBLUM et al., 1988). Mais tarde, várias outras espécies do gênero *Fusarium* foram descritas como produtoras de fumonisinás, incluindo *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. oxysporum*, *F. globosum* entre outras espécies relacionadas ao complexo *Gibberella fujikuroi* (DESJARDINS, 2006; MARIN et al., 2013). Fumonisiná B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) é a fumonisiná mais estudada, mas quando comparada a toxicidade, a fumonisiná B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>), é mais citotóxica (GUTLEB; MORRISON; MURK, 2002). As fumonisinás B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (Figura 4) são as mais comumente encontradas em alimentos e rações, por esse motivo são os principais focos da maioria das pesquisas e de órgãos reguladores de saúde.

As fumonisinás não são detectadas por absorção de luz ultra-violeta (UV), podendo ser esse um dos motivos pelo qual não tenha sido descoberta anteriormente a sua produção por isolados de *A. niger*. A maioria dos métodos de detecção de micotoxinas, em *A. niger*, utiliza detecção por UV (NIELSEN et al., 2009).

As fumonisinás bloqueiam a biossíntese dos esfingolipídios, através da inibição da enzima ceramida sintetase, responsável pela catálise das reações envolvendo esfinganina e esfingosina (MARIN et al., 2013), que são compostos intermediários na biossíntese e degradação de outros esfingolipídios mais complexos (FINK-GREMMELS, 1999). Os esfingolipídios, tais como esfingomielina, são conhecidos como componentes da membrana, estando envolvida na sinalização intracelular relacionada com o crescimento da célula e sua apoptose (morte celular). A presença de

fumonisinase favorece as células potencialmente cancerígenas a se desenvolverem rapidamente enquanto que células saudáveis iniciam a apoptose. Este desequilíbrio tem sido relacionado como principal fator da toxicidade das fumonisinas (RILEY et al., 2001; MARIN et al., 2013).

**Figura 4** – Estruturas química da FB<sub>2</sub>



Fonte: HUSSEIN; BRASEL, 2001.

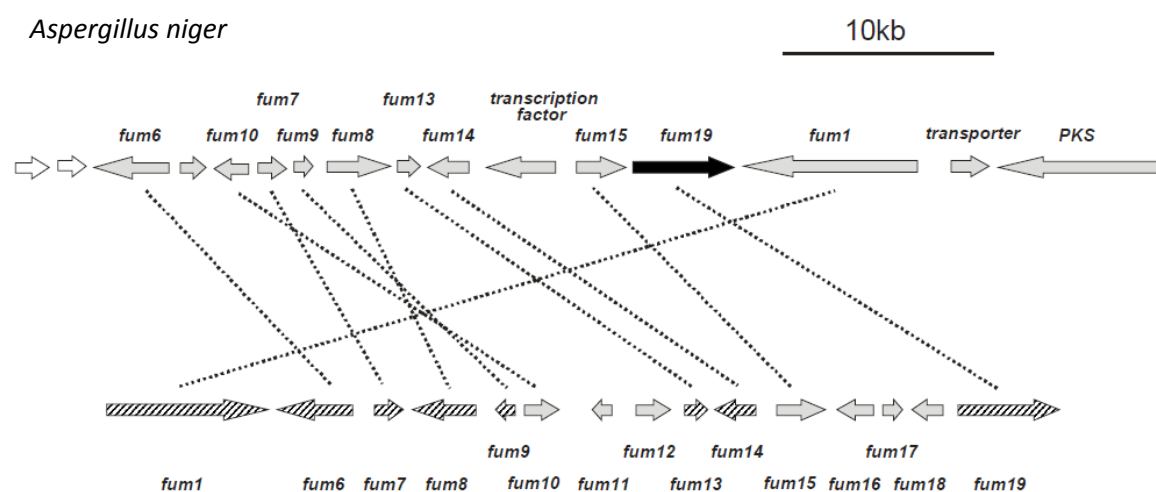
As fumonisinas bloqueiam a biossíntese dos esfingolipídios, através da inibição da enzima ceramida sintetase, responsável pela catálise das reações envolvendo esfingalina e esfingosina (MARIN et al., 2013), que são compostos intermediários na biossíntese e degradação de outros esfingolipídios mais complexos (FINK-GREMMELS, 1999). Os esfingolipídios, tais como esfingomielina, são conhecidos como componentes da membrana, estando envolvida na sinalização intracelular relacionada com o crescimento da célula e sua apoptose (morte celular). A presença de fumonisinas favorece as células potencialmente cancerígenas a se desenvolverem rapidamente enquanto que células saudáveis iniciam a apoptose. Este desequilíbrio tem sido relacionado como principal fator da toxicidade das fumonisinas (RILEY et al., 2001; MARIN et al., 2013).

O IARC em 1993 relatou que as fumonisinas causam diferentes doenças em seres humanos e animais. Em 2002, esse mesmo órgão, classificou essa toxina como do grupo 2B (possivelmente carcinogênico para seres humanos). A grande maioria das fumonisinas absorvida pelo organismo se acumula no fígado e nos rins, podendo ser encontradas em outros tecidos corporais. Uma das doenças relacionadas às fumonisinas é a leucoencefalomalácia equina (ELEM), doença que afeta o sistema nervoso dos cavalos podendo ser fatal em doses de 8 - 22 mg/Kg de FB<sub>1</sub> na alimentação. A doença foi

reportada através de um surto ocorrido na África do Sul entre 1971 - 1974, conhecida como "envenenamento de milho embolorado" (AHANGARKANI; ROUHI; AZIZI, 2014). Outros estudos mostraram que a toxina causa edema pulmonar em suínos, podendo ser fatal para esses animais em determinadas concentrações (superiores a 16 mg FB<sub>1</sub>/kg peso corporal/dia) (STOCKMANN-JUVALA; SAVOLAINEN, 2008). Em seres humanos pesquisas indicaram que existe uma correlação com câncer esofágico, hepático e com imperfeições do tubo neural (NTD) em áreas com uma elevada exposição a fumonisinas, como em regiões da Itália, Irã e China (MARASAS, 2001; STOCKMANN-JUVALA; SAVOLAINEN, 2008; AHANGARKANI; ROUHI; AZIZI, 2014).

Até recentemente, a produção de fumonisinas era conhecida apenas em espécies do gênero *Fusarium*. No entanto, em 2007, Pel et al. após sequenciarem o genoma de um isolado de *A. niger* (CBS 513.88), identificaram uma região homóloga, aos genes envolvidos na produção de fumonisina em *Fusarium*, em *A. niger*. Embora algumas diferenças tenham sido observadas entre o cluster de *F. verticillioides* (*Gibberella moniliformis*) e do homólogo sequenciado em *A. niger* (PEL et al., 2007) (Figura 5), ficou mais tarde comprovado que alguns isolados de *A. niger* produzem FB<sub>2</sub>, FB<sub>4</sub> e FB<sub>6</sub> (FRISVAD et al., 2007; FRISVAD et al., 2011).

**Figura 5** - Comparação estabelecida entre os "clusters" de biossíntese de fumonisinas de *F. verticillioides* e de *A. niger*.



Fonte: Pel et al., 2007.

Pel et al. (2007) observaram a presença de um "cluster" contendo 10 genes envolvidos na biossíntese de fumonisinas no genoma de *A. niger*. O gene *fum8*, localizado neste "cluster" codifica uma  $\alpha$ -oxoamine sintetase (Fum8p), que é uma enzima essencial para a biossíntese da fumonisina, e a interrupção da expressão de *fum8*, resulta na perda da produção de FB<sub>2</sub> em *A. niger* (SHIMIZU et al., 2015). Em 2016, Massi et al. comprovaram a existência de associação entre a presença/ausência do gene *fum8* e a produção/não produção de FB<sub>2</sub>. Conforme estes autores todos os isolados de *A. niger* e *A. welwitschiae* produtores de FB<sub>2</sub> (95) apresentaram em seu genoma o gene *fum8* e os isolados não produtores, 68,7% (55/80) não portavam este gene. *A. niger* são capazes de produzir FB<sub>2</sub>, FB<sub>4</sub>, e FB<sub>6</sub> (FRISVAD et al., 2007; PEL et al., 2007; FRISVAD et al., 2011). O fato de FB<sub>1</sub> e FB<sub>3</sub> não serem produzidas por *A. niger*, é provavelmente decorrente da falta do gene *fum2*, responsável pela síntese, cujo produto é envolvido na biossíntese dessas duas fumonisinas em *F. verticillioides* (BUTCHKO; PLATTNER; PROCTOR, 2006; DESJARDINS, 2006; PEL et al., 2007).

Frisvad et al. (2011), analisaram 180 cepas identificadas como *A. niger* utilizadas ou não na indústria de biotecnologia, além de 228 cepas de outras espécies pertencentes à *A. section Nigri*. Segundo os autores, nenhuma das cepas de *A. section Nigri* (excluindo *A. niger*) foram produtoras de fumonisinas. No entanto 81% das cepas de *A. niger* foram produtoras de fumonisinas (FB<sub>2</sub>, FB<sub>4</sub> e/ou FB<sub>6</sub>). Para as indústrias de biotecnologia, os mesmos autores recomendaram a utilização de isolados de *A. niger* que não apresentem os agrupamentos dos genes da fumonisina e da ocratoxina, ou então a utilização de isolados de espécies não produtoras de micotoxinas como: *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. vadensis* ou *A. acidus*. Noonim et al. (2009) testaram a produção de FB<sub>2</sub> e FB<sub>4</sub> em 82 cepas de *A. section Nigri* isoladas de grãos de café da Tailândia, observaram que apenas cepas de *A. niger* foram capazes de produzir fumonisinas. Reportaram que 76,5% (13/17) dos isolados de *A. niger* foram produtoras de FB<sub>2</sub> e FB<sub>4</sub>. O mesmo foi observado no estudo de Mogensen et al. (2010), em que avaliaram o potencial toxigênico de *A. niger* (66), *A. tubingensis* (4) e *A. acidus* (16) isoladas de uvas passas. Os autores não detectaram a produção de fumonisinas pelos isolados de *A. tubingensis* e *A. acidus*, no entanto, 77% das cepas de *A. niger* foram produtoras desta micotoxinas, dentre essas, 10 foram capazes de produzir FB<sub>2</sub> e FB<sub>4</sub>. Varga et al. (2010) detectaram a produção de fumonisinas em 66,7% (20/30) das cepas de *A. niger* e *A. welwitschiae* isoladas de uvas passas.

Entretanto, nos trabalhos de Abrunhosa et al. (2011) e Ferranti et al., 2016, as porcentagens de espécies produtoras foram menores. No primeiro foram avaliadas 681 cepas de *A. section Nigri* isolados de uvas destinadas para a produção de vinhos portugueses, os autores detectaram a produção de FB<sub>2</sub> em 29% (175/597) dos isolados pertencentes à *A. niger* "agregado". No segundo trabalho os autores avaliaram 200 cepas de *A. section Nigri* isolados de castanha-do-brasil e foi detectada a capacidade de produção de FB<sub>2</sub> em 20,5% (41/200) do total dos isolados analisados. Esta baixa porcentagem obtida nestes estudos, quando comparada aos demais trabalhos, pode ser explicada pelo fato de dentre as espécies de *A. niger* agregado, apenas *A. niger* e *A. welwitschiae* são capazes de produzir essas micotoxinas e estes trabalhos analisaram não apenas isolados de *A. niger* agregado mas sim isolados de *A. section Nigri*, o que diminui a porcentagem de produtores.

Embora seja detectada a presença de espécies de *A. section Nigri* produtoras de fumonisinas em diversos alimentos, principalmente em uvas, frutas secas, vinhos, cacau, cebolas, castanha-do-brasil e café, a informação sobre a contaminação das uvas por esta micotoxina ainda é restrita. Qi et al. (2016), analisaram 22 amostras de uvas quanto à contaminação com FB<sub>2</sub>, e esta foi detectada em 7 amostras (32%), variando a contaminação de 1 - 15 µg/Kg. Diversos autores reportaram a presença de fumonisinas em outros alimentos como cebolas, café, uva passa e vinhos (LOGRIECO et al., 2009; KNUDSEN et al., 2011; VARGA et al., 2010; MOGENSEN et al., 2010; GHERBAWY et al., 2015; NIELSEN et al., 2015). Diferentemente de Ferranti et al. (2016) que não detectaram FB<sub>2</sub> em amostras de castanha-do-brasil.

O conhecimento da microbiota de uvas e da presença de espécies toxigênicas, torna este trabalho relevante uma vez que no Brasil há poucos estudos nessa área e não existem pesquisas com uvas de variedades *V. labrusca*. Além disso, a realização desta investigação poderá dar suporte para o estabelecimento de limites máximos permitidos para fumonisinas em uvas e seus derivados pela legislação brasileira.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Este trabalho objetivou investigar a presença de *Aspergillus section Nigri* em uvas *Vitis labrusca* (e híbridas) e em solos coletados de vinhedos dos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Pernambuco. Além disso, constituiu-se como objetivo deste trabalho analisar o potencial toxigênico para ocratoxina A e fumonisina B<sub>2</sub> dos isolados de *Aspergillus section Nigri* e a análise de presença/ausência destas micotoxinas nas amostras de uvas.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Isolar *A. section Nigri* de uvas *Vitis labrusca* (e híbridos *Vitis labrusca* x *Vitis vinifera*).
- Identificar as espécies de *A. section Nigri* por meio de técnicas morfológicas, fisiológicas e moleculares;
- Investigar a capacidade de produção de ocratoxina A e fumonisina B<sub>2</sub> pelos isolados de *A. section Nigri*;
- Avaliar a presença de ocratoxina A e fumonisina B<sub>2</sub> nas amostras de uva.

## 4 RESULTADOS

### **Artigo Científico 1: Diversity of *Aspergillus* section *Nigri* on the surface of *Vitis labrusca* grape varieties and its hybrids**

#### **Abstract**

This study investigated the presence of *Aspergillus* species belonging to *Aspergillus* section *Nigri* on *Vitis labrusca* grapes and its hybrids grown in Brazil. The ability of the fungi isolates to produce ochratoxin A (OTA) and fumonisin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) as well as the presence of these mycotoxins in the grapes were also studied. Eighty-eight samples were collected from the main grape producing states in Brazil: Rio Grande do Sul ( $n = 30$ ), Pernambuco ( $n = 21$ ), São Paulo ( $n = 21$ ) and Paraná ( $n = 16$ ). The highest average contamination level by *A.* section *Nigri* occurred on the grapes from Pernambuco (66.3%), where the climate is semi-arid. A total of 2,042 *A.* section *Nigri* isolates was analyzed and clustered in three groups according to morphology characterization: *A.* section *Nigri* uniseriate (79.3%), *A. niger* "aggregate" (18.3%) and *A. carbonarius* (2.4%). In order to precisely identify the *Aspergillus* species, two hundred and forty-eight strains were subjected to DNA sequencing. Among the *A.* section *Nigri* uniseriate group, the following species were found: *A. japonicus*, *A. uvarum*, *A. brunneoviolaceus* and *A. aculeatus*. Within the *A. niger* "aggregate", the following species were found: *A. niger sensu stricto*, *A. welwitschiae* and *A. vadensis*. Regarding mycotoxin-production capacity, 3.2% of the total *A.* section *Nigri* isolates (2,042) were positive for OTA production and from *A. niger* "aggregate" (373) tested, 42.1% were FB<sub>2</sub> producers. However, none of the 88 grape samples were contaminated with these mycotoxins.

*Keywords:* *Vitis labrusca*, *Aspergillus* section *Nigri*, ochratoxin A, fumonisin B<sub>2</sub>.

#### **1. Introduction**

The *Vitis* species grape is one of the most economically important fruit species due to the numerous uses of its fruit in the production of wine, grape juice and other foods (Ali et al., 2010). Most of the world's vineyards grow European cultivars (*Vitis vinifera* L. cultivars) because of their high quality for use in wine production (Ferreira et al., 2014). However, in Brazil the majority of the vineyards grow American cultivars

(*Vitis labrusca* L. or hybrid *V. vinifera* x *V. labrusca*), as they are less susceptible to fungal diseases and more adapted to the Brazilian environmental conditions. In 2015, a total of 703,271 tonnes of grapes were harvested in Brazil, and approximately 90 percent of the total production was from *V. labrusca* (and hybrid) grapes ([http://www.uvibra.com.br/dados\\_estatisticos.htm](http://www.uvibra.com.br/dados_estatisticos.htm)). These grapes are widely consumed “in natura” and used to produce juice, which is an excellent natural source of polyphenols with health benefits (Toaldo et al., 2015). As reviewed by Arcanjo et al. (2017) Brazilian grape juices are seen as one of the most promising export products of the food sector. Moreover, Brazil is one of the few countries that allow the commercialization of wine produced with *V. labrusca* grapes. The designations “table wine” and “fine wine” are used for those obtained from *V. labrusca* and *V. vinifera* grapes, respectively. In 2015, “table wine” production in Brazil reached 210 million liters (IBRAVIN, 2016).

Many fungi may occur in vineyards and especially at harvest time they can find conditions to infect the grape berries (Somma et al., 2012). *V. vinifera* grapes can be contaminated in the field mainly by the *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Rhizopus* and *Penicillium* species (Abrunhosa et al., 2001; Bellí et al., 2004; Kizis et al., 2014; Somma et al., 2012).

*Aspergillus* species belonging to *A.* section *Nigri*, commonly known as black aspergilli, have been detected in *V. vinifera* grapes around the world (Somma et al., 2012; Chiotta et al., 2013; Garcia-Cela et al., 2015; Mikušová et al., 2014). Special attention has been given to this group of fungi because some species can produce mycotoxins, mainly ochratoxin A (OTA) and fumonisin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>). Both these toxins are classified as a possible human carcinogen, Group 2B (IARC, 1993). In 2011 the maximum limit of OTA (2 µg/Kg) was established for grape juice and wine by Brazilian authorities (Anvisa, 2011). For fumonisins in grape products, the maximum tolerable limit has not yet been established.

The taxonomy of *A.* section *Nigri* has evolved constantly, but some species are difficult or not possible to identify based solely on their phenotypic characters (Varga et al., 2011). Recently, Samson et al. (2014) provided an updated accepted species list for the genus *Aspergillus*, and 26 species are included in *A.* section *Nigri*. These species include biseriata and uniseriate species. Some morphologically indistinguishable species were treated as *A. niger* "aggregate" and together with *A. carbonarius* they are the biseriata species prevalent on grapes. Among the uniseriate species, the most frequently

found on grapes are *A. aculeatus*, *A. japonicus* and *A. uvarum* (Chiotta et al., 2013; Garcia-Cela et al., 2015; Mikušová et al., 2014; Spadaro et al., 2012).

Uniseriate species are not considered to be OTA producers (Perrone et al., 2007). However, the biseriate species *A. carbonarius*, *A. welwitschiae* and *A. niger*, the latter two belonging to the *A. niger* aggregate, are the main species for the presence of OTA in *V. vinifera* grapes and derived products (Bau et al., 2005; Bellí et al., 2005; Chiotta et al., 2013; Garcia-Cela et al., 2015; Magnoli et al., 2003; Mikušová et al., 2014; Sage et al., 2004; Spadaro et al., 2012; Visconti et al., 2008).

*A. niger* and *A. welwitschiae* can also produce FB<sub>2</sub>, FB<sub>4</sub> and FB<sub>6</sub>. Some studies have correlated the presence of fumonisins in *V. vinifera* grapes with the presence of these species (Abrunhosa et al., 2011; Mogensen et al., 2010b; Susca et al., 2010).

Based on the limited data concerning OTA and FB<sub>2</sub> in *V. labrusca* grapes, a survey of the black *Aspergillus* on the surface of this fruit obtained from the four main producing regions in Brazil was conducted. The presence of these mycotoxins in the grape samples was also evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Sampling

A total of 88 grape samples from the states of Rio Grande do Sul ( $n = 30$ ), São Paulo ( $n = 21$ ) and Paraná ( $n = 16$ ), which are located in the South and Southeast, and Pernambuco ( $n = 21$ ) in the Northeast of Brazil, were analyzed.

The samples were collected during harvesting, according to Serra et al. (2003). Ten plants were selected randomly along two diagonal transects of the vineyard and two bunches of grapes were harvested from each plant. Therefore, from each vineyard 20 bunches were considered as a sample. The varieties of *V. labrusca* and hybrid grapes analyzed were "Bordo", "Cora", "Concord", "Isabel", "Violeta", "Coder", "Rudder" and "Niagara".

The water activity was determined in all grape samples (pills) using AquaLab, Series 3TE equipment (Decagon, USA) at  $25 \pm 0.1$  °C, in triplicate.

## **2.2 Fungal isolation**

One hundred grape pills were plated directly onto Petri dishes containing Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol medium agar (DRBC agar). The grape pulp was discarded. Plates were incubated at 25 °C for 7 days (Pitt e Hocking, 2009).

## **2.3 Fungal characterization**

The isolates identified as *A. section Nigri* and also the other genera were isolated and grown on Czapek Yeast Extract Autolysate agar (CYA agar) and incubated at 25 °C for 7 days (Klich and Pitt, 1988). After incubation, the plates were examined and all *A. section Nigri* were first isolated in Petri plates containing CYA agar. After the incubation period, the morphological characteristics of the *Aspergillus* strains were examined macro- and microscopically and species organized in three groups: *A. section Nigri* uniseriate, *A. niger* "aggregate" and *A. carbonarius* (Klich and Pitt, 1988; Samson et al., 2004).

## **2.4 Test for ochratoxin A production by *A. section Nigri***

All strains of *A. section Nigri* ( $n = 2,042$ ) were tested for OTA. The capacity of each isolate to produce OTA was analyzed according to the method described by Filtenborg et al. (1983). The strains were one-point inoculated into Yeast Extract Sucrose agar (YES agar) and incubated at 25 °C for 7 days. One plug was removed from the center of the colony, the OTA extracted with methanol: chloroform (1:1 v/v) and the plug placed on a silica plate (Merck, Germany) to perform thin layer chromatography. The mobile phase used consisted of toluene: ethyl acetate: 90% formic acid: chloroform (7:5:2:5, v/v/v/v). The OTA was visualized under UV light at 365 and 256 nm. The OTA standard (Sigma, St. Louis, USA) was placed on the TLC plate so that the fluorescence and retention factors could be compared with the samples.

## **2.5 Test for fumonisin B<sub>2</sub> production by *A. section Nigri***

Three hundred and ninety-one strains belonging to *A. section Nigri* were tested for their ability to produce FB<sub>2</sub>. Each strain was inoculated onto Czapek Yeast Extract

20% Sucrose agar (CY20S agar) and incubated at 25 °C for 7 days, following the methodology in Frisvad et al. (2007). Five small pieces of mycelium were removed (plugs) from the central portion of the colony and the toxin extracted with 1 mL of methanol in a vortex for 3 minutes. The extract was filtered in a 0.45 µm and 0.22 µm Millex membrane. Then 55 µL of the extract were transferred to an HPLC vial, adding 55 µL of ortho-phthaldialdehyde reagent (OPA), according to the method in Visconti et al. (2001). The extract was mixed using vortex for 30 seconds. Chromatography was performed using a Shimadzu LC-10VP (Shimadzu, Japan) HPLC system, with a fluorescence detector set at 335 nm excitation and emission at 440 nm. A YMC column - Pack ODS-A (5 µm, 4.6 x 150 mm) (YMC Co., Ltd., Japan) was used with the following mobile phase: acetonitrile: water: acetic acid (51:47:02 v/v/v) and mobile phase flow rate at 1.0 mL/min. The oven temperature was 40 °C and volume injection 20 µL.

## **2.6 Molecular analysis**

A total of 248 strains, representatives of each group distinguished by morphological characteristic, were subjected to Calmodulin (*CaM*) gene sequence analysis. After growing in liquid Complete Medium (Pontecorvo et al., 1953), the mycelia were collected, frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder. Nucleic acids were extracted using the BioPur Mini Spin Extraction Kit (Biometrix, Brazil) according to the manufacturer's instructions. Amplification of a *CaM* gene region was performed using the primers cmd5 (5' CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC 3') and cmd6 (5' CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG 3') described in Hong et al. (2006). The PCR products were cleaned up using ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences, UK) and directly sequenced using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) and an ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). The partial *CaM* sequences were subsequently aligned with those from *A. section Nigri* available in the GenBank database and a phylogeny reconstruction was performed using a distance-based Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The tree was drawn using MEGA7 (Kumar et al., 2016).

## 2.7 Secondary metabolite analysis

Nine strains representing different species of *A. section Nigri* identified on this present study were submitted to secondary metabolites analyses. They were grown on both CYA and YES agar. Five plugs taken from each agar medium were pooled into the same vial and extracted with 0.75 mL of a mixture of ethyl acetate: isopropanol (3:1, v/v) with 1% formic acid using 50 minutes ultrasonication. The solvents were evaporated and the dry extract redissolved in 0.4 mL of methanol. After centrifugation (13,400 rpm for 3 minutes) the extracts with the metabolites were injected into a LC system and separated and detected by High Performance Liquid Chromatography with diode array detection (DAD) (Agilent series 1100 system with a Phenomenex Luna C18(2)) reversed phase column (100 x 2 mm, 3  $\mu$  particles) (Nielsen et al., 2011). Standards of the secondary metabolites were used to confirm the identity.

## 2.8 Analyses of ochratoxin A in grape samples

Ochratoxin A from grapes was analyzed according to Vargas et al. (2005). Two hundred grams of grapes were crushed in a grinder and homogenized. An aliquot of five grams was taken and extracted with 100 mL of a mixture of methanol: 3% aqueous sodium bicarbonate (50:50) in a shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc., USA) for 30 minutes. Extracts were filtered using a qualitative filter (Nalgon, Germany) and a glass fiber filter (Vicom, Sweden). Four milliliters were extracted, diluted with 100 mL of phosphate buffered saline (PBS) and applied to an immunoaffinity column (Vicom, USA) containing monoclonal antibodies specific to OTA. After washing with distilled water, the OTA was eluted with 4 mL of HPLC grade methanol. This extract was dried under nitrogen flow, resuspended in 300  $\mu$ L of mobile phase and quantified by reverse-phase HPLC with fluorescence detection. A volume of 20  $\mu$ L was injected into a Shimadzu LC-10VP HPLC system (Shimadzu Corporation, Japan) with a fluorescence detector RF-10AXL (Shimadzu Corporation, Japan) set at 333 nm excitation and 477 nm emission wavelength. The mobile phase used was methanol: acetonitrile: water: acetic acid (35:35:29:10, v/v/v/v), with an isocratic flow rate of 0.8 mL/min. Chromatographic separation was achieved using a YMC column - Pack ODS-A (5  $\mu$ m, 4.6 x 250 mm) (YMC Co., Ltd., Japan) set at 40 °C. For recovery studies, grape samples were spiked with OTA standard (Sigma, USA) at three levels: 0.60, 4.12 and 12.37

$\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Tests were carried out in triplicate. The detection and quantification limits were obtained by analyzing 8 repetitions of grape contaminated with lower levels of OTA ( $0.4 \mu\text{g}/\text{Kg}$ . ), according to Eurachem, 2014.

### ***2.9 Analysis of fumonisin B<sub>2</sub> in grape samples***

Fumonisin B<sub>2</sub> from grapes was analyzed according to Ferranti et al. (2016), with some modification. Twenty grams of grapes were extracted with 50 mL of methanol: acetonitrile: water (25:25:50, v/v/v). The suspension was shaken for 30 minutes in a homogenizer (Tecnal, mod TE420, Brazil). This mixture was centrifuged (International Company Equipment - Mod: B20A, USA) for 20 minutes at 4,000 rpm. The supernatant was removed by pipette and stored in a 100 mL flask. The pellet was resuspended in a 50 mL solution of methanol: acetonitrile: water (25:25:50, v/v/v), shaken for 30 minutes in a homogenizer and centrifuged for 20 minutes at 4,000 rpm. The supernatants were combined and filtered through a filter paper (Nalgon, Germany). The filtrate was (10 mL) transferred to a 50 mL volumetric flask. The volume was completed with PBS. This solution was filtered through a glass fiber filter (Vicam, Sweden). Ten milliliters of the filtrate were passed through a FumoniTestTM<sup>WB</sup> immunoaffinity column (Vicam, USA) at a flow rate of 2-3 mL/min, followed by washing with 10 mL PBS. The FB<sub>2</sub> was eluted with 1.5 mL of methanol, dried under a stream of nitrogen at 40 °C and the dried extract resuspended in 0.2 mL of acetonitrile: water (1:1, v/v). Then 55  $\mu\text{L}$  of the extract were transferred to an HPLC vial, adding 55  $\mu\text{L}$  of ortho-phthaldialdehyde reagent (OPA), according to the method in Visconti et al. (2001). The extract was mixed using vortex for 30 seconds. Chromatography was performed using a Shimadzu LC-10VP HPLC system (Shimadzu, Japan) with a fluorescence detector set at 335 nm excitation and 440 nm emission wavelength. A YMC column - Pack ODS-A (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 250 mm) (YMC Co., Ltd., Japan) was used and the mobile phase was acetonitrile: water: acetic acid (51:47:0.2, v/v/v) with a flow rate of 1 mL/min. The oven temperature was 40 °C.

The recovery, detection and quantification limits were obtained by spiking grapes with FB<sub>2</sub> standard (Sigma-Aldrich, USA) at three levels 0.35, 0.5 and 0.62  $\mu\text{g}/\text{g}$ . Tests were carried out in triplicate. The detection and quantification limits were obtained by analyzing 8 repetitions of grape contaminated with lower levels of FB<sub>2</sub> (0.35  $\mu\text{g}/\text{g}$ ), according to Eurachem, 2014.

### 3. Results

#### 3.1 Occurrence of *A. section Nigri* on surface of grapes

All grape samples analyzed ( $n = 88$ ) showed fungal contamination. The genera of filamentous fungi most commonly found on the surface of the grapes were *Cladosporium* (27.8%), *Aspergillus* (13.9%), *Alternaria* (13.4%), *Fusarium* (10.6%), *Pestalotiopsis* (9.1%) and *Penicillium* (7.3%). The *Botrytis* genera, considered the most damaging pathogen on grapes, responsible for gray rot or noble rot disease (Buit and Dubos, 1988), was found at low frequency of occurrence (0.02%) and only on grapes from Rio Grande do Sul and Paraná where the temperature is lower than in the other regions studied.

*Aspergillus* species belonging to *A. section Nigri* were found in the majority of the grape samples collected in the states of Paraná, Rio Grande do Sul, Pernambuco and São Paulo. Seventy-two samples (82%) showed contamination by *A. section Nigri*, ranging from 1 to 100%, which means there were samples with 100 pills contaminated by this group of fungi. Sixteen grape samples showed absence of this group. They were collected in the states of Paraná ( $n = 4$ ) and Rio Grande do Sul ( $n = 12$ ). All samples from Pernambuco and São Paulo were contaminated with *A. section Nigri* and the highest average contamination level was 66.3% on the grapes collected from Pernambuco, followed by average contamination levels of 18.2% (São Paulo), 8.5% (Paraná) and 4.5% (Rio Grande do Sul).

The frequency of occurrence, average of contamination and range of contamination by *A. section Nigri*, as well as water activity values of grape samples, are given in Table 1.

**Table 1.** Water activity, frequency of occurrence, average of contamination and range of contamination by *A. section Nigri* for the states of Paraná, Rio Grande do Sul, Pernambuco and São Paulo.

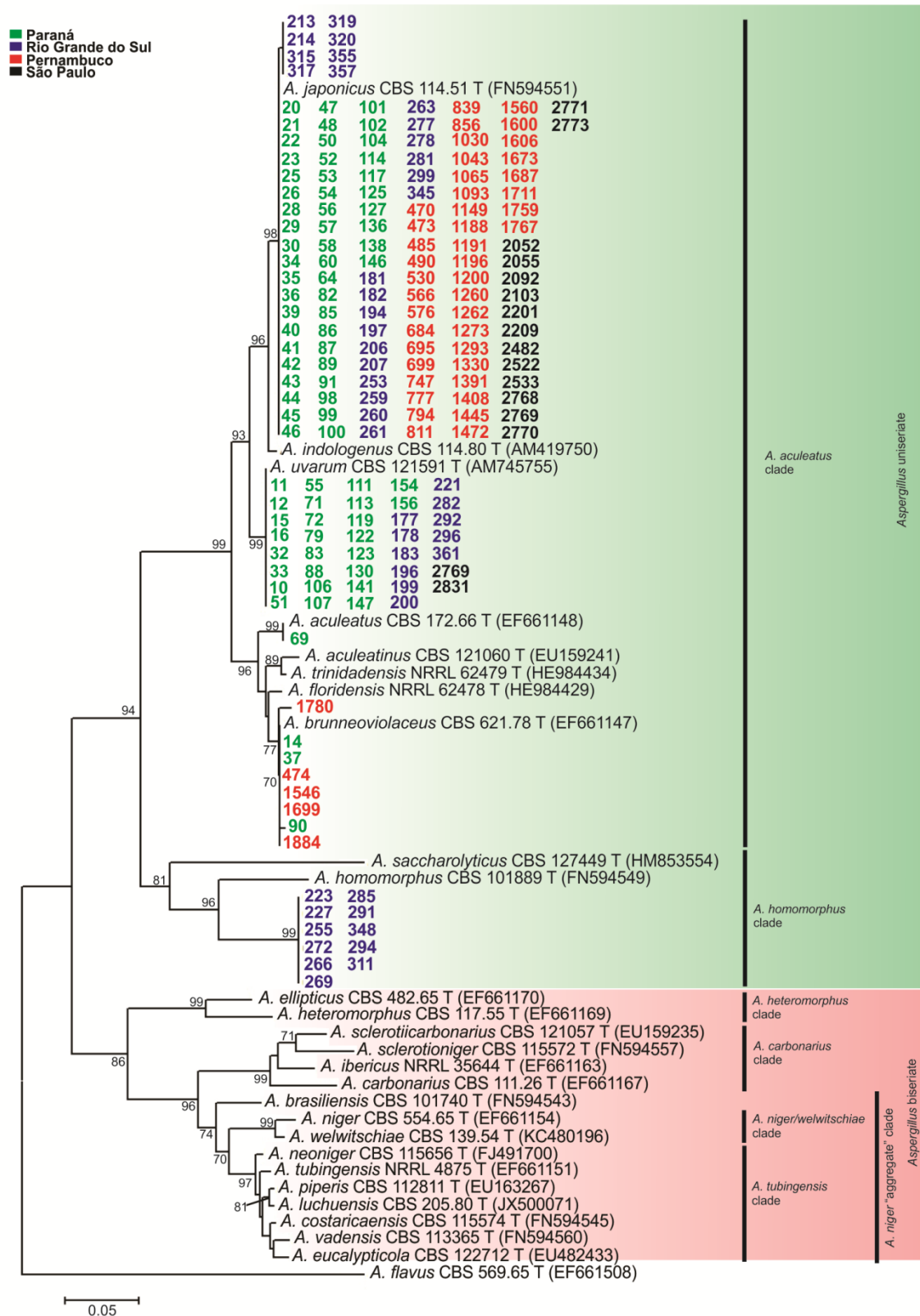
State	Paraná	Rio Grande do Sul	Pernambuco	São Paulo
Number of samples	16	30	21	21
Water activity	0.944 (0.939-0.950)	0.935 (0.903-0.954)	0.975 (0.951-1.00)	0.964 (0.942-0.976)
FO (%)	75	56.67	100	100
AC (%)	8.50	4.50	66.29	18.19
RC (%)	0 – 18	0 – 35	1 – 100	3 – 99

FO = Frequency of occurrence (number of samples contaminated with *A. section Nigri*/total samples evaluated); AC = Average of contamination (sum of percentage contamination of samples level/total number of samples); RC = Range of contamination (range of contamination in a grape sample).

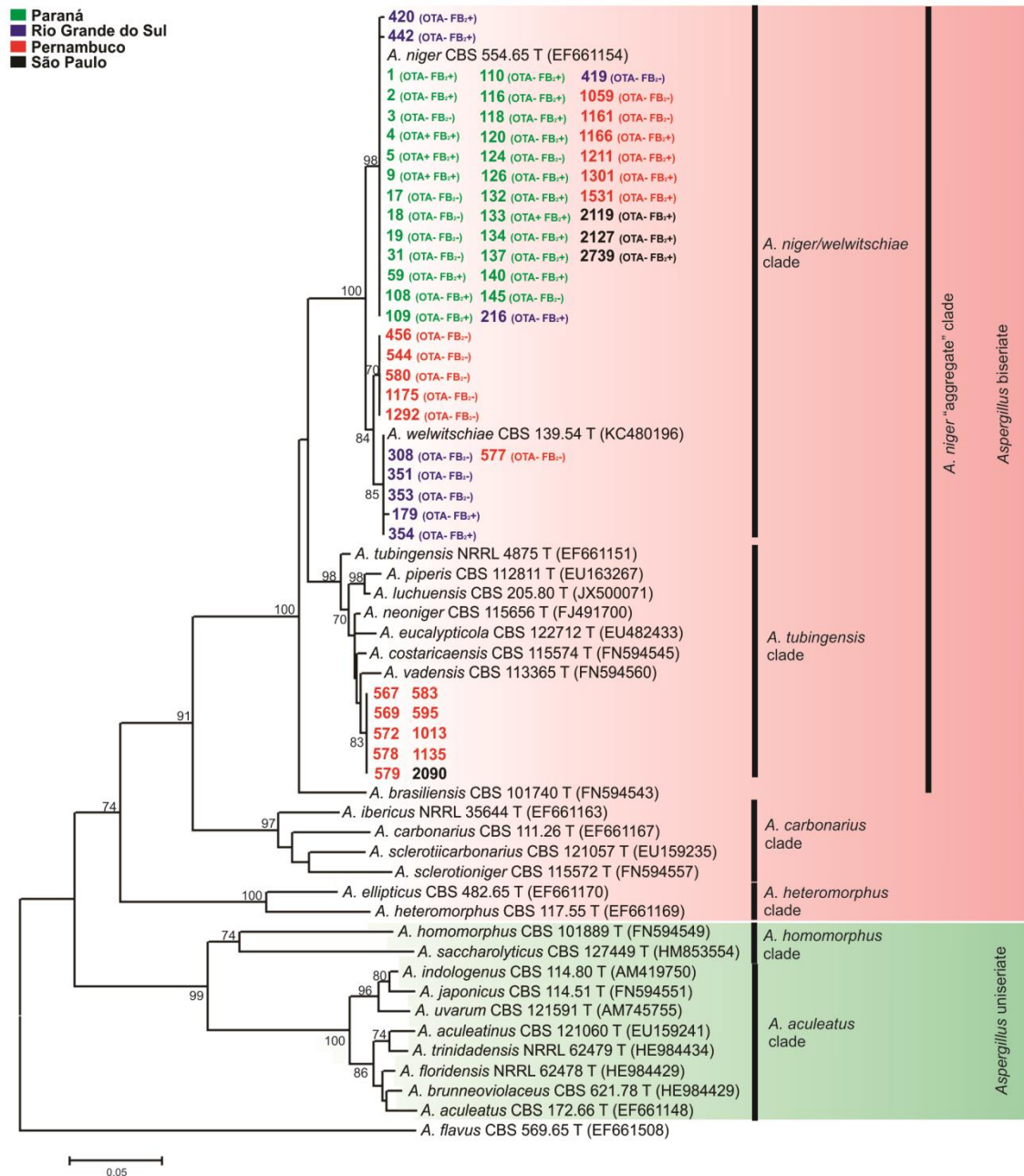
### 3.2 Species identification by means of morphological, molecular and secondary metabolites data

Based on macroscopic and microscopic characteristics, the 2,042 isolates were organized as belonging to three groups: *A. section Nigri* uniseriate ( $n = 1,620$ ), *A. niger* "aggregate" ( $n = 373$ ) and *A. carbonarius* ( $n = 49$ ).

Accurate identification of the *A. section Nigri* present on grape surfaces to the species level is important to predict the risk of OTA and FB<sub>2</sub> contamination. However, some species belonging to *A. niger* "aggregate" or *A. section Nigri* uniseriate group are very similar morphologically. Among the 2,042 *A. section Nigri* strains analyzed morphologically, 248 strains representing both *A. niger* "aggregate" ( $n = 59$ ) and *A. section Nigri* uniseriate group ( $n = 189$ ) were submitted to sequencing for a part of the *CaM* gene. The *CaM*-based phylogenetic tree of the *A. section Nigri* uniseriate and *A. niger* "aggregate" reconstructed with the sequences obtained in the present study and those retrieved from GenBank for each *A. section Nigri* type strains are shown in Figures 1 and 2, respectively.



**Fig. 1.** Neighbor-Joining phylogenetic tree based on partial *CaM* gene sequence data for 189 *A.* section *Nigri* uniseriate obtained in the present study and those retrieved from GenBank for each *A.* section *Nigri* type strains.



**Fig. 2.** Neighbor-Joining phylogenetic tree based on partial *CaM* gene sequence data for 59 *A. niger* "aggregate" obtained in the present study and those retrieved from GenBank for each *A. section Nigri* type strains. Jointly with the strains of *A. niger* and *A. welwitschiae* are included their ability to produce OTA and FB<sub>2</sub>.

Among the 189 *A. section Nigri* uniseriate, the following species were found: *A. japonicus* ( $n = 130$ ), *A. uvarum* ( $n = 39$ ), *A. brunneoviolaceus* ( $n = 8$ ) and *A. aculeatus* ( $n = 1$ ). Additionally, one group of *CaM* sequences ( $n = 11$ ) formed a branch clearly separated from all other uniseriate species of *A. section Nigri* recognized until now.

Using the phylogenetic tree and BLAST tool it was found that the *CaM* sequences from these strains are most similar to those from *A. homomorphus*, but with only 88% sequence identity. This group of strains is here denoted as *Aspergillus* sp. Interestingly, this group was found only in Rio Grande do Sul State. *Aspergillus* sp. has been investigated by our group in order to clarify if it represents a new species of *A. section Nigri*.

Regarding *A. niger* "aggregate" the following species were recognized: *A. niger sensu stricto* ( $n = 38$ ), *A. welwitschiae* ( $n = 11$ ) and *A. vadensis* ( $n = 10$ ).

Table 2 provides an overview of the phenotypic characteristics of each *A. section Nigri* species isolated from grapes in the present study, including secondary metabolites profile.





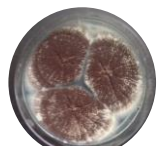
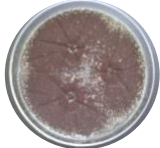



In terms of secondary metabolites it is interesting to note, based on the nine black aspergilli isolates shown in table 2, that secalonic acid D and calbistrins were found in nearly all strains from the uniseriate black aspergilli isolates. On the other hand, atromentin and funalenone were found only in biseriate species.

### **3.3 Ochratoxin A and Fumonisin B<sub>2</sub> production by *A. section Nigri* strains**

A total of 2,042 *A. section Nigri* strains were tested for OTA production and 3.2% ( $n = 65$ ) of the strains were positive. Among 373 *A. niger* "aggregate", 4.3% ( $n = 16$ ) were producers and among 49 strains of *A. carbonarius*, 100% were OTA positive. Among *A. section Nigri* uniseriate none of the isolates were OTA positive.

Regarding FB<sub>2</sub>, a total of 391 strains of *A. section Nigri* were tested and 40.1% ( $n = 157$ ) were producers (limit of detection = 80 µg/Kg). All the FB<sub>2</sub> positive strains belong to *A. niger* "aggregate". Eight strains of *A. niger* "aggregate" could produce both mycotoxins.

**Table 2.** Phenotypic characteristics of each *A.* section *Nigri* species isolated from grapes in the present study.

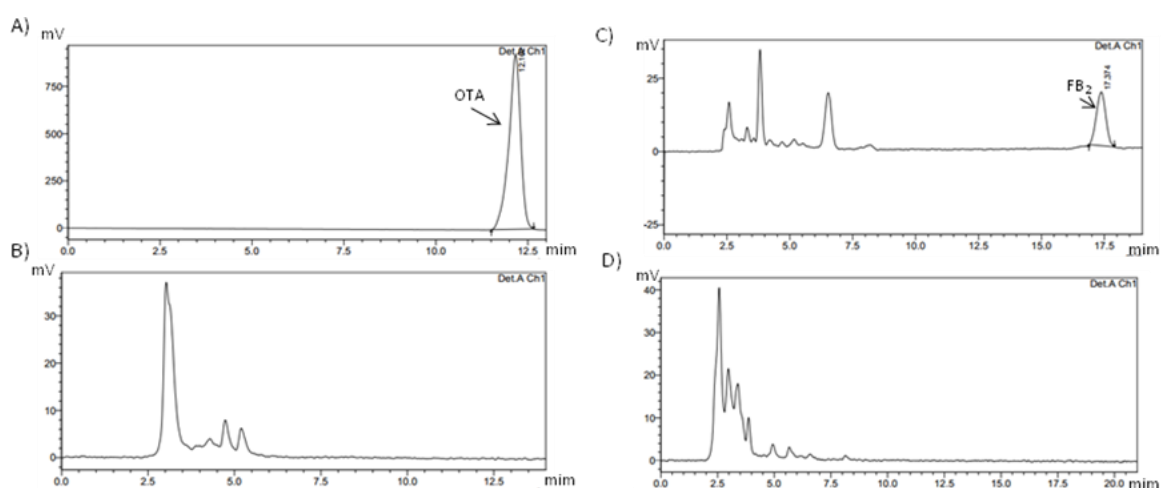
Species	Macroscopy *	Microscopy	Secondary metabolites
<i>A. niger</i> ITAL** 1301 IBT*** 33916		Conidia spherical, smooth to slightly rough 3-4 µm. Biseriate, spherical vesicle 50-60 µm.	Atromentin, funalenone, kotanin, naphtho-γ-pyrones, nigragillin, orlandin and pyranonigrin A.
<i>A. welwitschiae</i> ITAL 577 IBT 33910		Conidia spherical, smooth to slightly rough 3-4 µm. Biseriate, spherical vesicle 50-60 µm.	Atromentin, funalenone, kotanin, naphtho-γ-pyrones, nigragillin, pyranonigrin A and tensidol B.
<i>A. vadensis</i> ITAL 567 IBT 33913		Conidia spherical, smooth to slightly rough 3.4-4.6 µm. Biseriate, spherical vesicle 40-45 µm.	Asperazine, atromentin, funalenone and pyranonigrin A.
<i>A. carbonarius</i> ITAL 1104 IBT 33909		Conidia spherical, prickly 7-8 µm. Biseriate, spherical vesicle, 50-55 µm.	Atromentin, naphtho-γ-pyrones, ochratoxin alfa, ochratoxin A and pyranonigrin A.
<i>A. brunneoviolaceus</i> ITAL 90 IBT 33924		Conidia spherical to ellipsoidal, smooth, slightly rough, 3.5- 4.3 µm. Uniseriate, spherical vesicle 40-63 µm.	Calbistrins, neoxaline, secalonic acid D and F, pre-aurantiamin and DERH
<i>A. uvarum</i> ITAL 147 IBT 33926		Conidia spherical, rough to prickly, 5 µm. Uniseriate, spherical vesicle 75-85 µm.	Asterric acid, calbistrins, geodin, paspa, PON and sulochrin.
<i>A. japonicus</i> ITAL 253 IBT 33911		Conidia spherical, smooth, slightly rough, 4 µm. Uniseriate, spherical vesicle 75-85 µm.	Calbistrins, pyranonigrin F, pre-aurantiamin, PON, PRS, SMIF and SMÅL
<i>A. aculeatus</i> ITAL 69 IBT 33908		Conidia spherical, smooth, slightly rough, 4.9-5.4 µm. Uniseriate, spherical vesicle 60-63 µm.	Asperflavin, calbistrins, pre-aurantiamin, neoxaline, secalonic acid D & F, PON, SMÅL and TRY.
<i>Aspergillus sp.</i> ITAL 223 IBT 33586		Conidia spherical and ellipsoidal prickly 6-8 micrometers. Uniseriate, spherical vesicle 45 µm.	Neoxaline, secalonic acid D, alk_3.45, DERH, GULUP, HOSNO, PON and STY.

\*Colony on CYA agar, incubated at 25 °C for 7 days. \*\*ITAL = Culture Collection of Fungi, Institute of Food Technology. \*\*\*IBT = Culture Collection of Fungi, Technical University of Denmark.

### 3.4 Analyses of ochratoxin A and fumonisin B<sub>2</sub> in grape samples

The methodology used for analysis of OTA and FB<sub>2</sub> in grapes performed well. OTA recovery values were 86.96, 75.68 and 72.6% for spiking levels of 0.60, 4.12 and 12.37 µg/Kg, respectively. The detection and quantification limits of OTA in grapes were 0.16 µg/Kg and 0.52 µg/Kg, respectively. FB<sub>2</sub> recovery values were 82, 101 and 94.4% for spiking levels of 0.35, 0.50 and 0.62 µg/g, respectively. The detection limit was 0.07 µg/g and the quantification limit 0.24 µg/g.

Although several grape samples showed high contamination by *A. section Nigri*, none of the 88 samples analyzed was contaminated with OTA or FB<sub>2</sub>. Figure 3 shows the chromatogram of the OTA and FB<sub>2</sub> standards with retention times of 12.10 and 17.50 minutes respectively, and the samples did not contain these mycotoxins.



**Fig. 3.** Chromatogram: A) OTA standard; B) Grape sample not contaminated by OTA; C) FB<sub>2</sub> standard; D) Grape sample not contaminated by FB<sub>2</sub>.

## 4. Discussion

The genera of filamentous fungi most commonly isolated from the *V. labrusca* and hybrid grapes analyzed in this study were *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis* and *Penicillium*. All of them, excluding *Fusarium* were also the dominant genera isolated from *V. vinifera* grapes cultivated around the world (Bellí et al., 2004; 2006; Kizis et al., 2014; Oliveri et al., 2016; Sage et al., 2004; Somma et al., 2012). Although the risk of contamination with mycotoxins in grape by *Alternaria*

and *Penicillium* species is known (Mikušová et al., 2014), our study was focused only on *A. section Nigri* because some species of this group of fungi have been highlighted as the main source of contamination by OTA and FB<sub>2</sub> in grapes and wines (Somma et al., 2012).

Among the *Aspergillus* isolated in this study, those from *A. section Nigri* were dominant in all the grape samples, accounting for 97.2% of the total *Aspergillus*. Many surveys have been published dealing with the epidemiology, ecology and distribution of *A. section Nigri* occurring on grapes from different parts of the world, and the majority of them were from *V. vinifera* grapes (Einloft et al., 2016; Garcia-Cela et al., 2015; Perrone et al., 2007; Somma et al., 2012 and references therein). Our study is the first report that characterized the black aspergilli contamination on the surface of *V. labrusca* and hybrid grapes

Several of the surveys in *V. vinifera* grapes showed that among the *Aspergillus* isolates, those from *A. section Nigri* were predominant (Lasram et al., 2007 and references therein). Probably, black spores provide protection from sunlight and consequently a competitive advantage in warmer climates (Pitt and Hocking, 1997). According to the literature, *A. section Nigri* represented 60 to 88% of total *Aspergillus* found in *V. vinifera* grapes from Argentina and Brazil, and this relation was even greater (90%) in some European countries (Bau et al., 2005; Bejaoui et al., 2006; Einloft et al., 2016; Khoury et al., 2008; Magnoli et al., 2003; Serra et al., 2005).

It is a consensus in the literature that the occurrence of *Aspergillus* in grapes is determined by many factors and differs according to agro-climatic regions (Chiotta et al., 2013; Kizis et al., 2014; Perrone et al., 2007). The grape samples analyzed in the present study were obtained from three regions with temperate climate (Rio Grande do Sul, Paraná and São Paulo States) and one with semi-arid climate (São Francisco River Valley, Pernambuco State). The frequency of occurrence, average of contamination and range of contamination by *A. section Nigri* differed between the grape-producing regions. The highest average contaminations was detected in grapes from Pernambuco (66.3%), which has an annual average temperature higher than 26 °C, with minimum of 19 °C and maximum of 33 °C, and a mean annual precipitation of 400 mm. The lower average contamination was detected in grapes from Rio Grande do Sul (4.5%), where the climate is temperate, with average temperature of 17.3 °C, with minimum of 12.9 °C and maximum of 22.9 °C; and mean annual precipitation of 1,736 mm

(<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9332119/artigo-historico-climatico-de-2015-e-a-safra-viticola-201516-no-rio-grande-do-sul>).

By means of morphology, *A. section Nigri* uniseriate group were the most abundant among the *A. section Nigri* found in all regions analyzed in this present study, representing 79.3%. The uniseriate black aspergilli were not mentioned in the literature as OTA and FB<sub>2</sub> producers, but a few species were able to produce secalonic acid D according to Somma et al. (2012). This mycotoxin could occur in wine and grape juice.

*A. niger* "aggregate" group, which includes some OTA and FB<sub>2</sub> producers' species, was the second most common group of fungi found in this study, with 18.2% of the total of *A. section Nigri*. These results are different from those obtained for *V. vinifera* grown around the world, including Brazil, in which the biseriate species belonging to *A. niger* "aggregate" have been described as the most prevalent fungi on grapes (Somma et al., 2012).

The frequency of *A. carbonarius*, which has been considered as the main fungus responsible for producing OTA in grapes, was much lower (2.4% the total of *A. section Nigri*), than those that have been related for *V. vinifera* grape samples from Greece (43.7%), Tunisia (35.6%), France (35%), South Italy (30%), and Portugal (10.5%) (Bejaoui et al., 2006; Kizis et al., 2014; Lasram et al., 2007; Serra et al., 2003; Somma et al., 2012; Spadaro et al., 2012).

*A. niger* "aggregate" and some uniseriate species are difficult to distinguish morphologically (Kizis et al., 2014) and always require molecular data. Based on Samson et al. (2014) recommendation, we used *CaM* sequence analysis in order to identify 248 strains previously recognized as *A. niger* "aggregate" or *A. section Nigri* uniseriate. As shown in our results, the prevalent species on the surface of the grapes, in all regions here studied, was the uniseriate species *A. japonicus*. *A. uvarum* was not isolated from grapes collected in the semi-arid region, but this species was frequently found on the grapes collected from temperate climate regions. *A. brunneoviolaceus* and *A. aculeatus* were also identified, but at a very low frequency of occurrence. Interestingly, 11 uniseriate strains, found only in Rio Grande do Sul, were different from all other species described until now and further investigation is required to clarify whether they represent a new species of *A. section Nigri*.

Among the *A. niger* "aggregate" analyzed using *CaM* sequences (59) the most frequent species were *A. niger sensu stricto* (64.4%) which is recognized as an ochratoxin and fumonisin producing species.

Of the 2,042 strains of *A. section Nigri* tested for OTA production, only 65 strains (3.2%) were able to produce OTA. Among the OTA producer strains, 49 (75.4%) were *A. carbonarius* strains, and 16 (24.6%) were strains belonging to *A. niger* "aggregate". Our results agree with other previous surveys showing that among all strains of *A. section Nigri* tested for their ochratoxigenic capacity, the majority was *A. carbonarius* (Kizis et al., 2014; Lasram et al., 2012; Medina et al., 2005; Somma et al., 2012).

In regard to FB<sub>2</sub>, all positive strains ( $n = 157$ ) were members of *A. niger* "aggregate". The percentage of *A. niger* "aggregate" positive for FB<sub>2</sub> reported in this study (42.1%) was higher than those reported in Abrunhosa's study, which showed 29% of FB<sub>2</sub> positive strains among 597 strains collected from Portuguese *V. vinifera* grapes (Abrunhosa et al., 2011). It is important to state that among *A. niger* "aggregate" species, only *A. niger* and *A. welwitschiae* are proven FB<sub>2</sub> producing species; however among the strains of these species not all produce FB<sub>2</sub>. In our study, we detected that 73.7% of *A. niger sensu stricto* were FB<sub>2</sub> producers. This percentage is similar to those described by others authors who carried out the studies of fumonisin-producing abilities of *A. niger sensu stricto* isolates (Frisvad et al., 2011; Massi et al., 2016). Concerning to *A. welwitschiae* strains we found a lower frequency of occurrence (18.2%) of FB<sub>2</sub> producers compared to *A. niger sensu stricto*, which is in agreement with recent studies in the literature (Gherbawy et al., 2015; Massi et al., 2016).

Although several grape samples analyzed were contaminated with *A. section Nigri*, and approximately 11% of them were able to produce OTA and/or FB<sub>2</sub> in vitro, none of the 88 grape samples were contaminated with these mycotoxins. The absence of OTA and FB<sub>2</sub> in our grape samples is probably because they were collected in the field during harvest time, without damaged and/or delayed ripening. According to Chiotta et al. (2013), damaged and/or over-ripe grapes can increase the risk of OTA contamination.

Taking into account that black aspergilli spores can be on the surface of *V. vinifera* and also in *V. labrusca* grapes produced in Brazil, as shown in our study, and OTA and FB<sub>2</sub> were already reported in grapes and products (Battilani et al., 2006; Qi et al., 2016; Mogensen et al., 2010a;b; Otteneder and Majerus, 2000; Rosa et al., 2004; Soto et al., 2014), we suggested the adoption of good harvesting practices and proper fruit management after harvesting to prevent the contamination of grape products by these micotoxins .

## Acknowledgments

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Process 2013/05414-8), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Process 471813/2013-3) together with Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## References

- Abrunhosa, L., Calado, T., Venâncio, A., 2011. Incidence of fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger* in portuguese wine regions. *J. Agric. Food Chem.* 59, 7514–7518.
- Abrunhosa, L., Paterson, R.R.M., Kozakiewicz, Z., Lima, N., Venâncio, A., 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 240–242.
- Ali, K., Maltese, F., Choi, Y.H., Verpoorte, R., 2010. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochem. Rev.* 9, 357-37..
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2011) Resolução RDC n. 7, 18/02/2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Online Database [http://bvs.ms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007\\_18\\_02\\_2011\\_rep.html](http://bvs.ms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html). Accessed 10 June 2016.
- Arcanjo, N.M.O., Neri-Numa, I.A., Bezerra, T.K.A., Silva, F.L.H., Pastore, G.M., Madruga, M.S., 2017. Quality evaluation of red wines produced from the Isabella and Ives cultivar (*Vitis labrusca*): physicochemical parameters, phenolic composition and antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.16516>.
- Battilani, P., Magan, N., Logrieco, A., 2006. European research on ochratoxin A in grapes and wine. *Int. J. Food Microbiol.* 111 (1), S2-S4.

- Bau, M., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguéz, S., Cabañes, F.J., 2005. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 125–130.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A., 2006. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. *Int. J. Food Microbiol.* 111 (1), S46–S52.
- Bellí, N., Bau, M., Marín, S., Abarca, M.L., Ramos, A.J., Bragulat, M.R., 2006. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 111 (1), S40–S45.
- Bellí, N., Mitchell, D., Marín, S., Alegre, I., Ramos, A.J., Magan, N., Sanchis, V., 2005. Ochratoxin A-producing fungi in Spanish wine grapes and their relationship with meteorological conditions. *Europ. J. Plant Pathol.* 113, 233–239.
- Bellí, N., Pardo, E., Marín, S., Farré, G., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2004. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. *J. Sci. Food Agric.* 84, 541–546.
- Built, J., Dubos, B., 1988. *Botrytis* bunch rot and blight. In: Pearson, R.G., Goheen, A.C. (Eds.), *Compendium of grape diseases*, Am. Phytopathol. Soc. Press, St-Paul, Minnesota, pp. 13-15.
- Chiotta, M.L., Ponsone, M.L., Sosa, D.M., Combina, M., Chulze, S.N., 2013. Biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentinian vineyards and ochratoxin A contamination. *Food Microbiol.* 36, 182–190.
- Einloft, T.C., Hoeltz, M., Teixeira, T.R., Oldoni, V.P., Manfroi, V., Noll, I.B., 2016. Survey of mycobiota, black *Aspergillus* and ochratoxin A occurrence on Brazilian wine grapes. *Ann. Microbiol.* DOI 10.1007/s13213-016-1236-0.

- Eurachem Guides. 2014. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. Teddington (United Kingdom): LGC, 62p.
- Ferranti, L.S., Correa, B., Fungaro, M.H.P., Iamanaka, B.T., Massi, F.P., Phippen, C.B.W., Frisvad, J.C., Taniwaki, M.H., 2016. Occurrence and fumonisin B<sub>2</sub> producing potential of *Aspergillus* section *Nigri* in Brazil nuts. *Mycotoxin Res.* DOI 10.1007/s12550-016-0262-x
- Ferreira, V., Bueno, M., Franco-Luesma, E., Culleré, L., Fernández-Zurbano, P., 2014. Key changes in wine aroma active compounds during bottle storage of Spanish red wines under different oxygen levels. *J. Agric. Food Chem.* 62, 10015–10027.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C., Svendsen, J.A., 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 581–585.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larsen, T.O., Thrane, U., 2007. Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9727–9732.
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R.A., Nielsen, K., 2011. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS One* 6, e23496.
- García-Cela, E., Crespo-Sempere, A., Gil-Serna, J., Porqueres, A., Marin, S., 2015. Fungal diversity, incidence and mycotoxin contamination in grapes from two agro-climatic Spanish regions with emphasis on *Aspergillus* species. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1716–1729.
- Gherbawy, Y., Elhariry, H., Kocsubé, S., Bahobial, A., Deeb, B.E., Altalhi, A., Varga, J., Vágvolgyi, C., 2015. Molecular characterization of black *Aspergillus* species from onion and their potential for ochratoxin A and fumonisin B<sub>2</sub> production. *Foodborne Pathog. Dis.* 12, 414–423.

- Hong, S.B., Cho, H.S., Shin, H.D., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2006. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 477–486.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1993. Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, vol. 56. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, p. 489.
- Instituto Brasileiro de vinho (IBRAVIN), 2016. Comercialização de vinhos - Empresas do RS. disponível in: <http://www.ibraevin.org.br/admin/arquivos/estatisticas/1458840676.pdf/> Accessed 10 Feb 2017.
- Khoury, A.E., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M.L., Lebrihi, A., 2008. Fungal contamination and aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2244–2250.
- Kizis, D., Natskoulis, P., Nychas, G.J.E., Panagou, E.Z., 2014. Biodiversity and ITS-RFLP characterisation of *Aspergillus* section *Nigri* isolates in grapes from four traditional grape-producing areas in Greece. *PLoS ONE* 9, e93923.
- Klich, M.A., Pitt, J.I., 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their Teleomorphs CSIRO Division of Food Science and Technology, Sydney, Australia.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evolution* 33, 1870-1874.
- Lasram, S., Bellí, N., Chebil, S., Nahla, Z., Ahmed, M., Sanchis, V., Ghorbel, A., 2007. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 376–379.

- Lasram, S., Oueslati, S., Mliki, A., Ghorbel, A., Silar, P., Chebil, S., 2012. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. *Food Control* 25, 75–80.
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., Dalcero, A., 2003. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 179–184.
- Massi, F.P., Sartori, D., Ferranti, L.S., Iamanaka, B.T., Taniwaki, M.H., Vieira, M.L.C., Fungaro, M.H.P., 2016. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 221, 19–28.
- Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M., 2005. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4696–4702.
- Mikušová, P., Sulyok, M., Santini, A., Šrobárová A., 2014. *Aspergillus* spp. and their secondary metabolite production in grape berries from Slovakia. *Phytopath. Mediter.* 53, 311–317.
- Mogensen, J.M., Frisvad, J.C., Thrane, U., Nielsen, K.F., 2010a. Production of fumonisin B<sub>2</sub> and B<sub>4</sub> by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. *J. Agric. Food Chem.* 58, 954–958.
- Mogensen, J.M., Larsen, T.O., Nielsen, K.F., 2010b. Widespread occurrence of the mycotoxin fumonisin B<sub>2</sub> in wine. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4853–4857.
- Nielsen, K.F., Månsson, M., Rank, C., Frisvad, J.C., Larsen, T.O. 2011. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *J. Nat. Prod.* 74, 2338–2348.

- Oliveri, C., Bella, P., Tessitori, M., Catara, V., La Rosa, R., 2016. Grape and environmental mycoflora monitoring in old, traditionally-cultivated vineyards on Mount Etna, southern Italy. *J. Sci. Food Agric.* 97, 65–73.
- Otteneder, H., Majerus, P., 2000. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Addit. Contam.* 17, 793–798.
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A., 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Stud. Mycol.* 59, 53–66.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 2009. *Fungi and food spoilage*. third edition. Springer, New York, USA.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. *Fungi and Food Spoilage*. second edition. Blackie Academic and Professional, London.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., MacDonald, K.D., Bufton, A.W.J., 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5, 141–148.
- Qi, T.F., Renaud, J.B., McDowell, T., Seifert, K.A., Yeung, K.K.C., Sumarah, M.W., 2016. Diversity of mycotoxin-producing black aspergilli in Canadian vineyards. *J. Agric. Food Chem.* 64, 1583–1589.
- Rosa, C.A.R., Magnoli, C.E., Fraga, M.E., Dalcerro, A.M., Santana, D.M.N., 2004. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Addit. Contam.* 21, 358–364.
- Sage, L., Garon, D., Seigle-Murandi, F., 2004. Fungal microflora and ochratoxin a risk in French vineyards. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5764–5768.

- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Samson. R.A., Houbraeken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M., Frisvad, J.C., 2004. New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol.* 50, 45–61.
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraeken, J., Hong, S.B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J.C., 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 78, 141–173.
- Santini, A., Mikušová, P., Sulyok, M., Krska, R., Labuda, R., Šrobárová, A., 2014. *Penicillium* strains isolated from Slovak grape berries taxonomy assessment by secondary metabolite profile. *Mycotoxin Res.* 30, 213–220.
- Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., Venâncio, A., 2003. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 63–68.
- Serra, R., Braga, A., Venâncio, A., 2005. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Res. Microbiol.* 156, 515–521.
- Somma, S., Perrone, G., Logrieco, A.F., 2012. Diversity of *black Aspergilli* and mycotoxin risks in grape , wine and dried vine fruits. *Phytopath. Mediter.* 51, 131–147.
- Soto, J.B., Fernández-Franzón, M., Ruiz, M.J., Juan-García, A., 2014. Presence of ochratoxin A (OTA) mycotoxin in alcoholic drinks from southern european countries: Wine and beer. *J. Agric. Food Chem.* 62, 7643–7651.

- Spadaro, D., Patharajan, S., Lorè, A., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2012. Ochratoxigenic black species of aspergilli in grape fruits of northern Italy identified by an improved PCR-RFLP procedure. *Toxins* 4, 42–54.
- Susca, A., Proctor, R.H., Mulè, G., Stea, G., Ritieni, A., Logrieco, A., Moretti, A., 2010. Correlation of mycotoxin fumonisin B<sub>2</sub> production and presence of the fumonisin biosynthetic gene *fum8* in *Aspergillus niger* from grape. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9266–9272.
- Toaldo, I.M., Cruz, F.A., Alves, T.D.L., Gois, J.S., Borges, D.L.G., Cunha, H.P., Silva, E.L., Bordignon-Luiz, M.T., 2015. Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. *Food Chem.* 173, 527–535.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G., Samson, R.A., 2011. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol.* 69, 1–17.
- Vargas, E.A., Santos, E.A., Pittet, A., Corrêa, T.B., Rocha, A.P., Diaz, G.J., Gorni, R., Koch, P., Lombaert, G.A., MacDonald, S., Mallmann, C.A. Meier, P., Nakajima, M., Neil, R.J., Patel, S., Petracco, M., Prado, G., Sabino, M., Steiner, W., Stroka, J., Taniwaki, M.H., Wee, S.M., 2005. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 88, 773–779.
- Visconti, A., Solfrizzo, M., De Girolamo, A., 2001. Determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: collaborative study. *J. AOAC Int.* 84, 1828–1837.
- Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G., Solfrizzo, M., 2008. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Addit. Contamin.* 25, 193–202.

**Artigo Científico 2: *Aspergillus labruscus* sp. nov., a new species of *Aspergillus* section *Nigri* discovered in Brazil**

**Abstract**

A novel fungal species, *Aspergillus labruscus* sp. nov., has been found in Brazil during an investigation of the fungal species present on the surface of grape berries (*Vitis labrusca* L.) for use in the production of concentrated grape juice. It seems to be associated to *V. labrusca*, and has never been recovered from *Vitis vinifera*. This new species belonging to *Aspergillus* subgenus *Circumdati* section *Nigri* is described here using morphological characters, extrolite profiling, partial sequence data from the  $\beta$ -tubulin and calmodulin genes, and internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA. Phenotypic and molecular data enabled this novel species to be clearly distinguished from other black aspergilli. *Aspergillus labruscus* sp. nov. is uniseriate, has yellow mycelium, poor sporulation on CYA at 25°C, abundant yellow sclerotia and rough conidia. Neoxaline and secalonin acid D were consistently produced by isolates in this taxon. The type strain of *A. labruscus* sp. nov. is CCT 7800 (T) = ITAL 22.223 (T) = IBT 33586 (T).

**Introduction**

The production and commercialization of grape juice concentrate is growing every year in Brazil. Purple grape juice is rich in polyphenol compounds which have been associated with protective effects on the vascular system and with improvement in cognition and neuronal function with aging<sup>1</sup>.

Serra Gaúcha, in the southern Brazilian state of Rio Grande do Sul is acknowledged as the largest grape producing region in Brazil. The main features of this region include low levels of sunlight and acid soils with good drainage. Various grape cultivars are widely used in the Serra Gaúcha region, but some 90% of the growing area is planted with vines of *Vitis labrusca* L., the most important species for grape juice production<sup>2</sup>. Grapes have been grown in this region since the 19<sup>th</sup> century when Italian immigrants arrived bringing with them the culture and tradition of wine production and consumption. These Italian immigrants used their farming knowledge in their new homeland to provide food for consumption and subsistence. However, the climatic

conditions of the region were not favorable for growing the European (*Vitis vinifera* L.) grape cultivars, which led to the introduction of hardier cultivars of American origin (*Vitis labrusca* L.) with better resistance to biotic and abiotic stress. Nowadays “Isabel”, “Isabel Precoce”, “Bordô” and “Concord” are the *V. labrusca* cultivars extensively grown throughout Rio Grande do Sul. In 2014, 540,000 Kg of *V. labrusca* grapes were produced in this state<sup>3</sup>, and used mostly for the production of concentrated grape juice.

More recently, in addition to Rio Grande do Sul, the Brazilian states of Pernambuco (Petrolina region), Paraná, São Paulo and Minas Gerais have also become significant producers of grape concentrate for juice. This kind of juice is exported to many countries, and used to make grape nectar and grape beverages. Indeed, Brazil is the 10<sup>th</sup> largest exporter by volume of grape juice and is one of the few countries in the world where *V. labrusca* is grown on a commercial scale. About 90 million liters of grape juice were sold in 2014.

Fungi belonging to *Aspergillus* section *Nigri*, also called “the black aspergilli”, have been shown to occur frequently throughout the world on grapes for wine production, such as *V. vinifera*<sup>4-8</sup>. However, black aspergilli populations on grapes for the production of concentrated grape juice, and especially *V. labrusca*, have yet to be described. Some black aspergilli are important in biotech processes and also in biodeterioration, but some species in this section can produce carcinogenic mycotoxins ochratoxin A<sup>9</sup> and fumonisins, especially fumonisin B<sub>2</sub><sup>10</sup>.

Samson *et al.*<sup>11</sup> recently provided an updated accepted species list for the genus *Aspergillus*, and 27 species are included in *Aspergillus* section *Nigri*. The authors discussed different approaches to species identification in *Aspergillus* and recommended DNA markers as a reliable means of identification. Information on living ex-type culture collection numbers and GenBank accession numbers for available representative ITS, calmodulin,  $\beta$ -tubulin and RPB2 sequences were listed, and calmodulin gene sequences (*CaM* sequences) were proposed as important identification markers for *Aspergillus* section *Nigri*.

During an investigation of the fungal species in grapes for juice production, a new *Aspergillus* taxon in *Aspergillus* section *Nigri* was found on the surface of grape berries. This species was found only in the region of Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul, and on one grape variety, “Bordô”. It is described here as *Aspergillus labruscus* sp. nov. and this species does not produce ochratoxins and fumonisins.

## Results and Discussion

- **Molecular identification**

It is very difficult to identify fungi belonging to *Aspergillus* section *Nigri* due to the subtle morphological differences between species, and therefore DNA sequence information is increasingly being used for species identification and diagnosis.

Fungi belonging to *A.* section *Nigri* have been identified mainly using calmodulin gene sequences, because the internal transcribed spacer (ITS) of the nuclear ribosomal (nrDNA), accepted as the official DNA barcode for fungi<sup>12</sup>, is insufficient for correctly identifying all *Aspergillus* section *Nigri* species<sup>11</sup>. The calmodulin gene sequence contains more variation than the ITS and the nucleotide sequence database is complete for all accepted species<sup>11</sup>.

Thus, as an initial step, part of the calmodulin gene (*CaM*) sequence was determined for 275 isolates of *Aspergillus* section *Nigri* found on the surface of the *V. labrusca* grape berries for four different Brazilian regions, to identify the species. All *CaM* gene sequences were compared using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) against the NCBI database to recognize fungal species that have similar DNA sequences. The majority of gene sequences were similar (sequence identity > 99%) to one of the species described as *Aspergillus* section *Nigri*, but the *CaM* gene sequences from 23 isolates were found to be significantly different from all other sequences of species described so far (NCBI accessed 20 Dez, 2016). Using the BLAST tool it was found that the *CaM* gene sequences from these isolates are most similar to those from *Aspergillus homomorphus*, but with only 85% of sequence identity.

Samson *et al.*<sup>11</sup> provided an updated accepted species list for the genus *Aspergillus*, now containing 339 species, and to enhance the scientific value of the list, it includes information on living ex-type culture collection numbers and GenBank accession numbers for available representative ITS, calmodulin,  $\beta$ -tubulin and RPB2 sequences. We generated a *CaM*-based phylogram of the 23 sequences not assigned to any described species using the BLAST tool, and those retrieved from GenBank for each *Aspergillus* section *Nigri* on Samson's updated list. The *CaM*-based phylogram placed our isolates on a branch clearly separated from all other species of *Aspergillus* section *Nigri* (Fig. 1). The novel isolate was found to belong to a clade including *Aspergillus homomorphus* and *A. saccharolyticus*.

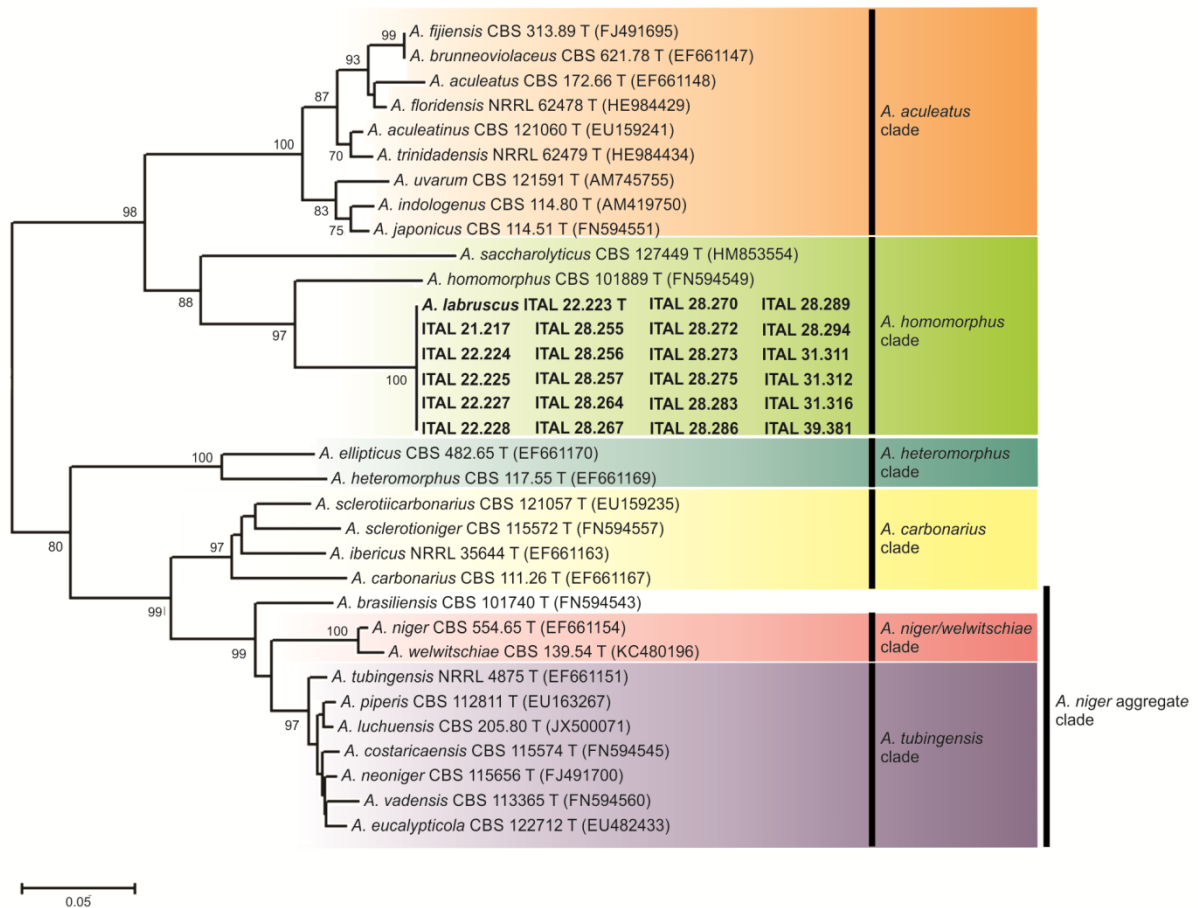


Figure 1. Neighbor-Joining phylogenetic tree based on partial calmodulin gene sequence data for *Aspergillus* section *Nigri*. Bootstrap percentages (based on 1000 resampled datasets) are shown at nodes.

Six isolates of the putative novel species were random selected for further analysis. The nrDNA (ITS), region and partial  $\beta$ -tubulin gene (*BenA*) were sequenced. As discussed by Samson *et al.*<sup>11</sup>, a frequent difficulty experienced with sequence-based identifications is comparing newly obtained sequences with verified sequence databases. GenBank is a public, archival database, which means that it accepts all sequences submitted and cannot always verify the taxonomic names attributed to the sequences, and therefore BLAST search results may give hits to misidentified sequences in the database. In an attempt to clean up misidentified GenBank sequences, the RefSeq initiative was launched (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>), and lists only verified sequences<sup>13</sup>. For *Aspergillus*, all ex-type sequences were included in the RefSeq database. Using the BLAST tool with the “sequences from type material” (RefSeq) option (accessed 20 Jan, 2017), the ITS sequence from our novel isolates was found to

be most similar to those from *A. homomorphus* CBS 101889, *Aspergillus aculeatus* CBS 172.66 and *Aspergillus japonicus* CBS 114.51, all of which have only 85-88% sequence identity. Both, *A. aculeatus* and *A. japonicus* belong to the *A. aculeatus* clade in section *Nigri*, and *A. homomorphus* belongs to the *A. homomorphus* clade in section *Nigri*<sup>11</sup>. Interestingly, the ITS amplicon length from all isolates of the putative novel species (540 bp), obtained with the ITS1-ITS4 primer-pair<sup>14</sup>, was smaller than that of all other *Aspergillus* section *Nigri*. They exhibit a 38-39 bp deletion in the ITS1 region when compared to *A. aculeatus*, *A. homomorphus*, *A. japonicus* and *A. saccharolyticus* (Fig. 2).

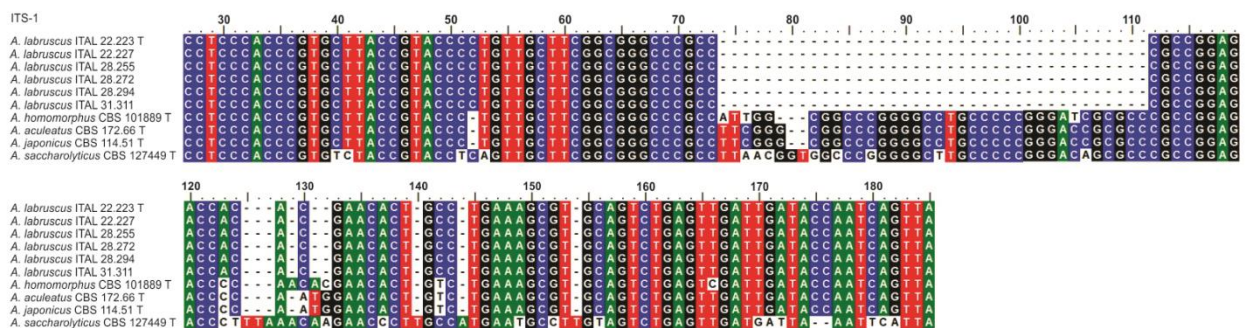


Figure 2. Sequence alignment of ITS1 from *Aspergillus labruscus*, *A. aculeatus*, *A. homomorphus*, *A. japonicus* and *A. saccharolyticus*.

Although the  $\beta$ -tubulin (*BenA*) gene may vary in the number of introns, and the PCR sometimes results in the amplification of paralogous genes<sup>15</sup>, this *locus* has been frequently used for molecular identification of *Aspergillus*. Thus, the DNA sequences from the six isolates of the putative novel species were determined for a portion of *BenA*. Comparative BLAST sequence analyses of the six isolates revealed that they are more similar to *A. homomorphus* ex-type strain CBS 101889, with 85% of sequence identity. A comparison of a 430-bp fragment of  $\beta$ -tubulin gene in our isolates of the putative novel species relative to *A. homomorphus* neotype strain CBS 101889 revealed 28 interspecific single nucleotide polymorphisms (SNP's) and 3 deletion or insertion polymorphisms (indel).

In conclusion, the ITS, *BenA* and *CaM* sequences harmonized to show that our isolates belong to a novel phylogenetic species, most similar to *A. homomorphus*. We suggest the name *Aspergillus labruscus* sp. nov. for this new phylogenetic species and as its type, strain CCT 7800 (T) = ITAL 22.223 (T) = IBT 33586 (T). The GenBank

accession numbers of the ITS barcodes and alternative identification markers *BenA* and *CaM* are KU708544, KT986014, KT986008, respectively. *Aspergillus homomorphus* is an uniseriate species and shares with *A. aculeatus* and *A. labruscus*, as will be shown later, the production of secalonic acid D, not found in any other black aspergilli species.

- **Metabolite Analysis**

Six strains of *A. labruscus* were examined for extrolites and they all produced secalonic acid D and neoxaline (Table 1). The phylogenetically closely related species *A. saccharolyticus* differed from *A. labruscus* by producing aculene A and B<sup>16</sup> and homomorphosins. *A. homomorphus*<sup>17</sup> shares production of secalonic acid D with *A. labruscus*, but differs by producing homomorphosins and 3-methoxy-5-hydroxy-9-phenyl-2,4,6,8-nanotetraoic acid lactone (Hoeck, Petersen, Frisvad, Gotfredsen and Larsen, personal communication). The ex type strain produced two as yet not structure elucidated extrolites, that have only been observed in *A. labruscus*. Metabolite analysis indicated that *A. labruscus* does not produce ochratoxins and fumonisins.

**Table 1.** Extrolite profiles of *Aspergillus labruscus* strains\*.

Strain	Extrolite profile
ITAL 22.223 (T) = IBT 33586 (T) = CCT 7800(T)	neoxaline, secalonic acid D
ITAL 28.294 = IBT 33585	neoxaline, secalonic acid D
ITAL 22.227 = IBT 33583	neoxaline, secalonic acid D
ITAL 31.311 = IBT 33582	neoxaline, secalonic acid D an apolar aculene (with an aculene A chromophore)
ITAL 28.272 = IBT 33581	neoxaline, secalonic acid D
ITAL 28.255 = IBT = 33584	neoxaline, secalonic acid D

\*Strain ITAL 28.275, ITAL 22.225 and ITAL 28.256 also produced secalonic acid D and neoxaline.

- **Macro and Micromorphology Analysis**

Colony diameters after 7 days at 25°C were as follows: CYA: 70-77 mm, MEA: 56-60 mm, YESA: 69-79 mm, OAT: 42-45 mm, CREA: 3-4 mm and CYA + 5% NaCl: no growth. On CYA at 10°C conidia germinate, at 15°C, 20°C and 30°C growth is evident with colony diameters of 9-17 mm, 59-71 mm and 56-86 mm, respectively. The species does not grow on CYA at 37°C and 42°C while at 33°C the colony diameters varies from 0 to 22 mm, indicating that at this temperature the growth response varies among the isolates. At 25°C in CYA, the species showed yellow mycelium, poor sporulation, abundant salmon to pink sclerotia production, and reverse pale yellow in color. Figure 3 shows the colonies of *A. labruscus* (CCT 7800) on different media and temperatures. Micromorphology characters are as follows: uniseriate, spherical conidial heads, brown colored stipes smooth with thick wall (3.2-6.1 µm), vesicle 43 x 45 µm, phialides 7.2-7.8 x 3.8 µm, conidia not uniform in size and shape, subglobose to ellipsoidal 6.5-8 x 6.1-6.9 µm, black and conspicuously rough. Figure 4 shows the morphology on CYA and MEA at 25°C and the micromorphological characteristics.

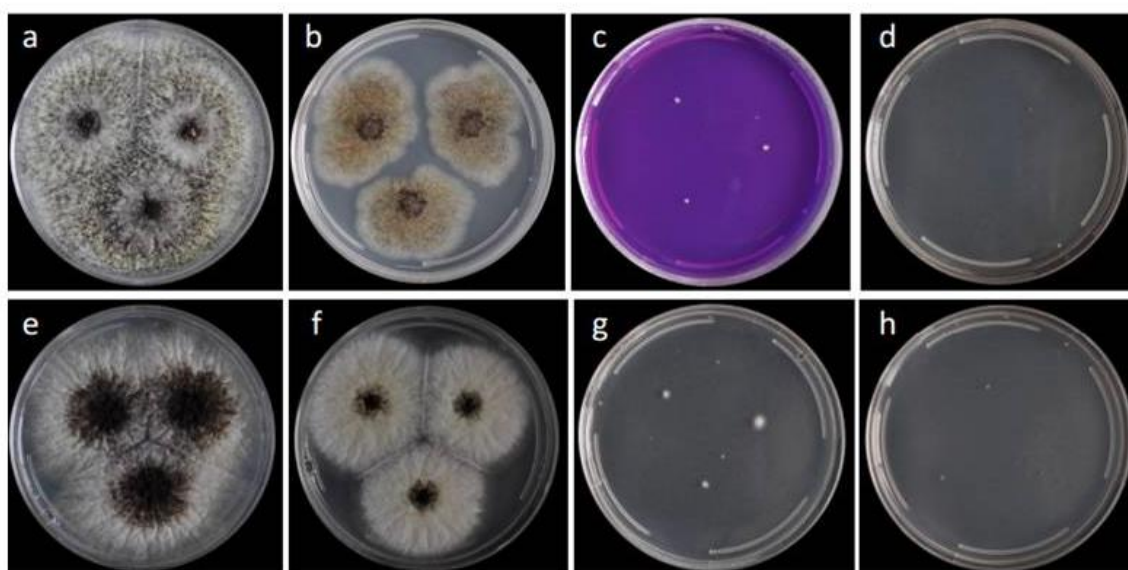


Figure 3. *Aspergillus labruscus* sp. nov. CCT 7800. (a) Colonies on CYA at 25°C, (b) MEA at 25°C, (c) CREA at 25°C, (d) CYA at 33°C, (e) CYA at 30°C, (f) CYA at 20°C, (g) CYA at 15°C and (h) CYA at 10°C.

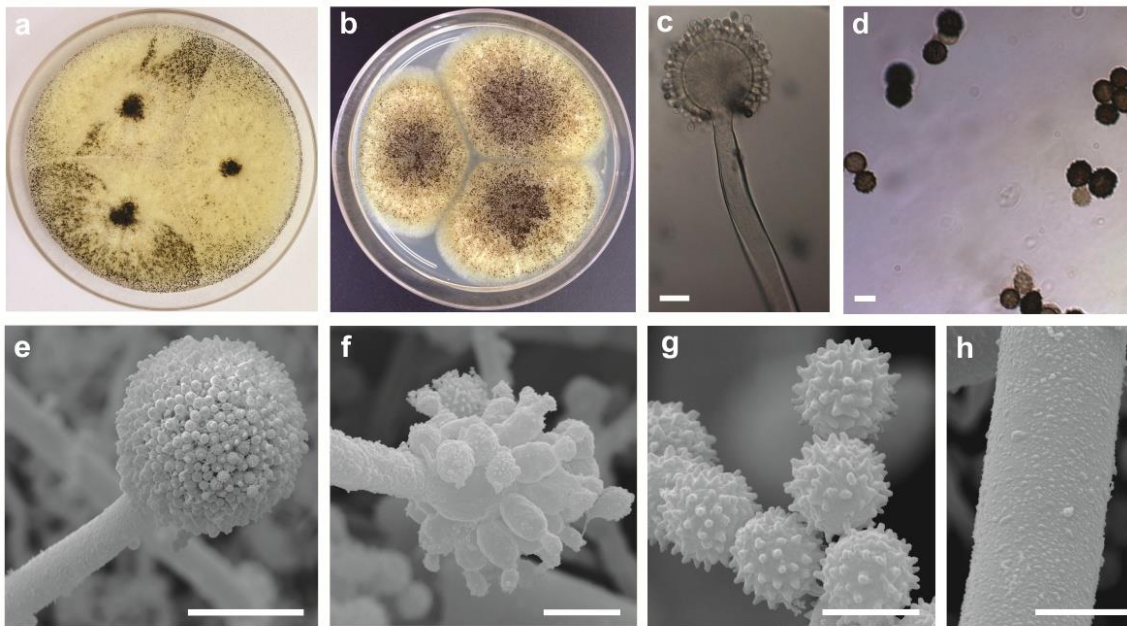


Figure 4. *Aspergillus labruscus* sp. nov. CCT 7800. (a) Colonies on CYA, (b) colonies on MEA, (c) conidiophores under light microscopy, (d) conidia under light microscopy, (e-f) conidiophores as seen using SEM, (g) conidia as seen using SEM, (h) stipe as seen using SEM. Bars, 10  $\mu\text{m}$  (c, f and h), 5  $\mu\text{m}$  (d and g), 50  $\mu\text{m}$  (e).

Morphologically *A. labruscus* is similar to *A. sclerotioniger* because both have yellow mycelium, poor sporulation on CYA at 25°C, abundant yellow sclerotia and rough conidia. However, they differ because *A. sclerotioniger* has biseriate aspergilla and produces ochratoxin A<sup>11</sup> while *A. labruscus* is uniseriate and does not produce this mycotoxin.

Although molecular data revealed that *A. labruscus* is most similar to *A. homomorphus*, *A. saccharolyticus* and *A. aculeatus*, yellow mycelium, salmon to pink sclerotia and large subglobose to ellipsoidal conidia (6.5-8  $\mu\text{m}$ ) differentiate *A. labruscus* from these species. Furthermore, *A. labruscus* differed from *A. homomorphus* and *A. saccharolyticus* because these two species were able to grow on CYA at 37°C with diameters 18 mm and 7-10 mm, and on CYA + 5% NaCl with diameters of 68 mm and 17 mm, respectively.

- **Incidence and Ecology**

Among a total of 89 grape samples collected from different regions and grape cultivars analyzed for fungal contamination, 5 samples (5.6%) revealed the presence of *Aspergillus labruscus*. In total, 23 isolates of this new species were found on the surface

of grape berries, *Vitis labrusca*, cv. Bordô grown in Rio Grande do Sul (Serra Gaúcha). The origins of representative *A. labruscus* isolates are shown in Table 2. This new species was not found in the other Brazilian regions. Table 3 shows the frequency of *A. labruscus* on the samples from different vineyards of Rio Grande do Sul and the range of contamination. Serra Gaúcha has a distinct climatic condition for vineyards, with an annual average temperature of 17°C, rainfall of 1700 mm and relative humidity of 76%. While most of the world's vineyards grow the European cultivars (*V. vinifera*) which produces fine wine, in Brazil due to the high humidity conditions, this species was affected by fungal disease and did not adapt to Brazilian conditions. Thus the rustic North American cultivars of *V. labrusca* were introduced, which showed high disease resistance, and today 80% of Brazilian vineyards grow the cultivar *V. labrusca*, especially in the State of Rio Grande do Sul.

It is interesting to note that *Aspergillus labruscus* has never been found on *V. vinifera* grapes. A similar situation is known for peanuts where the species *Aspergillus arachidicola*, has only been found on the wild type species *Arachis glabrata*, but not on the domesticated peanut, *Arachis hypogea*<sup>18</sup>.

Data on growth temperatures under laboratory condition as presented above showed that *A. labruscus* was able to grow at temperatures of 15°C to 33°C, with no growth at 37°C. Most members of *A.* section *Nigri* can grow at 37°C and even higher<sup>19,20</sup>, including the closely species *A. homomorphus* and *A. saccharolyticus*. *A. labruscus* has never been found before in European vineyards and grape products<sup>21</sup> indicating that *A. labruscus* have an association with *V. labrusca* rather than *Vitis vinifera*. Data on the growth temperature of *A. labruscus* show that this species is adapted to colder temperatures, which may be due to its North American origin and therefore well-adapted to the Serra Gaúcha region which is colder than the other regions in Brazil. In addition, data to be published later will show that this species has not been found in *V. labrusca* cv. Bordô vineyards in the North Brazilian region.

**Table 2.** *Aspergillus labruscus* isolates from grapes grown in Rio Grande do Sul State.

<b>*ITAL Code</b>	<b>**CCT</b>	<b>***IBT</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Region (City/ State)</b>
21.217			Bordô	Bento Gonçalves/RS
22.223	7800	33586	Bordô	Bento Gonçalves/RS
22.224			Bordô	Bento Gonçalves/RS
22.225		33589	Bordô	Bento Gonçalves/RS
22.227		33583	Bordô	Bento Gonçalves/RS
22.228			Bordô	Bento Gonçalves/RS
28.255		33584	Bordô	Garibaldi/RS
28.256		33587	Bordô	Garibaldi/RS
28.257			Bordô	Garibaldi/RS
28.264			Bordô	Garibaldi/RS
28.267			Bordô	Garibaldi/RS
28.270			Bordô	Garibaldi/RS
28.272		33581	Bordô	Garibaldi/RS
28.273			Bordô	Garibaldi/RS
28.275		33588	Bordô	Garibaldi/RS
28.283			Bordô	Garibaldi/RS
28.286			Bordô	Garibaldi/RS
28.289			Bordô	Garibaldi/RS
28.294		33585	Bordô	Garibaldi/RS
31.311			Bordô	Veranópolis/RS
31.312			Bordô	Veranópolis/RS
31.316			Bordô	Veranópolis/RS
39.381			Bordô	Pinto Bandeira/RS

\*ITAL = culture collection of the Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, Brazil

\*\*CCT = tropical culture collection of André Tosello Foundation, Campinas, Brazil

\*\*\*IBT = culture collection of the Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark.

**Table 3.** Incidence of *Aspergillus labruscus* on grape berry samples (*Vitis labrusca*) from Rio Grande do Sul, Brazil.

Origin	N° of positive samples/n° of samples	Range of contamination (%)
Bento Gonçalves	2/9	0 - 5%
Garibaldi	1/3	0 - 13%
Veranópolis	1/6	0 - 3%
Pinto Bandeira	1/5	0 - 1%
Farroupilha	0/4	0
Caxias do Sul	0/3	0
<b>Sample Total</b>	<b>5/30</b>	<b>0 - 15%</b>

- **Enzyme production**

Black aspergilli are particularly effective enzyme producers<sup>20</sup> and the three closely related species *A. labruscus*, *A. homomorphus* and *A. saccharolyticus* were examined for the production of two extracellular enzymes: tannase and caseinase (Table 4). On TAN medium used for tannase production, *A. labruscus*, *A. homomorphus* and *A. saccharolyticus* grew and showed good sporulation, but the tannase production was most pronounced in *A. homomorphus*, followed by *A. labruscus* and was poor in *A. saccharolyticus*. Grape fruits have a high content of tannin, and it would be expected that *A. labruscus* can produce tannase. On Pro agar, the three species grew and sporulated well, but caseinase was not produced by *A. homomorphus* while *A. labruscus* and *A. saccharolyticus* showed very good production of this enzyme. These two culture media for extracellular enzyme production showed good performance to differentiate these three species, showing that they are distinct and giving a different response in enzyme production. Since *A. saccharolyticus* is one of the best  $\beta$ -glucosidase producers known<sup>22,23</sup>, it should be investigated whether *A. labruscus* is also an effective producer of such enzymes.

**Table 4:** Production extracellular enzymes: tannase and caseinase of *A. labruscus*, *A. homomorphus* and *A. saccharolyticus*.

Culture media	Growth diameter (mm)		
	<i>A. labruscus</i>	<i>A. homomorphus</i>	<i>A. saccharolyticus</i>
TAN	18-32	38	24-38
Sporulation	++	++	++
Tannase	+	+	±
Pro agar	80	80	57-67
Sporulation	+++	+++	++
Caseinase	+++	-	+++
CYA with raisins	80	80	80
Sporulation	+++	++	++
Sclerotia	+++ (yellow)	-	±

- None, ± Poor, + Some, ++ Good, +++ Very good

## Taxonomy

*Aspergillus labruscus* Fungaro, Sartori, Ferranti, Frisvad, Taniwaki, Iamanaka sp. nov. (Fig. 4)

MYCOBANK: MB815746

*Etymology:* “labrusca” is Latin for wild grape vine, on which this fungus species was found.

- **Holotype:** CCT 7800, a freeze dried culture in Coleção de Cultura Tropical (Campinas, Brazil), is designated as the holotype of *A. labruscus*. It was isolated from the surface of grape berries (*Vitis labrusca*) grown in Rio Grande do Sul State, Brazil, in February, 2013, by Fungaro MHP and Sartori, D. Cultures derived from this type include ITAL 22.223 (ITAL = culture collection of the Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, Brazil) and IBT 33586 (IBT = culture collection of the Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark).
- **Diagnosis:** This species differs from all species in *Aspergillus* section *Nigri*<sup>24</sup> by its yellow mycelium, poor sporulation on CYA at 25°C, abundant salmon to pink sclerotia and no growth at 37°C on CYA. A profile of secondary metabolites differing from that of the closely related species *A. homomorphus*

and *A. saccharolyticus* and a distinctive DNA sequence of  $\beta$ -tubulin and calmodulin genes and ITS regions.

- **Description:** Colony diameters after 7 days at 25°C were as follows: CYA: 73-84 mm, MEA: 58-78 mm, YES: 73-80 mm, OAT: 35-43 mm and CREA: 3-11 mm. There was no or very weak acid production on CREA. On CYA at 25°C the species produced yellow mycelium, few to many conidia, abundant salmon to pink sclerotia, and pale yellow reverse. Dry raisins stimulate the production of sclerotia. Isolates from the species does not grow on CYA at 37°C and 42°C. Micromorphological characters were as follows: uniseriate, spherical conidial heads, brown colored stipes with smooth thick walls (3.2-6.1  $\mu\text{m}$ ), vesicle 40 x 60  $\mu\text{m}$ , phialides 7.2-7.8 x 3.8  $\mu\text{m}$ , conidia not uniform in size and shape, spherical to ellipsoidal with 6.5-8 x 6.1-6.9  $\mu\text{m}$ , black and very rough.
- **ITS Barcode:** KU708544 (alternative markers: *BenA*= KT986014; *CaM* = KT986008).
- **Extrolites:** All isolates produced secalonic acid D and neoxaline.
- **Other isolates examined:** ITAL 21.217, ITAL 22.224, ITAL 22.225, ITAL 22.227, ITAL 22.228, ITAL 28.255, ITAL 28.256, ITAL 28.257, ITAL 28.264, ITAL 28.267, ITAL 28.270, ITAL 28.272, ITAL 28.273, ITAL 28.275, ITAL 28.283, ITAL 28.286, ITAL 28.289, ITAL 28.294, ITAL 31.311, ITAL 31.312, ITAL 31.316, ITAL 39.381 all from the surface of grape berries (*V. labrusca*) grown in the Rio Grande do Sul State, Brazil

## Methods

- **Grape samples and mycological analysis**

The 89 grape samples were collected from four Brazilian states: Pernambuco ( $n=22$ ), São Paulo ( $n=21$ ), Paraná ( $n=16$ ) and Rio Grande do Sul ( $n=30$ ). In 2014, twenty bunches were collected from each field, close to harvest time between late January and

early February in Paraná and Rio Grande do Sul, in April in Pernambuco, and in December in São Paulo. The *V. labrusca* grape cultivars studied were “Bordô”, “Cora”, “Concord”, “Isabel”, “Isabel Precoce”, “Violeta”, “Coder”, “Rudder”, “Niagara”. and “Muscadine”. These are the grape cultivars most widely used for juice production in Brazil. The samples were collected as described in Serra *et al.*<sup>25</sup>, across two diagonal transects. A total of 100 berries of each sample were plated according to Pitt and Hocking<sup>26</sup> but without surface disinfection. All *Aspergillus* section *Nigri* fungi were transferred to CYA (Czapek Yeast Extract agar, formulated) and incubated at 25°C for seven days.

- **Molecular analysis**

A total of 275 *Aspergillus* section *Nigri* isolates obtained from the grapes were randomly selected and subjected to DNA extraction using a commercial extraction kit, Biopur Mini Spin Planta (Biopur, Brazil), according to the manufacturer's instructions. As an initial step to identify the isolates, partial amplification and sequencing of the calmodulin (*CaM*) gene were performed as described in detail by Taniwaki *et al.*<sup>27</sup>. The *CaM* sequences obtained were aligned with type or neotype strain sequences from all *Aspergillus* section *Nigri* species obtained from the database maintained by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Alignment was performed using ClustalW<sup>28</sup>. MEGA6.0 software<sup>29</sup> was used to construct a Neighbor-Joining tree<sup>30</sup>. Of the twenty three isolates none were phylogenetically closely related to any of the species described so far, six were further investigated using the ITS1–5.8S–ITS2 region of nrDNA (ITS) and partial  $\beta$ -tubulin (*BenA*) gene sequences. Partial amplification and sequencing of the *BenA* gene and ITS region were performed as described in Taniwaki *et al.*<sup>27</sup>. The ITS and *BenA* sequences obtained were aligned with the type or neotype strain sequences from all *Aspergillus* section *Nigri* species using the above-mentioned approaches.

- **Extrolite analysis**

Six isolates of *A. labruscus* (Table 1), two isolates of *A. homomorphus* (IBT 21893 and IBT 21894) and two isolates of *A. saccharolyticus* (IBT 28231 and IBT 30881 = CBS 127449) were analysed for small molecule extrolites by extracting 3 agar plugs from 7 day incubated cultures at an incubation temperature of 25°C in darkness<sup>31</sup>. The

extracts were analyzed by ultra high performance liquid chromatography using diode array detection (UHPLC-DAD)<sup>32</sup> and compared to authentic small molecule extrolite standards<sup>33</sup>.

- **Morphological characterization**

Morphological characterization was performed based on Samson *et al.*<sup>11</sup>. Briefly, a spore suspension was prepared in 0.5% agar dissolved in water. Petri dishes were inoculated in a three-point pattern. The following culture media (formulated) and incubation temperature were used: Czapek yeast autolysate (CYA) agar at 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 33°C, 37°C, and 42°C; malt extract agar (MEA), oatmeal agar (OAT), creatine sucrose agar (CREA) and CYAS (Czapek yeast autolysate agar with 5% NaCl), at 25°C. For comparison, two isolates of *A. homomorphus* (IBT 21893 and IBT 21894) and two isolates of *A. saccharolyticus* (IBT 28231 and IBT 30881 = CBS 127449) were also grown on CYA at 37°C and CYAS at 25°C.

After seven days, macro and micromorphological characters of *A. labruscus* were examined under light optical microscopy and scanning electron microscopy. The slide for light optical microscopic observations was prepared using lactic acid and lactophenol cotton blue. For each structure 3 replicate measurements were performed. For scanning electron microscopy, a 0.5 x 0.5 cm plug was fixed for 24 h at 4°C in 2% glutaraldehyde in 0.1 M of NaPO<sub>4</sub> buffer. The plug was washed three times for 15 min (each) in 0.1 M phosphate buffer (NaPO<sub>4</sub>) and post-fixed in osmium tetroxide 1% buffer for 2 h at 25°C in the dark. The plug was then washed again three times in 0.1 M phosphate (NaPO<sub>4</sub>) buffer for 15 min and dehydrated in ethanol series (70, 80, 90 and 100%) for 10 min. It was then placed in a critical point dryer (Bal-Tec, CSDC 030) and subsequently sputter-coated with gold (Bal-Tec, SDC 050). The observation was performed using a FEI Quanta 200® microscope.

- **Enzyme production**

Six isolates of *A. labruscus* (Table 1), two isolates of *A. homomorphus* (IBT 21893 and IBT 21894) and two isolates of *A. saccharolyticus* (IBT 28231 and IBT 30881 = CBS 127449) were tested for production of two extracellular enzymes: (i) tannase, growing the isolates on tannin sucrose agar (TAN) as described by Thrane<sup>34</sup>

and (ii) caseinase growing on PRO agar (skimmed milk powder 15%, 100 ml; glucose, 5.0 g;  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 1.0 g; KCl, 0.5 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2 g;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.1 g; SM (trace metal solution), 1 ml; yeast extract, 3.0 g; agar, 20.0 g, water, 1 L). These isolates were one point inoculated on each medium and incubated at 25°C for 7 days and examined for production of enzyme haloes.

## References

1. Krikorian, R. *et al.* Concord grape juice supplementation and neurocognitive function in human aging. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 5736-5742 (2012).
2. Cardozo, M. G. *et al.* Effect of chronic treatment with conventional and organic purple grape juices (*Vitis labrusca*) on rats fed with high-fat diet. *Cell Mol. Neurobiol.* **33**, 1123-1133 (2013).
3. IBRAVIN 2015. *Uvas processadas pelas empresas do RS*. Available at: <http://www.ibravin.org.br/downloads/1426620667.pdf>. (Accessed on 20<sup>th</sup> January 2016).
4. Palumbo, J. D., O'Keeffe, T. L., Vasquez, S. J. & Mahoney, N. E. Isolation and identification of ochratoxin A-producing *Aspergillus* section *Nigri* strains from California raisins. *Lett. Appl. Microbiol.* **52**, 330-336 (2011).
5. Mikusová, P., Ritieni, A., Santini, A., Juhasová, G. & Srobárová, A. Contamination by moulds of grape berries in Slovakia. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **27**, 738-747 (2010).
6. Abrunhosa, L., Calado, T. & Venancio, A. Incidence of fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger* in Portuguese wine regions. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 7514-7518 (2011).
7. Storari, M., Bigler, L., Gessler, C. & Broggini, G. A. Assessment of the ochratoxin A production ability of *Aspergillus tubingensis*. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **29**, 1450-1454 (2012).

8. Perrone, G., De Girolamo, A., Sarigiannis, Y., Haidukowski, M. E. & Visconti, A. Occurrence of ochratoxin A, fumonisin B<sub>2</sub> and black aspergilli in raisins from Western Greece regions in relation to environmental and geographical factors. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **30**, 1339-1347 (2013).
9. Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castellá, G. & Cabañes, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2650-2652 (1994).
10. Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O. & Thrane, U. Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9727-9732 (2007).
11. Samson, R. A. *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* **78**, 141-173 (2014).
12. Schoch, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 6241-6246 (2012).
13. Schoch, C. L. *et al.* Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. *Database (Oxford)* **30**, 1-21 (2014).
14. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols a Guide to Methods Applications*: (eds Innis, M. A. *et al.*) 315-322 (Academic Press, London, 1990).
15. Peterson, S. W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* **100**, 205-226 (2008).
16. Petersen, L. M., Hoeck, C., Frisvad, J. C., Gottfredsen, C. H. & Larsen, T. O. Dereplication guided discovery of secondary metabolites of mixed biosynthetic origin from *Aspergillus aculeatus*. *Molecules* **19**, 10898-10921 (2014).

17. Steiman, R., Guiraud, P., Sage, L. & Sigle-Murandi, F. New strains from Israel in the *Aspergillus niger* group. *System. Appl. Microbiol.* **17**, 620-624 (1994).
18. Pildain, M. B. *et al.* Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 725-735 (2008).
19. Samson, R. A., Houbraken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., Frank, J. M. & Frisvad, J. C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol.* **50**, 45-61 (2004).
20. Meijer, M., Houbraken, J. A. M. P., Dalhuisen, S., Samson, R. A. & de Vries, R. P. Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli. *Stud. Mycol.* **69**, 19-30 (2011).
21. Somma, S., Perrone, G. & Logrieco, A. F. Diversity of black Aspergilli and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. *Phytopath. Medit.* **51**, 131-147, (2012).
22. Sørensen, A., Lübeck, P. S., Lübeck, M., Teller, P. J., & Ahring, B. K.  $\beta$ -glucosidases from a new *Aspergillus* species can substitute commercial  $\beta$ -glucosidases for saccharification of lignocellulosic biomass. *Can. J. Microbiol.* **57**, 638-650 (2011).
23. Sørensen, A. *et al.* *Aspergillus saccharolyticus* sp. nov., a black *Aspergillus* species isolated in Denmark. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 3077-3083 (2011).
24. Varga, J. *et al.* New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol.* **69**, 1-17 (2011).
25. Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z. & Venancio, A. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 63-68 (2003).

26. Pitt, J. I. & Hocking, in A. D. *Fungi and Food Spoilage*. 19-52 (Springer-Verlag, Springer US, (2009).
27. Taniwaki, M. H. *et al.* *Aspergillusbertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. *PLoS One* **7**, e42480 (2012).
28. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680 (1994).
29. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. Mega6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725-2729 (2013)
30. Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425 (1987).
31. Smedsgaard, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures, *J. Chromatogr. A* **760**, 264-270 (1997).
32. Klitgaard, A. *et al.* Aggressive dereplication using UHPLC-DAD-QTOF – screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 1933-1943 (2014).
33. Houbraken, J., Spierenburg, H. & Frisvad, J. C. *Rasamsonia*, a new genus for thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. *Antonie van Leeuwenhoek* **101**, 403-421 (2012).
34. Thrane, U. The ability of common *Fusarium* species to grow on tannin-sucrose agar. *Lett. Appl. Microbiol.* **2**, 33-35, (1986).

**Acknowledgments**

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq471813/2013-3), Fundação Araucária and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP2013/05414-8).

**Author Contributions**

Experiments conceived and designed by MHPF and BTI and performed by MHPF, LSF, FPM, JJS, DS, BTI, JCF. Data analyzed by MHPF, MHT, BTI, and JCF. Paper written by MHPF. All authors read and corrected the final draft manuscript.

**Competing financial interests**

The authors declare that they have no competing financial interests.

## CONCLUSÕES FINAIS

1. *Aspergillus* section *Nigri* estão presentes na superfície de uvas de diferentes cultivares de *V. labrusca* e híbridos (*V. labrusca* x *V. vinifera*) cultivados nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Pernambuco.
2. As uvas cultivadas no Vale do Submédio São Francisco, Pernambuco, onde o clima é semiárido e quente, são mais suscetíveis à contaminação com *Aspergillus* section *Nigri*.
3. Dentre os isolados de *Aspergillus* section *Nigri*, os uniseriados, que não são toxigênicos, são os mais frequentemente em todas as regiões.
4. Dentre as espécies pertencentes a *Aspergillus* section *Nigri*, *A. japonicus*, *A. uvarum*, *A. brunneoviolaceus*, *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. vadensis*, *A. carbonarius* e *A. labruscus* podem ser encontradas na superfície dos frutos de cultivares de *V. labrusca* e híbridos cultivados no Brasil.
5. Há baixa incidência de *A. carbonarius*, considerado o principal responsável pela contaminação de OTA em uvas européias, na superfície das uvas de cultivares de *V. labrusca* ou híbridos (*V. labrusca* x *V. vinifera*) cultivados no Brasil.
6. A ocorrência de espécies toxigênicas na superfície das uvas alerta para a necessidade de boas práticas de colheita e pós-colheita, para evitar que os frutos sejam danificados e infectados, podendo resultar na contaminação por micotoxinas.
7. Uma nova espécie de *Aspergillus* pertence à *A.* section *Nigri*, não produtora de ocratoxina A e fumonisina B<sub>2</sub>, porém produtora da micotoxina “ácido secalonico D”, foi isolada apenas nos vinhedos da Serra Gaucha, Rio Grande do Sul, onde o clima é temperado. Sugere-se que a presença de ácido secalonico D seja investigada nas uvas *V. labrusca* produzidas na Serra Gaucha, Rio Grande do Sul.

**REFERÊNCIAS\***

- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABANES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60 p. 2650–2652, 1994.
- ABARCA, M. L. et al. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 1, p. 33–49, 2004.
- ABRUNHOSA, L.; CALADO, T.; VENÂNCIO, A. Incidence of fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger* in portuguese wine regions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 7514–7518, 2011.
- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, p. 117–139, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC Nº7 de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**. n. 37, seção 1, 22 de fevereiro de 2011.
- AHANGARKANI, F.; ROUHI, S.; AZIZI, I. G. A review on incidence and toxicity of fumonisins. **Toxin Reviews**, v. 33, n. 3, p. 95–100, 2014.
- ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 367–370, 2013.
- BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. S2–S4, 2006.
- BAU, M. et al. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 125–130, 2005.

\*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEJAOUI, H. et al. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. S46–S52, 2006.

BELLÍ, N. et al. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 6, p. 541–546, 2004.

BELLÍ, N. et al. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. S40–S45, 2006.

BERCHTOLD, M. W.; VILLALOBO, A. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, n. 2, p. 398–435, 2014.

BRADAMENTE, S.; BARENGHI, L.; VILLA, A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 22, n. 3, p. 169–188, 2004.

BRASIL. Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/1980-1988/L7678.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1980-1988/L7678.htm)> Acesso em: 16 Nov. 2016.

BRASIL. Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2000, Seção 1, p. 54-58.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 55, de 27 de julho de 2004. Normas referentes à complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e dos derivados da uva e do vinho. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 16 Nov. 2016.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011.

BUTCHKO, R. A. E.; PLATTNER, R. D.; PROCTOR, R. H. Deletion analysis of *FUM* genes involved in tricarballic ester formation during fumonisin biosynthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 25, p. 9398–9404, 2006.

CABAÑES, F. J. et al. What is the source of ochratoxin A in wine?. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 213–215, 2002.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. Especial, p. 144–149, 2011.

CHIOTTA, M. L. et al. Phylogenetic characterization and ochratoxin A – Fumonisin profile of black *Aspergillus* isolated from grapes in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 171–176, 2011.

CHIOTTA, M. L. et al. Biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentinian vineyards and ochratoxin A contamination. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 182–190, 2013.

CHULZE, S. N.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. S5–S9, 2006.

COPETTI, M. V. et al. Mycobiota of cocoa: From farm to chocolate. **Food Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1499–1504, 2011.

COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 649–657, 2006.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, p. 19–28, 2002.

DESJARDINS, A. E. ***Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology.** Minnesota: APS Press, 2006. 260 p.

FERRACIN, L. M. et al. Genetic Relationships among Strains of the *Aspergillus niger* Aggregate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 241–248, 2009.

FERRANTI, L. S. et al. Occurrence and fumonisin B<sub>2</sub> producing potential of *Aspergillus* section *Nigri* in Brazil nuts. **Mycotoxin Research**, v. 33, p. 49- 58, 2017.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins: their implications for human and animal health. **The Veterinary quarterly**, v. 21, n. 4, p. 115–120, 1999.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Crops**. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: Jul. 2016.

FRISVAD, J. J. et al. Fumonisin B<sub>2</sub> Production by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 9727–9732, 2007.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, v. 112, n. 2, p. 231–240, 2008.

FRISVAD, J. C. et al. Fumonisin and Ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. 1-5, 2011.

GARCIA-CELA, E. et al. Fungal diversity, incidence and mycotoxin contamination in grapes from two agro-climatic Spanish regions with emphasis on *Aspergillus* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 8, p. 1716–1729, 2015.

GELDERBLOM, W. C. A. et al. Fumonisin-like novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1806–1811, 1988.

GHERBAWY, Y. et al. Molecular characterization of black *Aspergillus* species from onion and their potential for ochratoxin a and fumonisin B<sub>2</sub> production. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2015.

GUTLEB, A. C.; MORRISON, E.; MURK, A. J. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 11, p. 309–20, 2002.

HAMMOND, J. W.; CAI, D.; VERHEY, K. J. Tubulin modifications and their cellular functions. **Current Opinion in Cell Biology**, 2008.

HANSEN, C. C. **The characterization of fumonisin B<sub>6</sub> biosynthesis in *Aspergillus niger***. 2010. 79 p. Masters thesis - Center for Microbial Biotechnology Department of Systems of Biology Technical University of Denmark, Denmark, 2010.

HARDIE, W. J.; BRIEN, T. P. O.; JAUDZEMS, V. G. Morphology , anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape, *Vitis vinifera* L. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 2, p. 97–142, 1996.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101–34, 2001.

IAMANAKA, B. T. et al. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 12, p. 1258–1263, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO (IBRAVIN). Elaboração de Vinhos e Derivados no Rio Grande do Sul - 2006 a 2016. 2016. <<http://www.ibravin.org.br/admin/arquivos/estatisticas/1473079626.pdf>> Acesso em: Nov. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO (IBRAVIN). Uvas processadas pelas empresas do RS. 2017. Disponível: <<http://www.ibravin.org.br/admin/arquivos/estatisticas/1473079559.pdf>>. Acesso em: Jan. 2017.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: \_\_\_\_\_. **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans**. Lyon, France, 1993. v. 56, p. 571.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene a styrene. In: \_\_\_\_\_. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon, France, 2002. v. 82, p. 171-300.

JACKSON, D. I.; LOMBARD, P. B. Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality- A Review. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 44, n. 4, p. 409–430, 1993.

JACKSON, R. S. **Wine science: principles and applications**. 3rd ed. California: Elsevier Academic Press, 2008.

JEANDET, P. et al. Effect of Enological Practices on the Resveratrol Isomer Content of Wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 316–319, 1995.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA). **Evaluation of 56 certain Mycotoxins in food**. Geneva: World Health Organization. 2002. (WHO Technical Report Series, 906).

KHOURY, A. E. et al. Fungal contamination and Aflatoxin B<sub>1</sub> and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 6, p. 2244–2250, 2008.

KIZIS, D. et al. Biodiversity and ITS-RFLP characterisation of *Aspergillus* section *Nigri* isolates in grapes from four traditional grape-producing areas in Greece. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1-15, 2014.

KNUDSEN, P. B. et al. Occurrence of fumonisins B<sub>2</sub> and B<sub>4</sub> in retail raisins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 772–776, 2011.

KÖNIG, H.; UNDEN, G.; FRÖHLICH, J. **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine**. Heidelberg: Springer, 2009.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P.M. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A: an update. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 53–57, 1996.

LASRAM, S. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 75–80, 2012.

LEONG, S. L. et al. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 301–306, 2007.

LOGRIECO, A. et al. Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 11, p. 1495–1500, 2009.

MAGNOLI, C. et al. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 179–184, 2003.

MAGNOLI, C. E. et al. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, v. 163, n. 5, p. 249–260, 2007.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 659–664, 2005.

MANTLE, P. G. Risk assessment and the importance of ochratoxins. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 50, p. 143–146, 2002.

MARASAS, W. F. O. Discovery and Occurrence of the Fumonisin : A Historical Perspective. **Environmental Health Perspectives**, v. 109 Suppl 2, p. 239–243, 2001.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218–237, 2013.

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V.; RAMÓN, D. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 147–153, 2007.

MASSI, F. P.; SARTORI, D.; FERRANTI, L. S.; IAMANAKA, B. T., TANIWAKI, M. H.; VIEIRA, M. L. C.; FUNGARO, M. H. P. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p. 19–28, 2016.

MEDINA, A. et al. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4696–4702, 2005.

MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2013. 5 p. (EMBRAPA-Uva e vinho. Comunicado Técnico 137).

MELLO, L. M. R. Artigo: Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015. EMBRAPA Uva e Vinho, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-da-vitivinicultura-brasileira-em-2015>>. Acesso em: Nov. 2016.

MIKUŠOVÁ, P.; SÚLYOK, M.; SANTINI, A.; ŠROBÁROVÁ, A. *Aspergillus* spp. and their secondary metabolite production in grape berries from Slovakia. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, n. 2, p. 311–317, 2014.

MOGENSEN, J. M. et al. Production of fumonisin B<sub>2</sub> and B<sub>4</sub> by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 954–958, 2010.

NIELSEN, K. F. et al. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 1225–1242, 2009.

NIELSEN, K. F. et al. UHPLC-MS/MS determination of ochratoxin a and fumonisins in coffee using QuEChERS extraction combined with mixed-mode SPE purification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 1029-1034, 2015

NOONIM, P. et al. Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 1, p. 94–100, 2009.

OKUDA, T. Variation in colony characteristics of *Penicillium* strains resulting from minor variations in culture conditions. **Mycological Society of America Variation**, v. 86, n. 2, p. 259–262, 1994.

OKUDA, T.; KLICH, M. A.; SEIFERT, K. A.; ANDO, K. Media and incubation effects on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. 83–99, In: SAMSON, R.A.; PITT, J. I. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Amsterdam, Harwood academic publishers, 2000. p. 83–99.

PEL, H. J. et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 221–231, 2007.

PERAICA, M. et al. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 9, p. 754–766, 1999.

PETZINGER, E.; ZIEGLER, K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 2, p. 91-98, 2000.

PHARM, R. P. B. et al. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. **Expert Opinion on Drugs Delivery**, v. 11, n. 8, p. 1285–1298, 2014.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2nd Ed. London: Blackie Academic & Professional. 1997, 593p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3rd ed. New York: Springer. 2009, 471 p.

PONSONE, M. L. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 131–135, 2007.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. Vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010 SEBRAE: Brasília, DF; IBRAVIN: Bento Gonçalves; Embrapa Uva e Vinho, 2011. 110 p. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/livro/vitivinicultura.pdf>> Acesso em: Nov. 2016.

QI, T. F. et al. Diversity of mycotoxin-producing black *Aspergilli* in Canadian vineyards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 1583-1589, 2016.

RASTOGI, G; SANI, R. K. Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. (Ed.). **Microbes and microbial technology**. New York: Springer, 2011. p. 29-57.

RILEY, R. T. et al. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 301–308, 2001. Suppl. 2.

RIZZON, LUIZ ANTENOR E DALL'AGNOL, I. **Vinho Tinto**. Brasília, DF: Embrapa. Informação Tecnológica, 2007. 45 p. Disponível em:

<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/58590/1/RIZZON-VinhoTinto-2007.pdf>> Acesso em: Nov. 2016.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Suco de Uva**. Brasília, DF: Embrapa. Informação Tecnológica, 2007. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/11888/2/00081370.pdf>> Acesso em: Nov. 2016.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Analytical characteristics and discrimination of Brazilian commercial grape juice, nectar, and beverage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 93–97, 2012.

ROBINSON, J.; HARDING, J.; VOUILLAMOZ, J.. **Wine Grapes: A complete guide to 1,368 vine varieties, including their origins and flavours**. UK: Penguin, 2013.

ROMERO-PÉREZ, A. I. et al. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1533–1536, 1999.

ROSA, C. A. R. et al. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.19, p. 408-414, 2002.

ROSA, C. A. R. et al. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 4, p. 358–364, 2004.

SAGE, L.; GARON, D.; SEIGLE-MURANDI, F. Fungal microflora and ochratoxin a risk in French vineyards. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 18, p. 5764–5768, 2004.

SAMSON, R. A. et al. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 45–61, 2004.

SAMSON, R. A. et al. Diagnostic tools to identify black aspergilli. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 129–145, 2007.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U.; ANDERSEN, B. **Food and Indoor fungi**. Uthrech, NL: CBS Fungal Biodiversity Center, 2010. 390 p. (CBS Laboratory Manual Series, 2).

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141–173, 2014.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **PNAS**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.

SERRA, R.; BRAGA, A.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 515–521, 2005.

SHIMIZU, K. et al. The  $\alpha$ -oxoamine synthase gene *fum8* is involved in fumonisin B<sub>2</sub> biosynthesis in *Aspergillus niger*. **Mycoscience**, v. 56, n. 3, p. 301–308, 2015.

SOMMA, S.; PERRONE, G.; LOGRIECO, A. F. Diversity of black Aspergilli and mycotoxin risks in grape , wine and dried vine fruits. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 51, n. 1, p. 131–147, 2012.

SOTO, J. B. et al. Presence of ochratoxin a (OTA) mycotoxin in alcoholic drinks from southern european countries: Wine and beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 7643–7651, 2014.

SPADARO, D. et al. Ochratoxigenic black species of Aspergilli in grape fruits of northern Italy identified by an improved PCR-RFLP procedure. **Toxins**, v. 4, p. 42–54, 2012.

STOCKMANN-JUVALA, H.; SAVOLAINEN, K. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B<sub>1</sub>. **Human and Experimental Toxicology**, v. 27, , p. 799–809, 2008.

SUÁREZ-QUIROZ, M. et al. Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 501–507, 2004.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 173–179, 2003.

TANIWAKI, M. H. et al. Biodiversity of mycobiota throughout the Brazil nut supply chain: From rainforest to consumer. **Food Microbiology**, v. 61, p. 14–22, 2017.

TERRA, M. F. et al. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 890–894, 2012.

TJAMOS, S. E.; ANTONIOU, P. P.; TJAMOS, E. C. *Aspergillus* spp., distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, 2006.

UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA (UVIBRA). **Produção de Uvas - Safras 2005 a 2015. 2016.** Disponível em: <[http://www.uvibra.com.br/dados\\_estatisticos.htm](http://www.uvibra.com.br/dados_estatisticos.htm)>. Acesso em: Out. 2016.

VAN DER MERWE, K. J. et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, n. 4976, p. 1112–1113, 1965.

VARGA, J. et al. Fumonisin contamination and fumonisin producing black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 143–149, 2010.

VARGA, J. et al., New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 1–17. 2011.

VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 2, p. 72–81, 2006.

VISAGIE, C. M. et al. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 1–61, 2014.

VISCONTI, A. et al. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. **Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 25, p. 193–202, 2008.