FERNANDA PELISSON MASSI

MARCADORES MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE ESPÉCIES DE *Aspergillus* PRODUTORAS DE AFLATOXINAS, OCRATOXINAS E FUMONISINAS

Londrina
2018

FERNANDA PELISSON MASSI

MARCADORES MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE ESPÉCIES DE *Aspergillus* PRODUTORAS DE AFLATOXINAS, OCRATOXINAS E FUMONISINAS

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

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro.

Londrina
2018

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

Massi, Fernanda Pelisson .

Marcadores moleculares para detecção de espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxinas, ocratoxinas e fumonisinas / Fernanda Pelisson Massi. - Londrina, 2018.
160 f. : il.

Orientador: Maria Helena Pelegrinelli Fungaro.
Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Aspergillus section Flavi - Tese. 2. Aspergillus section Nigri - Tese. 3. Micotoxinas - Tese. 4. Identificação molecular - Tese. I. Fungaro, Maria Helena Pelegrinelli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

FERNANDA PELISSON MASSI

MARCADORES MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE ESPÉCIES DE *Aspergillus* PRODUTORAS DE AFLATOXINAS, OCRATOXINAS E FUMONISINAS

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

BANCA EXAMINADORA

_____
Orientadora: Dr[a]. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

_____
Dr[a]. Marta Hiromi Taniwaki
Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL

_____
Dr[a]. Luciana Furlaneto Maia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

_____
Dr[a]. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

_____
Dr[a]. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2018.

Aos meus pais, Massi e Ivani, pelo incentivo, apoio incondicional,
doação e renuncias de seus sonhos,
para que os meus se tornem realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me dado o presente da vida, saúde, sabedoria e disposição para cumprir mais uma importante fase da minha vida e por iluminar e guiar todos os meus passos.

Aos meus amados pais, Aparecido Firmino Massi e Ivani Pelisson Massi, por estarem sempre ao meu lado, me ensinando, aconselhando, auxiliando a ultrapassar obstáculos e por compartilharem comigo alegremente desta conquista.

Ao meu irmão Rodrigo Pelisson Massi, com quem compartilho momentos de alegria, dificuldade e superação, por estar torcendo por mais esta conquista.

Aos meus tios, Versi Pelisson e Maria Massi, pelo carinho, orações e por estarem sempre torcendo pelas minhas realizações.

À Profª. Drª. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, pela orientação, confiança, oportunidade, exemplo, ensinamentos e incentivo de crescer científica, ética, profissional e pessoalmente, pois somente com seu apoio ao longo de todos estes anos foi possível a realização deste e outros trabalhos.

À Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade e por proporcionar um ambiente agradável de trabalho, bem como ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular desta instituição, juntamente com a Coordenação e professores pela oportunidade e ensinamentos transmitidos que muito contribuiu para o meu desenvolvimento profissional e intelectual.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro indispensável.

À Profª. Drª. Daniele Sartori, pelos ensinamentos compartilhados desde o primeiro dia em que passei a integrar este grupo de pesquisa, pelas oportunidades de crescer profissionalmente e pela amizade.

À Drª. Marta Hiromi Taniwaki e a Drª. Beatriz Thie Iamanaka juntamente com o Instituto de Tecnologia de Alimentos, pelas oportunidades, colaborações e contribuições científicas prestadas para a realização deste trabalho.

Aos Doutores Paulo Maurício Ruas, Fernando Gomes Barcelos, Marta Hiromi Taniwaki, Luciana Furlaneto Maia, Daniele Sartori, Elisa Yoko Hirooka, Claudete de Fátima Ruas, Rogério Fernandes de Souza, Lara Munique Ferracin e Fernanda Simões de Almeida pela participação na

Banca Examinadora (Qualificação e Defesa), pelos comentários, contribuições e sugestões.

À Larissa de Souza Ferranti, pelo auxílio na execução de parte das análises apresentadas neste trabalho, pela amizade e pelos bons momentos compartilhados. Bem como à Karla Murata Vieira, pelo grande auxílio prestado durante o plaqueamento das amostras de cebolas analisadas neste trabalho.

Aos demais colegas, Josué, Rafael, Rafaella e Luryan, que no decorrer destes anos passaram pelo laboratório, pela ajuda prestada, pelo convívio e amizade.

Aos colegas da Universidade Estadual de Londrina e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

Muito obrigada a todos!!!

“Vou enviar um anjo adiante de ti para te proteger no caminho e para te conduzir ao lugar que te preparei.”

(Êxodo 23, 20)

MASSI, Fernanda Pelisson. **Marcadores moleculares para detecção de espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxinas, ocratoxinas e fumonisinas.** 2018. 160 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2018.

RESUMO

Produtos destinados ao consumo humano e animal podem apresentar-se contaminados com micotoxinas, destacam-se as aflatoxinas, ocratoxinas e fumonisinas produzidas por espécies de fungos do gênero *Aspergillus*. Atualmente, detectar e identificar espécies micotoxigênicas é crucial para garantir a qualidade do alimento. Neste âmbito, as informações presentes nas sequências de nucleotídeos de alguns *loci* do genoma fúngico, têm contribuído para o desenvolvimento de marcadores moleculares utilizados para a identificação de espécies toxigênicas, eliminando a necessidade de cultivo. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e utilizar marcadores moleculares para detectar espécies de *Aspergillus* produtoras de micotoxinas. Os resultados obtidos são apresentados na forma de três artigos científicos. O primeiro artigo apresenta o desenvolvimento de um marcador molecular para detecção da espécie aflatoxigênica *Aspergillus nomius*. Esta espécie pertence à *Aspergillus section Flavi* e tem sido descrita como uma das principais responsáveis pela contaminação de castanha do Brasil com aflatoxinas. O par de *primer* espécie-específico foi desenvolvido para detectar a presença de *A. nomius* em visitantes florais da castanheira (*Bertholletia excelsa*), trazendo à luz uma possível via de contaminação da castanha. *A. nomius* foi detectado em *Xylocopa frontalis*, *Bombus transversalis*, *Centris denudans*, *Centris ferruginea* e *Epicharis flava.* No segundo trabalho foi desenvolvido um sistema de PCR multiplex para analisar uma grande coleção de isolados de *Aspergillus niger* e *Aspergillus welwitschiae* quanto à presença ou ausência de genes essenciais para a biossíntese da ocratoxina e fumonisina. Ambas espécies pertencem à *Aspergillus section Nigri* e são frequentemente encontradas em alimentos. Isolados destas espécies podem produzir ocratoxina A (OTA) e/ou fumonisina B_2 (FB_2). Um total de 175 linhagens foram obtidas de frutas secas, castanha do Brasil, grãos de café, frutos de uva, cacau e cebola e investigadas. Entre os isolados de *A. niger*, aproximadamente 32% foram produtores de OTA; em contraste, apenas 1% dos isolados de *A. welwitschiae* foram capazes de produzir OTA. Em relação a produção de FB_2, houve maior frequência dos isolados de *A. niger* (74%) serem capazes de produzir FB_2 quando comparados com *A. welwitschiae* (34%). O uso da PCR multiplex revelou que a frequência dos isolados contendo os genes essenciais de biossíntese de micotoxinas também é marcadamente diferente entre *A. niger* e *A. welwitschiae*. Todos os isolados de *A. niger* e *A. welwitschiae* produtores de OTA portavam os genes *radH* e *pks* no genoma e 95,2% dos isolados não-produtores de OTA não continham esses genes. Isto sugere que a incapacidade de produção de OTA está associada à deleção de genes do *cluster* de biossíntese da OTA. Sobre o gene relacionado à produção de fumonisinas, α-oxoamina sintase (*fum8*), observou-se que 100% dos isolados de *A. niger* e 36% dos isolados de *A. welwitschiae* o possuem no genoma. A incapacidade de produção de FB_2 em *A. welwitschiae* está associada a deleções de genes do *cluster* de biossíntese de fumonisina. Porém, esta associação não ocorre para a espécie *A. niger*. No terceiro trabalho foi

investigada a incidência de *Aspergillus section Nigri* em cebolas adquiridas mensalmente em supermercados, em um período de dois anos. Foi analisado por meio da PCR multiplex isolados das espécies *A. niger/A. welwitschiae* a fim de separar linhagens destas espécies das outras linhagens de *black aspergilli* não produtoras de micotoxinas, além de detectar genes envolvidos com a biossíntese de OTA e FB_2. *Aspergillus section Nigri* foi detectado em 98% das amostras, e 97,4% dos isolados foram pertencentes às espécies toxigênicas *A. niger* ou *A. welwitschiae*. Outras espécies encontradas em menor frequência foram *A. brasiliensis*, *A. japonicus*, *A. tubingensis*, *A. luchuensis*, *A. neoniger* e *A. heteromorphus*. Aproximadamente 36% dos isolados identificados como *A. niger* ou *A. welwitschiae* foram portadores do gene *fum8*, envolvido na biossíntese de FB_2. Aproximadamente 3% dos isolados foram portadores dos genes *radH* e *pks*, ambos envolvidos na biossíntese de OTA. *A. welwitschiae* é a principal espécie encontrada em cebolas na pós-colheita contemplando linhagens portadoras de genes essenciais para a biossíntese de micotoxinas. Conclui-se que marcadores moleculares podem ser eficientemente utilizados para identificação e/ou detecção de espécies de *Aspergillus*, bem como para a avaliação da capacidade de risco de linhagens tóxicas pertencentes ao gênero *Aspergillus*.

Palavras-chave: *Aspergillus section Flavi. Aspergillus section Nigri.* Micotoxinas.

MASSI, Fernanda Pelisson. **Molecular markers to detect *Aspergillus* species producing aflatoxins, ochratoxins, and fumonisin.** 2018. 160 p. Thesis (Doctoral Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, 2018.

ABSTRACT

Products developed for human and animal consumption may be contaminated with mycotoxins such as aflatoxins, ochratoxins, and fumonisins produced by fungal species from the genus *Aspergillus*. Currently, detect and identify mycotoxigenic species is crucial for ensuring food safety. In this context, the nucleotide sequence information obtained from fungal genomes has contributed to the development of molecular markers used to identify toxigenic species, eliminating the need for culturing. The aim of our study was to further the development and use of molecular markers for the detection of mycotoxin-producing *Aspergillus* species. We present results in the form of three scientific articles. The first article describes the development of molecular markers to detect aflatoxin-producing *Aspergillus nomius* species. This species belongs to *Aspergillus* section *Flavi* and has been described as a main contributor to aflatoxin contamination of Brazil nuts. A species-specific primer pair was designed to detect the presence of *A. nomius* in floral visitors of *Bertholletia excelsa*, identifying a possible new route for the contamination of Brazil nuts. *A. nomius* was detected in *Xylocopa frontalis*, *Bombus transversalis*, *Centris denudans*, *Centris ferruginea* and *Epicharis flava.* A second study a multiplex PCR was developed for analyze a diverse collection of samples of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae* for the presence or absence of essential genes for ochratoxins and fumonisin biosynthesis. Both species belong to *Aspergillus* section *Nigri* and are frequently found in food. Isolates from this species can synthesize ochratoxin A (OTA) and/or fumonisin B_2 (FB_2). A total of 175 strains were obtained from dried fruits, Brazil nuts, coffee beans, grapes, cocoa, and onions and investigated. Among *A. niger* isolates, approximately 32% were OTA producers; in contrast, only 1% of the *A. welwitschiae* isolates were able to produce OTA. Regarding FB_2 production, there was a higher frequency of *A. niger* isolates (74%) able to produce FB_2 when compared to *A. welwitschiae* (34%). Multiplex PCR analysis revealed that frequency of isolates harboring essential genes for mycotoxin biosynthesis was markedly different between *A. niger* and *A. welwitschiae*. All OTA-producing isolates of *A. niger* and *A. welwitschiae* contained *radH* and *pks* genes in their genomes. The *radH* and *pks* genes are missing in 95.2% of the non-OTA-producing isolates. This suggests that the inability to produce OTA is associated with deletion of genes from the OTA biosynthesis cluster. The gene related to fumonisin producing, α-oxoamine synthase (*fum8*), was observed in 100% of the *A. niger* isolate genomes and 36% of the *A. welwitschiae* isolates. The inability of *A. welwitschiae* to produce FB_2 is associated with the deletion of genes from the fumonisin biosynthesis cluster. However, this association did not occur for *A. niger* species. The third study investigated the incidence of *Aspergillus* section *Nigri* in onion bulbs sampled monthly from a supermarket during a two-years period. Multiplex PCR analysis was used to detect isolates from *A. niger* and *A. welwitschiae* species to separate strains for the purpose of differentiating these species from other non-mycotoxin-producing black aspergilli strains, while simultaneously detecting the

genes involved in OTA and FB_2 biosynthesis. *Aspergillus* section *Nigri* was detected in 98% of the samples, with approximately 97% belonging to *A. niger* or *A. welwitschiae* toxigenic species. Other species found in lower frequency were *A. brasiliensis*, *A. japonicus*, *A. tubingensis*, *A. luchuensis*, *A. neoniger* and *A. heteromorphus*. Approximately 36% of *A. niger* or *A. welwitschiae* isolates contained the FB_2 biosynthesis gene, *fum8*. Approximately 3% of isolates contained the OTA biosynthesis genes, *radH* and *pks*. *A. welwitschiae* was the preminent species found in post-harvest onion bulbs expressing essential genes for mycotoxins biosynthesis. In conclusion, molecular markers can be used to efficiently detect and identify *Aspergillus* species, as well as identify the risk because of the presence of toxic strains belonging to the genus *Aspergillus*.

Keywords: *Aspergillus section Flavi*. *Aspergillus section Nigri*. Mycotoxins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

Figura 1 – Análise filogenética multilocus reconstruída utilizando o método Maximum Likelihood (ML) e sequências de nucleotídeos de uma parte dos genes que codificam para β-tubulina e calmodulina disponíveis no NCBI para evidenciar as relações entre as espécies atualmente aceitas para *Aspergillus section Flavi.* As diferentes cores sinalizam os 8 diferentes clados da seção. Foram considerados valores de *bootstrap* ≥70%. *Aspergillus niger* foi utilizado como *outgroup*. Espécies produtoras de aflatoxinas B_1 (AFB_1), B_2 (AFB_2), G_1 (AFG_1) e G_2 (AFG_2) e ocratoxina A (OTA) estão indicadas.....30

Figura 2 – Análise filogenética multilocus reconstruída utilizando o método Maximum Likelihood (ML) e sequências de nucleotídeos de uma parte dos genes que codificam para β-tubulina e calmodulina disponíveis no NCBI para evidenciar as relações entre as espécies atualmente aceitas para *Aspergillus section Nigri*. As diferentes cores sinalizam os 6 diferentes clados da seção. Foram considerados valores de *bootstrap* ≥70%. *Aspergillus flavus* foi utilizado como *outgroup*. Espécies produtoras de ocratoxina A (OTA) e/ou fumonisina FB_2 (FB_2) estão indicadas 32

Figura 3 – Análise filogenética multilocus reconstruída utilizando o método Maximum Likelihood (ML) e sequências de nucleotídeos de uma parte dos genes que codificam para β-tubulina e calmodulina disponíveis no NCBI para evidenciar as relações entre as espécies atualmente aceitas para *Aspergillus section Circumdati.* As diferentes cores sinalizam os 6 diferentes clados da seção. Foram considerados valores de *bootstrap* ≥70% *Aspergillus niger* foi utilizado como *outgroup*. Espécies produtoras de ocratoxina A (OTA) estão indicadas.....35

Figura 4 – Estrutura química das quatro principais aflatoxinas (AFB_1, AFB_2, AFG_1 e AFG_2).....39

Figura 5 – Representação esquemática do *cluster* gênico completo da biossíntese das aflatoxinas em espécies de *Aspergillus section Flavi*. As setas indicam a direção da transcrição dos genes. Ambas as nomenclaturas, original (linha superior) e nova (linha inferior) são apresentadas. O *Sugar Cluster* está ligado ao *cluster* da aflatoxina e é formado por quatro genes. O *Cyclopiazonic Acid Cluster* tem aproximadamente 50 Kb e está localizado adjacente ao *cluster* da aflatoxina 40

Figura 6 – Estrutura química da ocratoxina A 42

Figura 7 – Representação esquemática do *cluster* gênico completo da biossíntese da ocratoxina A em linhagens da espécie *Aspergillus niger* (CBS 513.88 e ATCC 1015) produtora e não produtora de ocratoxina A, respectivamente. As setas indicam a direção da transcrição dos genes 43

Figura 8 – Estrutura química das fumonisinas e posições de substituição da hidroxila 45

Figura 9 – (A) Representação esquemática do *cluster* gênico completo da biossíntese de fumonisinas em linhagens da espécie *Aspergillus niger* (ATCC 1015 e ITEM 10355) produtora e não produtora de fumonisina B_2, respectivamente e *Aspergillus welwitschiae* (ITEM11945) produtora de fumonisina B_2. (B) Representação esquemática do *cluster* gênico completo da biossíntese de fumonisinas em linhagens da espécie *Aspergillus welwitschiae* (ITEM 7468) não produtora de fumonisina B_2. As setas indicam a direção da transcrição dos genes 48

Figura 10 – Alinhamento parcial do gene da calmodulina (fragmento de 496 pb) sinalizando 8 SNPs para diferenciação das espécies tipos *Aspergillus niger* (CBS 554.65) e *Aspergillus welwitschiae* (CBS 139.54) produtoras de OTA e/ou FB_2 63

Figura 11 – Alinhamento parcial do gene da β-tubulina (fragmento de 418 pb) sinalizando 2 SNPs para diferenciação das espécies tipos *Aspergillus niger* (CBS 554.65) e *Aspergillus welwitschiae* (CBS 139.54) produtoras de OTA e/ou FB_2 64

Figura 12 – Alinhamento parcial do gene fator de elongação 1-alfa (fragmento de 667 pb) sinalizando 2 SNPs para diferenciação das espécies tipos *Aspergillus niger* (ITEM4501) e *Aspergillus welwitschiae* (ITEM4509) produtoras de OTA e/ou FB_2 65

Figura 13 – Alinhamento parcial do gene RNA polimerase II (fragmento de 1.000 pb) sinalizando 13 SNPs para diferenciação das espécies tipos *Aspergillus niger* (CBS 554.65) e *Aspergillus welwitschiae* (CBS 139.54) produtoras de OTA e/ou FB_2 66

Artigo Científico I

Figure 1 – Primer pair designed specifically for amplifying *A. nomius* strains.....89

Figure 2 – Results of PCR using the BtubNomF/BtubNomR primer pair to amplify *A. nomius* (A), *A. pseudonomius* (B), and *A. bombycis* (C) strains. NC indicates negative control. Only *A. nomius* strains showed the 185 bp specific amplicon 90

Artigo Científico II

Figure 1 – Alignment of partial β-tubulin gene sequences of all black aspergilli species. The sequences were obtained from the GenBank databases. Priming sites of the primers benA-An/Aw-F and benA-An/Aw-R are boxed. ^{T} means type strain.....117

Figure 2 – Specificity of the benA-An/Aw primers for detecting of *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae*. Note that a strong positive signal of 192 bp in length was detected when *A. niger* (lanes 1 to 10) and *A. welwitschiae* (lanes 11 to 20) DNAs were examined. No specific amplification occurred in any of the following non-target species: *Aspergillus uvarum*, *A. aculeatus*, *A. japonicus*, *A. neoniger*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius*, *A. luchuensis*, *A. fijiensis* and *A. brasiliensis* (lanes 21 to 29, respectively). The molecular weight standard (lane MM) is a 1 kb DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, USA) 118

Figure 3 – Neighbor-joining tree reconstructed from the partial calmodulin gene sequences. The sequences of *A. niger*, haplotypes I

(KT749947), II (KT749948), III (KT749949) and *A. welwitschiae* haplotypes IV (KT749950), V (KT749951), VI (KT749952), VII (KT749953), VIII (KT749954), IX (KT749955) and X (KT749956) were obtained in the presente study. ^{T} means type strain sequences obtained from GenBank database. The accession numbers of nucleotide sequences are in parenthesis 119

Supplementary figure 1 - Genotype profiles revealed by the ABI 3500XL Genetic Analyser with GeneMarker® Software. Four PCR products amplified with primers labeled with FAM (blue) and HEX (green). Profile 1 indicates that the strain is *A. niger* or *A. welwitschiae* (green, 192 bp), harboring the *pks* (blue, 554 bp), *radH* (blue, 328 bp) and the *fum8* (blue, 128 bp) genes. Profile 2 indicates that the strain is *A. niger* or *A. welwitschiae* harboring the genes involved in OTA biosynthesis i.e. *radH* and *pks*. Profile 3 indicates that the strain is *A. niger* or *A. welwitschiae* harboring the gene *fum8*. Profile 4 indicates that the strain is *A. niger* or *A. welwitschiae* harboring none of genes studied herein.....122

Supplementary figure 2 - Brazilian map depicting the locations from which samples were obtained 123

Artigo Científico III

Figure 1 – Incidence of *Aspergillus* section *Nigri* in onion bulbs samples acquired monthly (from January/2014 to December/2015), during four seasons of the year, in supermarkets (Londrina, Paraná State, Brazil) 142

Figure 2 – Maximum Likelihood (ML) phylogenetic tree reconstructed from the partial calmodulin gene sequence aligned with corresponding sequence of type strains (T) from *Aspergillus* section *Nigri* deposited in NCBI database. Bootstrap values ≥ 70% are showed. *Aspergillus flavus* was used with outgroup 143

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1 – Sequências de *primers* utilizadas para detecção de espécies toxigênicas de *Aspergillus section Nigri* 75

Tabela 2 – Sequências de *primers* utilizadas para detecção de espécies toxigênicas de *Aspergillus section Circumdati*.....78

Tabela 3 – Sequências de *primers* utilizadas para detecção de espécies toxigênicas de *Aspergillus section Flavi* 79

Artigo Científico II

Table 1 – Primer sequences used in the multiplex PCR 108

Table 2 – *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates found in dried fruits, Brazil nuts, coffee beans, grapes, cocoa and onions from Brazil, fumonisin and ochratoxin phenotypes, and mPCR profile detecting the presence or absence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis 109

Table 3 – Phenotypic characterization for production of ochratoxin A and fumonisin B_2 by Brazilian *A. niger* and *A. welwitschiae* isolates 116

Table 4 – Distinct genotypes of Brazilian *A. niger* and *A. welwitschiae* isolates revealed after mPCR and agarose gel electrophorese.....116

Artigo Científico III

Table 1 – Frequency of occurrence, average of infection and range of infection with *Aspergillus* section *Nigri* species in inner scales, outer scales and adventitious roots of onion samples (*n*= 96).....141

Table 2 – Multiplex PCR results 141

LISTA DE ABREVIAÇÕES E UNIDADES

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
A	Adenina
ABI	Applied Biosystems
Ac	Allium cepa
AFB_1	Aflatoxina B_1
AFB_2	Aflatoxina B_2
AFG_1	Aflatoxina G_1
AFG_2	Aflatoxina G_2
aflA (hexA)	Gene regulador ácido-graxo sintetase
aflB (hexB)	Gene regulador ácido-graxo sintetase
aflC (pksA)	Gene policetídeo sintase
aflD (nor-1)	Gene norsolorinic acid reductase
aflE (norA)	Gene norsolorinic acid reductase
aflF (norB)	Gene norsolorinic acid dehydrogenase
aflG (avnA)	Gene regulador monooxygenase
aflH (adhA)	Gene regulador desidrogenase
aflI (avfA)	Gene regulador desidrogenase
aflJ (estA)	Gene regulador esterase
aflK (vbs)	Gene regulador oxidase/desidrogenas síntese de versicolorina B
aflL (verB)	Gene regulador desterase
aflM (ver-1)	Gene regulador desidrogenase
aflN (verA)	Gene regulador monooxygenase
aflO (omtB)	Gene regulador transferase
aflP (omtA)	Gene regulador transferase
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
aflQ (ordA)	Gene regulador monooxygenase
aflR (aflR)	Gene regulador biossintético da transcrição da aflatoxina
aflRaS	Gene regulador biossintético da transcrição da aflatoxina antisense

aflS (aflJ)	Gene co-ativador transcricional
aflT(aflT)	Gene transportador de toxinas
aflU (cypA)	Gene regulador monooxigenase A
aflV (cypX)	Gene regulador monooxigenase X
aflX (ordB)	Gene regulador monooxigenase B
aflY (hypA)	Gene regulador oxidase
aflW (moxY)	Gene regulador monooxigenase Y
AI	Média de infecção (Average of infection)
An/Aw	Aspergillus niger e Aspergillus welwitschiae
AT	Acyl transferase
ATCC	American Type Culture Collection
benA	Gene que codifica a proteína β-tubulina
benA-An/AwF	Primer de β-tubulina específico para A. niger/A. welwitschiae forward
benA-An/AwR	Primer de β-tubulina específico para A. niger/A. welwitschiae reverse
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTn	BLAST de nucleotídio
Bt2a	Primer de β-tubulina forward
Bt2b	Primer de β-tubulina reverse
BtubNomF	Primer de β-tubulina específico para A. nomius forward
BtubNomR	Primer de β-tubulina específico para A. nomius reverse
C	Carbono
C	Citosina
CaM	Gene que codifica a proteína calmodulina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBS	CBS-KNAW Collections (Fungal Culture Collection)
CE	Eletroforese de capilar (Capillary Electrophoresis)
Cluster FUM	Cluster de biossíntese da fumonisina no gênero Fusarium
Cluster fum	Cluster de biossíntese da fumonisina no gênero Aspergillus
cm	Centímetros
cmd5	Primer de Calmodulina forward
cmd6	Primer de Calmodulina reverso
C-MeT	C-methyltranferase

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CYA	Meio Czapek Yeast Autolysate Agar
CY20S	Meio Czapek Yeast Extract 20% Sucrose Agar
DG18	Meio Dichloran 18% Glycerol Agar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	DNA ribossômico
dNTP	Trifosfato de desoxirribonucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
F	Forward
FAM	6-carboxy-fluorescine
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FB_1	Fumonisina B_1
FB_2	Fumonisina B_2
FB_3	Fumonisina B_3
FB_4	Fumonisina B_4
FB_6	Fumonisina B_6
FDA	Food and Drug Administration
FO	Frequência de ocorrência (Frequence of occurrence)
fum1	Gene policetídeo sintase
fum3	Gene hidroxilase
fum6	Gene hidroxilase p450
fum7	Gene desidrogenase
fum8	Gene α-oxoamino sintase/aminotransferase classe II
fum10	Gene acil-CoA sintase
fum13	Gene carbonil redutase
fum14	Domínio de condensação de proteína NRPS
fum15	Gene hidroxilase
fum19	Gene ABC transportador
fum21	Regulador da transcrição dos genes do cluster da fumonisina
g	Gramas
G	Guanina
GRAS	Generally Regarded as Safe
h	Horas

H	Hidrogênio
ha	Hectare
HCl	Ácido clorídrico
HEX	Hexachloro-6-carboxy-fluorescine
hypB	Gene hidrogenase
hypC	Gene putativo amino-hidroxilase
hypD	Proteína hipotética do cluster da aflatoxina
hypE	Gene hidrogenase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
hxtA	Gene putativo transportador hexose
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
ITEM	ITEM Agro-Food Microbial Culture Collection
ITS	Espaços Internos Transcritos (Internal Transcribed Spacer)
Kb	Kilobase
Kg	Quilograma
KS	β-ketoacyl synthase
LSPA	Levantamento Sistemático da Produção Agrícola
m	Metros
M	Marcador de peso molecular
mfs	Gene que codifica um transportador localizado no cluster da aflatoxina
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mg	Miligrama
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
min	Minutos
ML	Maximum Likelihood
mL	Mililitro
mPCR	PCR multiplex
n	Número
N	Nitrogênio

NaCl	Cloreto de sódio
nadA	Gene regulador oxidase
NaOCL	Hipoclorito de sódio (Sodium hypochlorite)
NC	Controle negativo (Negative control)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
NRPS	Peptídeo sintase não ribossomal
NRRL	ARS Culture Collection (Agricultural Research Service Culture Collection)
^{NT}	Espécie neo-tipo
OPA	Reagente O-Ftaldialdeído (Ortho-phthaldialdehyde)
OTA	Ocratoxina A
OH	Hidroxila
p450	Citocromo P450
pb ou bp	Pares de bases (Base pairs)
PBS	Tampão fosfato-salino (Phosphate Buffer Saline)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
pH	Potencial hidrogeniônico
pks	Gene policetídeo sintase
pMol	picomoles
R	Reverse
radH	Gene halogenase flavina dependente
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RI	Intervalo de infecção (Range of infection)
RPB2	RNA polimerase II (RNA polymerase II second largest subunit)
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
sdr1	Gene desidrogenase de cadeia curta
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphism)
sugR	Gene regulador transcrição de açúcar
T ou ^{T}	Espécie tipo
T	Timina

TE	Tampão Tris-EDTA
TEF-1α	Fator de elongação 1-alfa
U	Unidades
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UK	Reino Unido (United Kingdon)
USA	Estados Unidos da América (United States of America)
UV	Luz ultravioleta
v	Versão
v	Volume
YESA ou YES	Meio Yeast Extract Sucrose Agar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 27

2.1 Visão geral de *Aspergillus* produtores de micotoxinas em alimentos: *Aspergillus section Flavi*, *Aspergillus section Nigri* e *Aspergillus section Circumdati* 27

2.1.1 Aspergillus section Flavi 28

2.1.2 Aspergillus section Nigri 31

2.1.3 Aspergillus section Circumdati 33

2.2 Principais micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* em alimentos 37

2.2.1 Aflatoxinas 37

2.2.2 Ocratoxinas 41

2.2.3 Fumonisinas 44

2.2.4 Relatos do gênero Aspergillus em alimentos e contaminação com micotoxinas 49

2.3 Marcadores moleculares para a identificação e detecção de espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus* 60

3 OBJETIVOS 80

3.1 Objetivos geral 80

3.2 Objetivos específicos 80

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 82

4.1 Artigo Científico I: Identification of *Aspergillus nomius* in Bees Visiting Brazil Nut Flowers 83

4.2 Artigo Científico II: Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae* 91

4.3 Artigo Científico III: Black aspergilli from onion samples and their potential for mycotoxin production 125

5 CONCLUSÕES FINAIS.....144

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....146

1 INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Aspergillus* são frequentemente relatados em processos de contaminação e deterioração de alimentos, destacando-se as espécies pertencentes à *Aspergillus section Flavi* e *Aspergillus section Nigri* que podem iniciar o processo de contaminação ainda no campo, antes da colheita, ou posteriormente devido às condições inapropriadas de colheita, transporte e armazenamento. *Aspergillus section Flavi* e *Aspergilllus section Nigri* contemplam as principais espécies produtoras de aflatoxinas, ocratoxinas e fumonisinas. Estas micotoxinas são hepatotóxicas, nefrotóxicas, neurotóxicas, imunossupressoras e carcinogênicas para a espécie humana (classificadas pelo IARC como pertencentes aos grupos 1 carcinogênico para humanos (aflatoxinas) e 2B possivelmente carcinogênico para humanos (ocratoxinas e fumonisinas)).

Algumas das espécies de *Aspergillus section Flavi*, como *Aspergillus nomius* e mais recentemente *Aspergillus pseudonomius* são isoladas e descritas como importantes produtoras de aflatoxina B_1, B_2, G_1 e G_2. Espécies de *Aspergillus section Nigri*, como *Aspergillus niger* e *Aspergillus welwitschiae* são isoladas de produtos destinados à alimentação humana, apresentam características morfológicas muito semelhantes e contemplam linhagens produtoras de ocratoxina A e fumonisina B_2.

Cada vez mais aumenta o rigor no controle de qualidade que é exercido sobre os produtos destinados à alimentação com relação à presença de micotoxinas. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011) por meio da Resolução RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, com atualizações por meio da Resolução RDC N° 138, de 8 de fevereiro de 2017 (BRASIL, 2017), estabeleceu/alterou os limites máximos tolerados para aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas e outras micotoxinas em alguns alimentos prontos para o consumo e em algumas matérias primas.

Devido ao risco potencial da presença de fungos micotoxigênicos em alimentos, vários pesquisadores têm dedicado esforços para desenvolver métodos moleculares que facilitem a detecção de espécies e/ou isolados produtores de toxinas, bem como a rastreabilidade de possíveis fontes de contaminação.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo desenvolver marcadores moleculares espécie-específicos para a detecção de espécies de *Aspergillus section Flavi* e *Aspergillus section Nigri* produtoras de micotoxinas. Também se constituiu como objetivos deste trabalho o desenvolvimento e uso de marcadores moleculares para detectar genes envolvidos na biossíntese de ocratoxinas e fumonisinas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Visão geral de *Aspergillus* produtores de micotoxinas em alimentos: *Aspergillus section Flavi*, *Aspergillus section Nigri* e *Aspergillus section Circumdati*

O gênero *Aspergillus* pertence à família Trichocomaceae, possui grande diversidade de espécies, é composto por fungos filamentosos caracterizados morfologicamente pela coloração das colônias que podem apresentar tons de verde, amarelo, marrom, branco, preto e cinza, pela presença de hifas reprodutivas assexuadas diferenciadas em conidióforos normalmente aseptados cuja extremidade se diferencia em uma vesícula podendo apresentar forma globosa, piriforme, espeatulada ou clavada, onde estão inseridos as métulas e fiálides. A presença destas estruturas permite a caracterização das espécies de *Aspergillus* em unisseriados ou bisseriados, baseados na ausência ou presença da métula, respectivamente. A fiálide é uma estrutura que sempre encontra-se presente no conidióforo, e a partir dela são produzidas as cadeias de conídios com diferentes tipos de ornamentação. Algumas espécies podem apresentar células Hülle e esclerócios (BENNETT, 2010; SAMSON e VARGA, 2010; KRIJGSHELD et al., 2013). Algumas espécies de *Aspergillus*, são capazes de reproduzir sexuadamente através do desenvolvimento de cleistotécios contendo ascósporos meióticos agrupados dentro de ascos.

O gênero *Aspergillus* foi primeiramente subdividido em subgêneros e seções por Gams et al. (1985). Atualmente, existem descritos 4 subgêneros (*Aspergillus, Circumdati, Fumigati* e *Nidulantes*) e 23 seções (*Aspergillus, Bispori, Candidi, Cervini, Circumdati, Clavati, Cremei, Flavi, Flavipedes, Fumigati, Jani*, *Nidulantes, Nigri, Ochraceorosei, Petersonii, Raperi, Restricti, Robusti, Silvatici, Sparsi, Tanneri, Terrei* e *Usti*) onde as mais de 339 espécies descritas até o momento encontram-se distribuídas (SAMSON et al., 2014; VISAGIE et al., 2014a; HUBKA et al., 2015; JURJEVIĆ et al., 2015; CHEN et al., 2016a; 2016b; HUBKA et al., 2016; CHEN et al., 2017). Atualmente, a precisa classificação das espécies fúngicas, incluindo as pertencentes ao gênero *Aspergillus*, encontra-se pautada na interação entre características morfológicas, bioquímicas e moleculares, denominada de “taxonomia

polifásica". O uso da "taxonomia polifásica" favorecido pelas facilidades de sequenciamento de nucleotídeos, tem permitido a descrição frequente de novas espécies para o gênero *Aspergillus*. A título de exemplo, *Aspergillus labruscus* é uma espécie pertencente à *Aspergillus section Nigri*, isolada recentemente em amostras de uva coletadas no Brasil (FUNGARO et al., 2017), *Aspergillus korhogoensis* é uma nova espécie pertencente à *Aspergillus section Flavi,* isolada de amostras de amendoim e coletadas na Costa do Marfim (CARVAJAL-CAMPOS et al., 2017), assim como *Aspergillus hancockii* pertencente à *Aspergillus section Flavi,* recentemente isolada de amostras de solo coletados em regiões de cultivo de amendoim na Austrália (PITT et al., 2017).

Muitas destas espécies de *Aspergillus* apresentam importância médica, biotecnológica e industrial, como a espécie *Aspergillus niger sensu stricto* amplamente utilizada na indústria de alimentos e que possui status GRAS (*Generally Regarded as Safe*) concedido pela *Food and Drug Administration* (FDA) (VARGA et al., 2011a). Outras espécies, porém, apresentam impactos negativos, podendo causar doenças, ser frequentemente relatadas em processos de contaminação e deterioração de alimentos ou produtoras de vários metabólitos secundários, incluindo micotoxinas que podem causar sérios danos à saúde humana e animal (PERRONE, et al., 2007).

2.1.1 Aspergillus section Flavi

Aspergillus section Flavi incluem espécies cujas colônias podem apresentar superfície aveludada a flocosa, pouca a abundante esporulação, as cabeças de conídios apresentam coloração verde-amarelo a marrom, conídios globosos a subglobosos com ornamentação variada, conidióforo uni ou bisseriados, vesículas globosas a subglobosas, estipe lisa ou rugosa e quando presentes os esclerócios são escuros (PETERSON et al., 2001; VARGA et al., 2011b; MASSI et al., 2014).

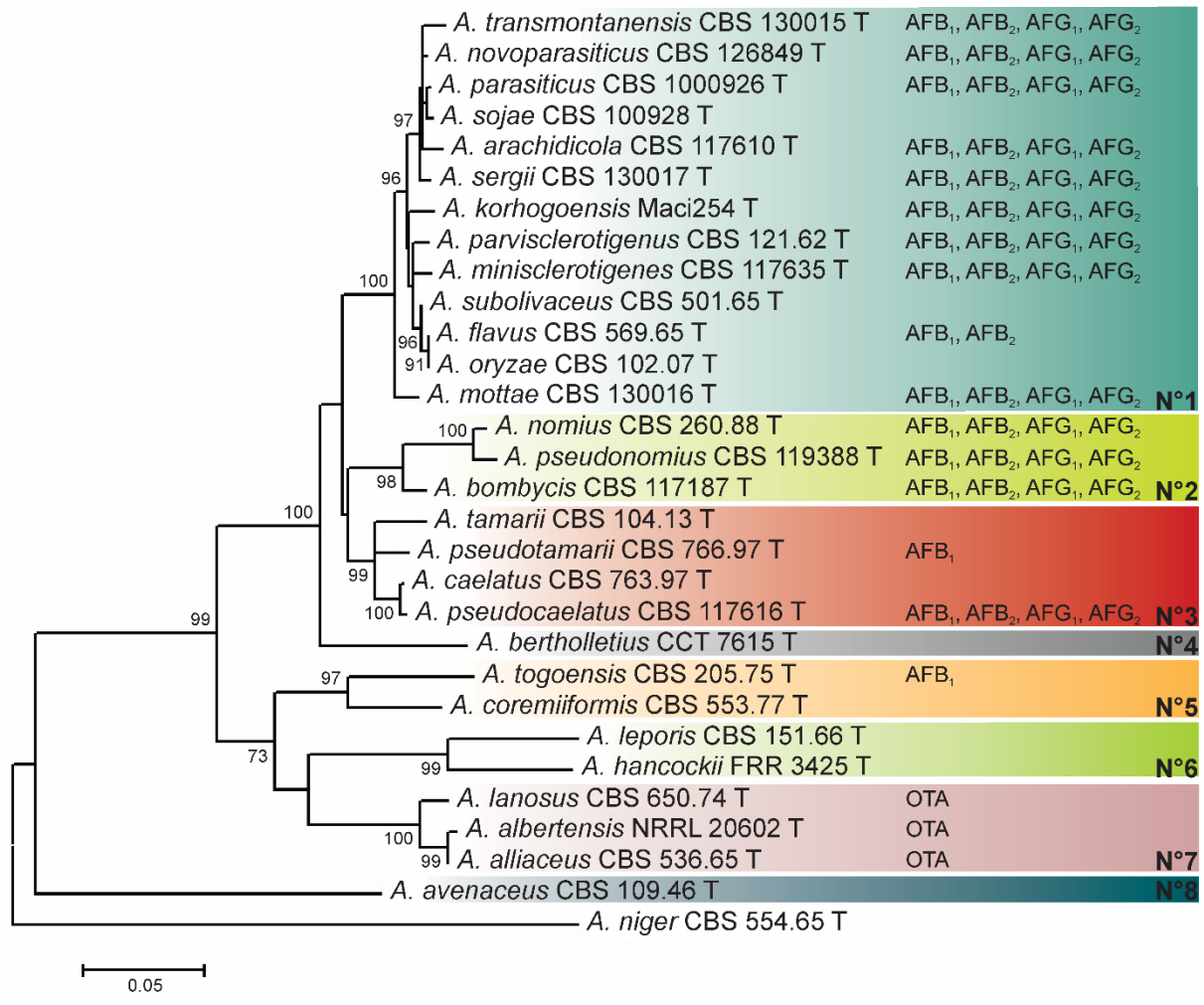
Dados recentes atribuem à *Aspergillus section Flavi* 29 espécies distribuídas em 8 clados: Clado *A. flavus* (N°1), Clado *A. nomius* (N°2), Clado *A. tamarii* (N°3), Clado *A. bertholletius* (N°4), Clado *A. togoensis* (N°5), Clado *A. leporis* (N°6), Clado *A. alliaceus* (N°7) e Clado *A. avenaceus* (N°8) conforme apresentado na figura 1, a

qual foi construída para fins de ilustrar a presente revisão fazendo uso de informações fornecidas por diversos autores (VARGA et al., 2011b; GONÇALVES et al., 2012b; TANIWAKI et al., 2012; SAMSON et al., 2014; CARVAJAL-CAMPOS et al., 2017; PITT et al., 2017).

Algumas espécies como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* e *Aspergillus tamarii* destacam-se pelos seus usos industriais, inclusive na indústria de alimentos. Outras, tais como *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, destacam-se pela ampla ocorrência e pela capacidade de produção de micotoxinas, incluindo aflatoxina do tipo B e G em diferentes substratos. Entretanto, existem espécies de *Aspergillus section Flavi* encontradas em menor frequência, predominantemente em regiões de clima tropical e subtropical, que também são descritas como produtoras de aflatoxinas dos tipos B e G, tais como: *Aspergillus pseudotamarii, Aspergillus bombycis, Aspergillus parvisclerotigenus, Aspergillus arachidicola, Aspergillus minisclerotigenes, Aspergillus pseudocaelatus*, *Aspergillus togoensis*, *Aspergillus sergii*, *Aspergillus mottae*, *Aspergillus transmontanensis*, *Aspergillus novoparasiticus*, *Aspergillus pseudonomius* e *Aspergilllus korhogoensis.* Raras espécies desta seção são produtoras de ocratoxina A (VARGA et al., 2015; CARVAJAL-CAMPOS et al., 2017).

Dentre os clados atualmente existentes para *Aspergillus section Flavi*, descata-se o Clado *A. nomius* (N°2), por contemplar uma espécie alvo deste estudo. Este clado é formado pelas espécies *A. nomius*, *A. pseudonomius* e *A. bombycis.* Kurtzman et al. (1987) descreveram *A. nomius* CBS 260.88^{T} = NRRL 13137^{T} a partir de amostras de trigo mofado dos EUA e a partir de um grande número de abelhas da espécie *Nomia melanderi*, gênero que originou o nome da espécie fúngica *A. nomius*. No princípio *A. nomius* foi considerada uma espécie rara, mas estudos recentes indicam que esta espécie encontra-se amplamente distribuída na natureza, podendo ser isolada de vários substratos, estando frequentemente associada com insetos, tais como abelhas e cupins (*apud* HORN et al., 2011; VARGA et al., 2011b). *A. nomius* também tem sido isolado de frutos de casca rígida, cana de açúcar, de uma enorme variedade de sementes e grãos e de castanha do brasil, evidenciando seu potencial como agente etiológico em eventos de contaminação por aflatoxina (KURTZMAN et al., 1987; *apud* VARGA et al., 2011b).

Figura 1 – Análise filogenética multilocus reconstruída utilizando o método Maximum Likelihood (ML) e sequências de nucleotídeos de uma parte dos genes que codificam para β-tubulina e calmodulina disponíveis no NCBI para evidenciar as relações entre as espécies atualmente aceitas para *Aspergillus section Flavi.* As diferentes cores sinalizam os 8 diferentes clados da seção. Foram considerados valores de *bootstrap* ≥70%. *Aspergillus niger* foi utilizado como *outgroup*. Espécies produtoras de aflatoxinas B_1 (AFB_1), B_2 (AFB_2), G_1 (AFG_1) e G_2 (AFG_2) e ocratoxina A (OTA) estão indicadas.



Fonte: próprio autor, no entanto, para a construção desta figura utilizou-se de informações contidas nos trabalhos de Varga et al. (2011b), Samson et al. (2014), Carvajal-Campos et al. (2017) e Pitt et al. (2017).

2.1.2 Aspergillus section Nigri

Aspergillus section Nigri também denominados de *black aspergilli* incluem espécies cujas colônias apresentam superfície aveludada, pouca a abundante esporulação, as cabeças de conídios apresentam coloração marrom a negro, conídios globosos a subglobosos com ornamentação variada, conidióforo uni ou bisseriados, vesículas globosas a subglobosas, estipe lisa ou rugosa e em algumas espécies a presença de esclerócios (SILVA et al., 2011; VARGA et al., 2011a; SIMÕES et al., 2013; FRISVAD et al., 2014).

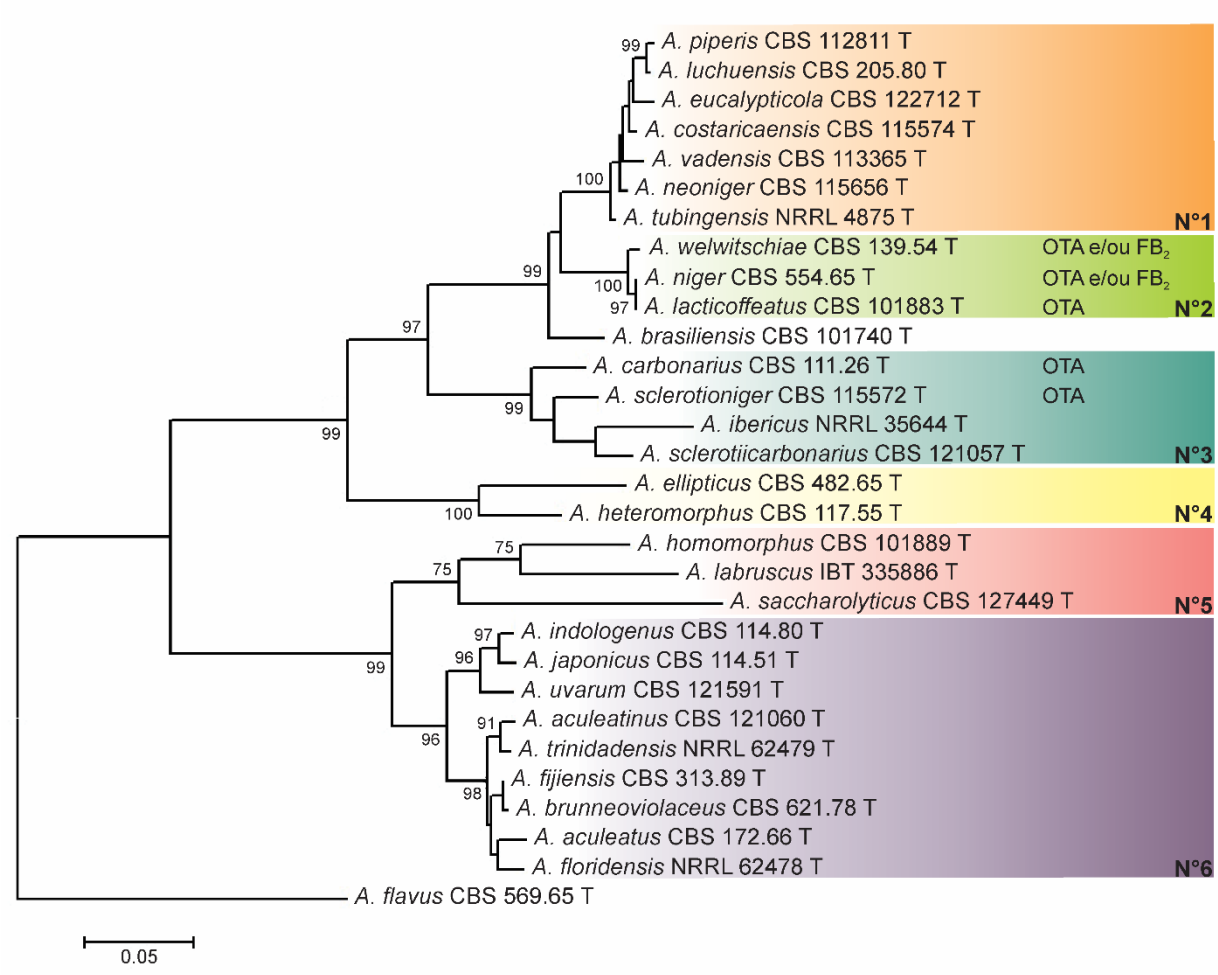
Dados recentes atribuem à *Aspergillus section Nigri* 29 espécies distribuídas em 6 clados: Clado *A. tubingensis* (N°1), Clado *A. niger/welwitschiae* (N°2), Clado *A. carbonarius* (N°3), Clado *A. heteromorphus* (N°4), Clado *A. homomorphus* (N°5) e Clado *A. aculeatus* (N°6). As espécies que compõem o Clado *A. tubingensis* (*n*=7), o Clado *A. niger/welwitschiae* (*n*=3) e a espécie *A. brasiliensis* (*n*=1) formam o chamado “agregado” *A. niger*, cujas espécies apresentam características morfológicas muito semelhantes entre si, tornando-se difícil e inadequada a identificação destas apenas com métodos clássicos (VARGA et al., 2011a; SAMSON et al., 2014). A figura 2 foi construída para fins de ilustrar a presente revisão e apresenta as espécies e clados de *Aspergillus section Nigri* reconhedidos atualmente.

Aspergillus section Nigri inclui espécies como *A. luchuensis* e *A. niger* consideradas importantes devido sua ampla utilização industrial, estando frequentemente associada à indústria de fermentação de alimentos (FRISVAD et al., 2011; HONG et al., 2013). Porém, espécies desta seção, como *A. carbonarius*, *A. sclerotioniger*, algumas linhagens de *A. welwitschiae, A. lacticoffeatus* e algumas linhagens da já mencionada espécie *A. niger* destacam-se pela capacidade de produção de micotoxinas, incluindo ocratoxina A e/ou fumonisinas em diversos substratos (MAGNANI et al., 2005; FRISVAD et al., 2007; 2011; PERRONE et al., 2011; VARGA et al., 2011a; HONG et al., 2013; TANIWAKI et al., 2014; MASSI et al., 2016; FERRANTI et al., 2017).

A. niger é uma das espécies mais conhecidas dentre os *Aspergillus section Nigri* e importante economicamente, no entanto, esta foi a primeira espécie desta

seção a ser demonstrada para a comunidade científica, por Abarca e colaboradores (1994), como portadora de linhagens capazes de produzir ocratoxina A (OTA) em meio de cultura. Posteriormente em 2007, Frisvad e colaboradores demonstraram a capacidade de linhagens de *A. niger* produzir também fumonisina B_2 (FB_2) (FRISVAD et al., 2007).

Figura 2 – Análise filogenética multilocus reconstruída utilizando o método Maximum Likelihood (ML) e sequências de nucleotídeos de uma parte dos genes que codificam para β-tubulina e calmodulina disponíveis no NCBI para evidenciar as relações entre as espécies atualmente aceitas para *Aspergillus section Nigri*. As diferentes cores sinalizam os 6 diferentes clados da seção. Foram considerados valores de *bootstrap* ≥70%. *Aspergillus flavus* foi utilizado como *outgroup*. Espécies produtoras de ocratoxina A (OTA) e/ou fumonisina FB_2 (FB_2) estão indicadas.



Fonte: próprio autor, no entanto, para a construção desta figura utilizou-se de informações contidas nos trabalhos de Varga et al. (2011a); Samson et al. (2014) e Fungaro et al. (2017).

Perrone et al. (2011) utilizando-se de dados biológicos, bioquímicos e moleculares analisaram uma população de isolados da espécie *A. niger* obtidos de amostras de uvas da Europa e revelaram, por meio deste estudo, o fato desta espécie *A. niger* conter uma espécie irmã, até então considerada sinônimo de *A. niger,* mas por eles denominada de *Aspergillus awamori* (baseada na linhagem *A. awamori* CBS 557.65^{NT} = NRRL 4948^{NT}). Linhagens de *A. niger* e *A. awamori sensu* Perrone apresentaram sobreposição de dados morfológicos, fisiológicos e bioquímicos e poucas diferenças ecológicas, por isso, são de difícil diferenciação usando apenas métodos clássicos. No entanto, dados moleculares as consideram espécies distintas, porém filogeneticamente próximas e envolvidas em um atual processo de especiação (PERRONE et al., 2011; VARGA et al., 2011a).

Países da Ásia Oriental são detentores de linhagens de *A. awamori* muito utilizadas industrialmente em processos de fermentação de alimentos, mas que diferem das linhagens identificadas como *A. awamori* por Perrone et al. (PERRONE et al., 2011). Posteriormente, a fim de esclarecer a posição taxonômica desta espécie e diferenciá-la das linhagens industriais, Hong et al. (2013) reanalisaram as linhagens de *A. awamori sensu* Perrone e as renomearam como *Aspergillus welwitschiae*, uma vez que apresentaram dados moleculares idênticos com a linhagem CBS 139.54^{T} obtida de *Welwitschia mirabilis* coletada na Namíbia.

A. niger e *A. welwitschiae* (= *A. awamori sensu* Perrone) são espécies irmãs com grande importância econômica, apresentando-se constantemente contaminando produtos como uva, frutas secas, grãos de café, cacau, cebolas entre outros. Estas são as únicas espécies de *Aspergillus section Nigri* que contém linhagens capazes de produzir OTA e FB_2 simultaneamente em diversos substratos (FRISVAD et al., 2011; PERRONE et al., 2011; VARGA et al., 2011a; MASSI et al., 2016; SUSCA et al., 2016).

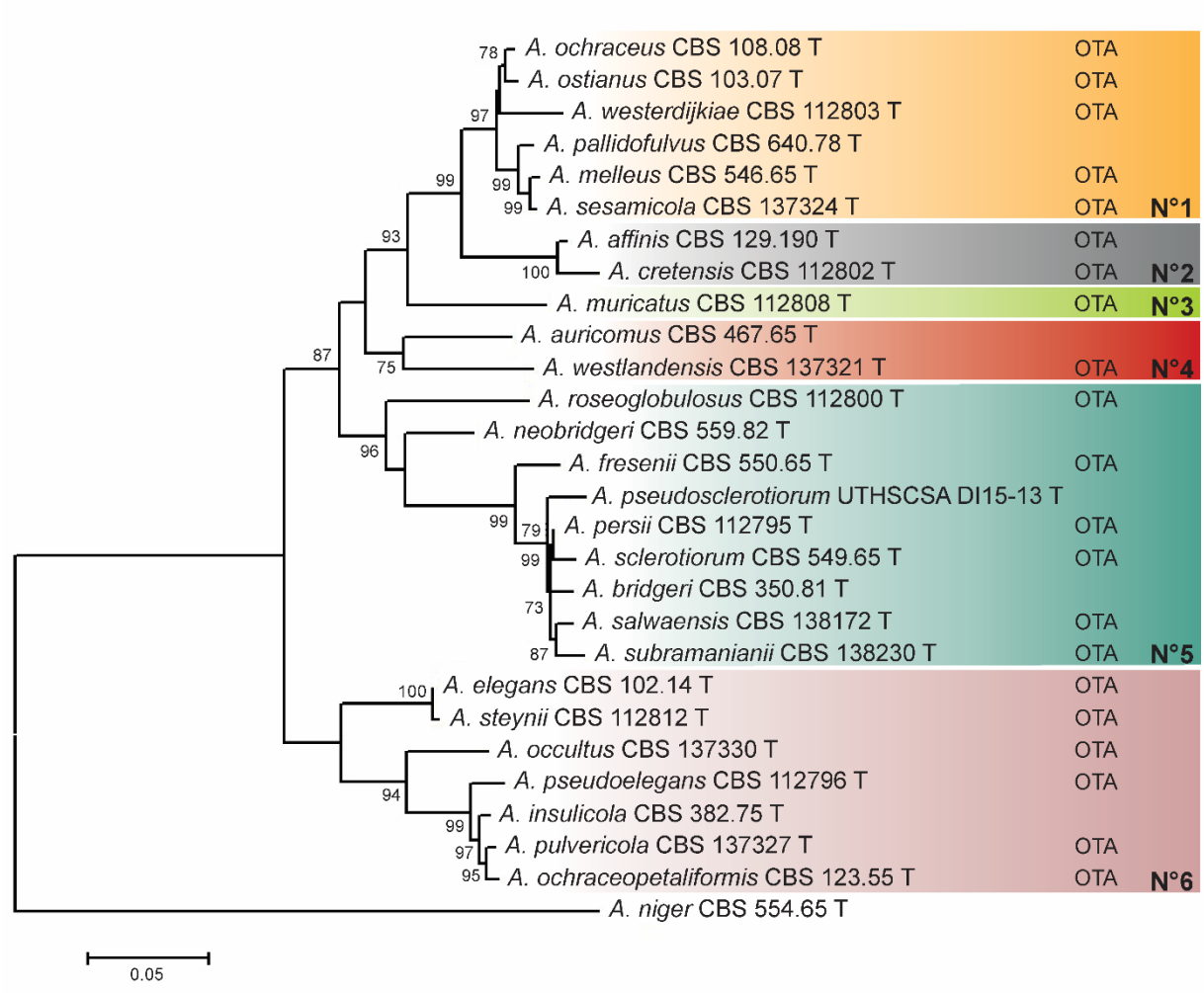
2.1.3 Aspergillus section Circumdati

Aspergillus section Circumdati é composto atualmente por 27 espécies distribuídas em 6 clados: Clado *A. ochraceus* (N°1), Clado *A. affinis* (N°2), Clado *A. muricatus* (N°3), Clado *A. auricomus* (N°4), Clado *A. fresenii* (N°5) e Clado *A.*

ochraceopetaliformis (N°6). Estas espécies apresentam colônias com pouca a moderada esporulação, cujos conídios podem ser globosos a subglobosos, lisos e rugosos com coloração variando em tons de amarelo a ocre, conidióforos todos bisseriados com vesícula globosa, estipe rugosa e esclerócios quando presentes, apresentam-se em tons de branco, amarelo, laranja, creme, marrom claro, rosa ou roxo-avermelhado (FRISVAD et al., 2004; VISAGIE et al., 2014b; SIQUEIRA et al., 2017).

Esta seção inclui espécies com grande importância econômica e médica além das espécies produtoras de importantes metabólitos secundários, destacando-se a OTA. Algumas espécies são altamente produtoras desta micotoxina (*Aspergillus occultus, Aspergillus pulvericola, Aspergillus roseogloulosus, Aspergillus steynii* e *Aspergillus westerdijkiae*), enquanto que outras produzem níveis menores de OTA (*Aspergillus affinis, Aspergillus cretensis, Aspergillus fresenii, Aspergillus muricatus, Aspergillus ochraceopetaliformis, Aspergillus ochraceus, Aspergillus pseudoelegans, Aspergillus sclerotiorum, Aspergillus melleus, Aspergillus ostianus, Aspergillus persii, Aspergillus salwaensis, Aspergillus sesamicola, Aspergillus subramanianii, Aspergillus westlandensis* e *Aspergillus elegans*). Linhagens toxigênicas de *A. ochraceus*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae* são as principais e mais frequentes espécies de *Aspergillus section Circumdati* encontradas contaminando solos e produtos agrícolas como café, uva e cereais (GIL-SERNA et al., 2011; VISAGIE et al., 2014b). A figura 3 foi construída para fins de ilustrar a presente revisão e apresenta as espécies e clados de *Aspergillus section Circumdati* reconhecidos atualmente.

Figura 3 – Análise filogenética multilocus reconstruída utilizando o método Maximum Likelihood (ML) e sequências de nucleotídeos de uma parte dos genes que codificam para β-tubulina e calmodulina disponíveis no NCBI para evidenciar as relações entre as espécies atualmente aceitas para *Aspergillus section Circumdati.* As diferentes cores sinalizam os 6 diferentes clados da seção. Foram considerados valores de *bootstrap* ≥70%. *Aspergillus niger* foi utilizado como *outgroup*. Espécies produtoras de ocratoxina A (OTA) estão indicadas.



Fonte: próprio autor, no entanto, para a construção desta figura utilizou-se de informações contidas nos trabalhos de Frisvad et al. (2004); Visagie et al. (2014b) e Siqueira et al. (2017).

Em 2011 uma publicação do *International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants* estabeleceu o uso de uma nomenclatura única para algas, fungos e plantas (NORVELL, 2011). Essa estratégia gerou mudanças significativas na

taxonomia e nomenclatura de muitos gêneros fúngicos, mas tal mudança é necessária, a fim de obter melhores contribuições para um correto processo de identificação de espécies. Apesar desta nova convenção, a taxonomia de *Aspergillus section Flavi*, *Aspergillus section Circumdati* e principalmente de *Aspergillus section Nigri* mantem-se complexa e atualmente está baseada no uso da "taxonomia polifásica". O uso conjunto de métodos clássicos e moleculares se faz necessário, pois muitas espécies de *Aspergillus*, destacando-se as pertencentes à *Aspergillus section Nigri*, apresentam características morfológicas para diferenciação muito sutis. Entre os *Aspergillus section Nigri*, existem atualmente onze espécies descritas formando o "agregado" *A. niger* que são morfologicamente muito semelhantes, necessitando de dados moleculares para a precisa identificação (SAMSON et al., 2014).

Segundo a literatura, os genes que codificam para as proteínas calmodulina (*CaM*) e β-tubulina (*benA*) são bons marcadores para identificação de *Aspergillus*, pois os atuais bancos de dados estão bem estabelecidos, os *loci* são fáceis de amplificar e possuem um polimorfismo adequado dentro e entre espécies (SAMSON et al., 2014). Portanto, baseado nestas indicações, sequências de nucleotídeos de uma porção dos genes *CaM* e *benA* de todas as espécies tipos de *Aspergillus section Flavi*, *Aspergillus section Nigri* e *Aspergillus section Circumdati* foram utilizadas para revelar as relações filogenéticas entre as espécies, atualmente aceitas, para cada uma destas seções (Figuras 1, 2 e 3, respectivamente).

Considerando que vários alimentos destinados à alimentação humana e animal passa atualmente por um rigoroso controle de qualidade, já que a contaminação destes produtos por fungos e suas consequentes micotoxinas, representam sérios agravos a saúde e uma forte barreira para a comercialização do produto, principalmente para países importadores, o Brasil, através da Resolução RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, com atualizações por meio da Resolução RDC N° 138, de 8 de fevereiro de 2017, estabeleceu/alterou os níveis de concentração máximo tolerados permitidos para aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas e outras micotoxinas em diversos produtos prontos para o consumo ou em matérias primas (BRASIL, 2011; 2017).

2.2 Principais micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* em alimentos

Durante o ciclo de vida de um organismo fúngico, este é capaz de metabolizar e sintetizar diversos compostos orgânicos, capazes de apresentar algum tipo de atividade biológica benéfica ou maléfica para a população. Dentre estes compostos destacam-se as micotoxinas, caracterizadas como metabólitos secundários tóxicos, naturalmente sintetizados no final da fase exponencial de crescimento de algumas espécies de fungos filamentosos, quando encontram-se em condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, disponibilidade de água e características nutricionais. Esses metabólitos não são essenciais para a manutenção da vida fúngica ou reprodução, mas supõe-se que possam oferecer vantagem competitiva em relação às espécies não toxigênicas. As micotoxinas podem desenvolver atividade mutagênica, carcinogênica, teratogênica e imunossupressora naqueles que a ingerem dependendo da duração e nível de exposição (BARANYI et al., 2013; MORETTI et al., 2013; ISMAIEL e PAPENBROCK, 2015; PI et al., 2015).

Várias micotoxinas têm sido identificadas como contaminantes de alimentos, porém as micotoxinas produzidas por espécies do gênero *Aspergillus* se caracterizam como de grande ocorrência e importância econômica, destacando-se as classes das aflatoxinas, ocratoxinas e fumonisinas (PERRONE et al., 2007; VARGA et al., 2015). Cada uma destas micotoxinas pode ser produzida por mais de uma espécie fúngica ou mesmo uma espécie pode ser capaz de produzir mais de um tipo de toxina (FRISVAD e LARSEN, 2015; VARGA et al., 2015).

2.2.1 Aflatoxinas

A aflatoxina foi descoberta na Inglaterra em 1960, a partir de amostras de ração animal produzidas a base de amendoim que apresentaram contaminação com o fungo da espécie *A. flavus* e a consequente micotoxina por ele produzida. A ingestão deste produto levou a contaminação e morte de um grande número de perus e outros tipos de aves e animais que apresentaram necrose hepática aguda. Este evento tornou-se mundialmente conhecido como “doença X dos perus”

(BARANYI et al., 2013; ISMAIEL e PAPENBROCK, 2015; VARGA et al., 2015). Atualmente a contaminação de diversos alimentos com aflatoxinas causa sérias perdas econômicas e problemas de saúde pública para a população mundial.

As aflatoxinas são um grupo de bisfuranocumarinas estruturalmente relacionadas, derivada da esterigmatocistina, sendo as aflatoxinas do tipo B_1, B_2, G_1 e G_2 as de maior ocorrência e que se destacam por apresentar propriedades hepatotóxicas e hepatocarcinogênicas, além de propriedades mutagênicas e teratogênicas (PERRONE et al., 2007; VARGA et al., 2015). A nomeação destes compostos ocorre baseado na fluorescência azul (AFB_1 e AFB_2) ou verde (AFG_1 e AFG_2) emitida sob luz ultravioleta de comprimento de onda de 366 nm e mobilidade cromatográfica relativa em camada delgada (BARANYI et al., 2013).

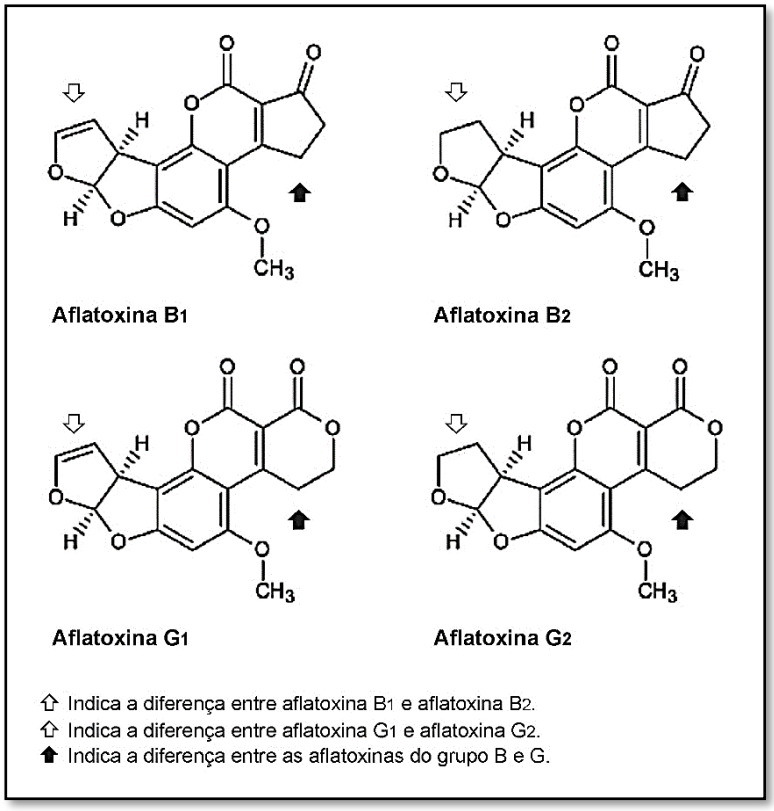
Todos os quatro principais tipos de aflatoxinas são metabólitos heterocíclicos altamente oxigenados derivados das bisfuranocumarinas (YU et al., 2002; MAIA e SIQUEIRA, 2007). As aflatoxinas apresentam um núcleo central cumarínico ligado de um lado a uma estrutura bifuranóide e por outro lado a uma lactona cumarínica, porém, as aflatoxinas do grupo B apresentam um anel ciclo pentano na molécula, enquanto que as aflatoxinas do grupo G apresentam um anel de lactona. As aflatoxinas do tipo B_2 e G_2 diferem das aflatoxinas do tipo B_1 e G_1 por apresentarem um anel bifuranóide saturado (BHATNAGAR et al., 2003). A figura 4 representa a estrutura química das quatro principais aflatoxinas.

Aspergillus section Flavi contempla as principais espécies produtoras de aflatoxinas, embora espécies de *Aspergillus section Nidulantes* e *Aspergillus section Ochraceorosei* também contêm espécies capazes de produzir a micotoxina. É possível encontrar na natureza espécies aflatoxigênicas capazes de produzir apenas aflatoxina do tipo B ou espécies produtoras de aflatoxinas dos tipos B e G simultaneamente (VARGA et al., 2015).

Dados da literatura evidenciam que a maioria dos metabólitos secundários fúngicos são produzidos por múltiplas vias bioquímicas que se iniciam frequentemente com terpenos sintases, policetídeos sintases ou peptídeo sintase não ribossomal, submetidas a modificações em séries catalisadas por enzimas como hidrolases, O-metil transferases e citocromo P450, que objetivam formar no final do processo as estruturas das diversas micotoxinas (KELLER et al., 2005; FOX e HOWLETT, 2008; TURNER, 2010; BRAKHAGE, 2012). Sabe-se que os genes

envolvidos com a biossíntese das micotoxinas encontram-se organizados na forma de *clusters* gênicos e frequentemente co-regulados.

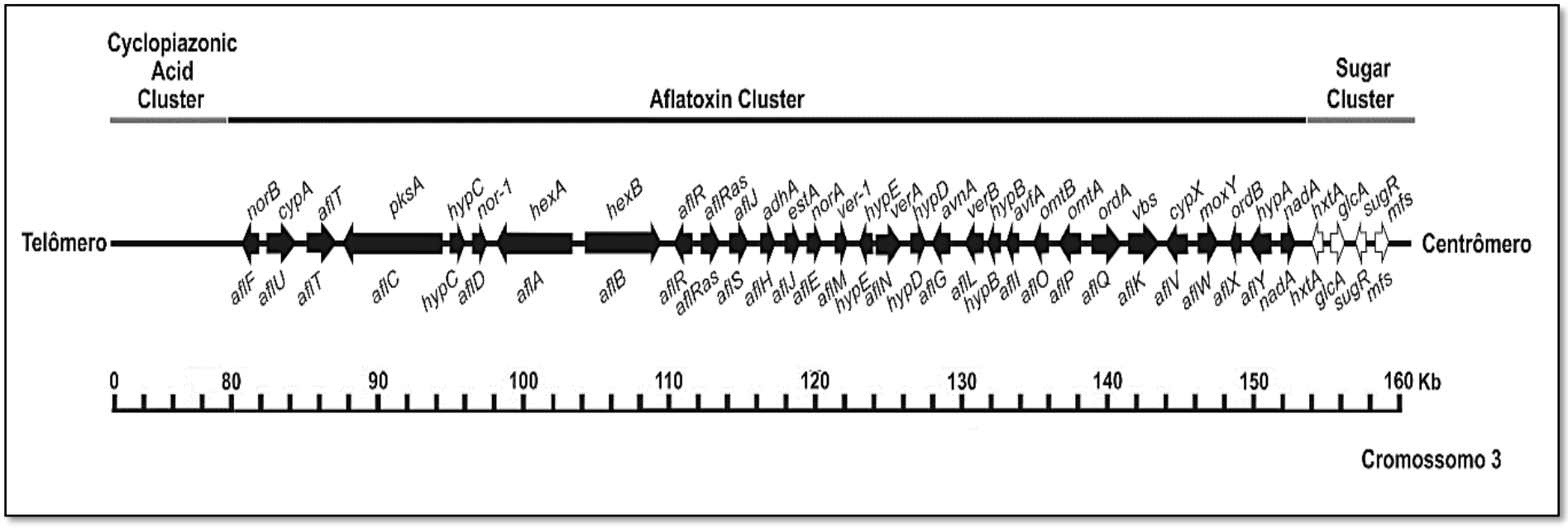
Figura 4 – Estrutura química das quatro principais aflatoxinas (AFB_1, AFB_2, AFG_1 e AFG_2).



Fonte: adaptado de Varga et al. (2015).

Análises moleculares realizadas em linhagens que contemplam as principais espécies produtoras de aflatoxinas permitiram observar que o *cluster* completo da aflatoxina está situado em uma região de 75 Kb do cromossomo 3 no genoma de linhagens aflatoxigênicas, encontrando-se tal região completamente ausente em linhagens não produtoras ou contendo alto nível de variação em relação ao número e tamanho das deleções presentes no *cluster* (BARANYI et al., 2013; MORETTI et al., 2013; ADHIKARI et al., 2016). A figura 5 representa a organização atual do *cluster* gênico da aflatoxina.

Figura 5 – Representação esquemática do *cluster* gênico completo da biossíntese das aflatoxinas em espécies de *Aspergillus section Flavi*. As setas indicam a direção da transcrição dos genes. Ambas as nomenclaturas, original (linha superior) e nova (linha inferior) são apresentadas. O *Sugar Cluster* está ligado ao *cluster* da aflatoxina e é formado por quatro genes. O *Cyclopiazonic Acid Cluster* tem aproximadamente 50 Kb e está localizado adjacente ao *cluster* da aflatoxina.



Fonte: próprio autor, no entanto, para a construção desta figura utilizou-se de informações contidas nos trabalhos de Ehrlich et al. (2005), Moore et al. (2009), Yu et al. (2012) e Callicott e Cotty (2014).

Segundo Baranyi et al. (2013), o *cluster* da aflatoxina é formado pelos reguladores transcricionais específicos *aflR* (*aflR*) e *aflS* (*aflJ*) e aproximadamente trinta genes co-regulados para expressão do produto final, a aflatoxina. Esses reguladores transcricionais estão situados adjacentes um do outro, mas são transcritos de forma divergente possuindo promotores independentes. Há evidências de que a curta região entre esses genes compartilhe sítios de ligação dos fatores transcricionais ou sítios de ligação de outros elementos reguladores. O gene *aflR* (*aflR*) codifica uma proteína de ligação ao zinco que é necessário para a ativação da transcrição dos genes estruturais, enquanto que, o gene *aflS* (*aflJ*) é um co-ativador transcricional envolvido na regulação dos genes do *cluster* de biossíntese das aflatoxinas interagindo com o gene *aflR* (*aflR*) (EHRLICH et al., 2012; VERHEECKE et al., 2015).

O contexto e a organização dos genes no *cluster* é altamente conservado entre as linhagens de *Aspergillus section Flavi* produtoras de aflatoxinas, possibilitando que variações nas sequências e/ou deleções em regiões/genes do *cluster* possam ser utilizadas para diferenciação de espécies produtoras das não produtoras (EHRLICH et al., 2005; MORETTI et al., 2013). Variações presentes no *cluster* da aflatoxina, incluindo deleções e outros rearranjos cromossômicos podem ser resultante da proximidade do *cluster* com o telômero (YU et al., 2012; MORETTI et al., 2013).

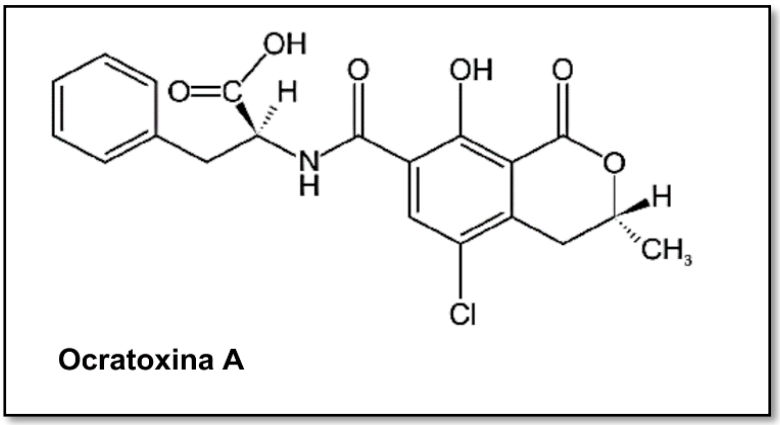
A primeira grande deleção descrita no *cluster* da aflatoxina foi observada na espécie *A. oryzae* não produtora de aflatoxina (KUSUMOTO et al., 2000). Posteriormente, a existência de várias outras deleções foi confirmada em linhagens não aflatoxigênicas (ADHIKARI et al., 2016). Neste contexto, Callicott e Cotty (2014) desenvolveram um sistema de PCR quadriplex para amplificação dos genes do *cluster* permitindo uma eficiente caracterização das linhagens, além da observação da existência de diversas deleções presentes no *cluster* da aflatoxina e na região telomérica próxima ao *cluster* em linhagens não produtoras.

2.2.2 Ocratoxinas

A ocratoxina A (OTA) é o mais potente composto derivado da classe de micotoxinas denominada “classe das ocratoxinas”, que inclui também a ocratoxina B e C. A estrutura da OTA consiste de um policetídeo derivado da família dihidro-isocumarina ligado a um grupo carboxila e ao aminoácido L-β-fenilalanina através de uma ligação amida (KHOURY e ATOUI, 2010). A figura 6 ilustra a estrutura química da molécula de OTA. Esta micotoxina foi descoberta em 1965 como um produto do metabolismo secundário de fungos da espécie *A. ochraceus* pertencente à *Aspergillus section Circumdati* (VAN der MERWE et al., 1965). Posteriormente, descobriu-se que várias outras espécies do gênero *Aspergillus* além de *Penicillium verrucosum* e *Penicillium nordicum*, também são capazes de produzir a referida micotoxina (FRISVAD e LARSEN, 2015; VARGA et al., 2015; GALLO et al., 2017).

Dentre os *Aspergillus section Nigri,* a primeira espécie a ser descoberta como produtora de OTA foi *A. niger* em 1994 por Abarca e colaboradores, como já mencionado (ABARCA et al., 1994), sendo tal produção favorecida em temperaturas variando entre 20 e 25°C (ZHIHONG et al., 2015). Posteriormente, descobriu-se que *A. carbonarius, A. sclerotioniger* e *A. welwitschiae* também contemplam isolados capazes de produzirem esta micotoxina. A OTA é nefrotóxica, e apresenta potencial carcinogênico, teratogênico e imunossupressor, apresentando distribuição mundial em diversos produtos destinados à alimentação humana e animal, incluindo cereais, especiarias, grãos de café, cacau, frutas secas, produtos derivados de uva, entre outros (PERRONE et al., 2007; KHOURY e ATOUI, 2010; VARGA et al., 2015).

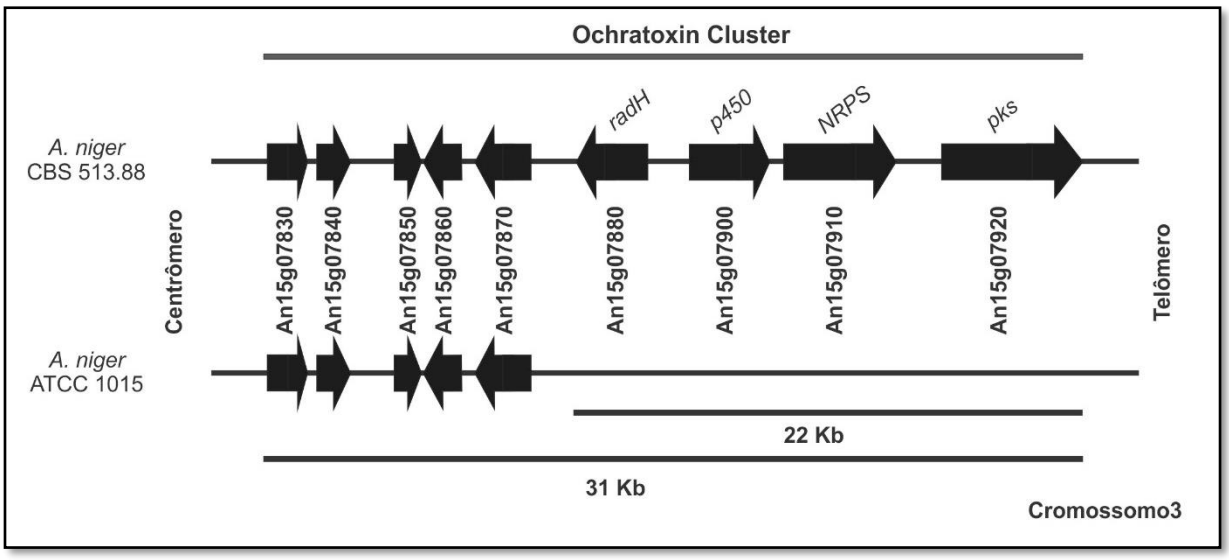
Figura 6 – Estrutura química da ocratoxina A.



Fonte: adaptado de Varga et al. (2015).

O *cluster* gênico de biossíntese da ocratoxina tem sido frequentemente estudado em diferentes espécies de *Aspergillus* produtoras desta micotoxina. Atualmente, sabe-se que o *cluster* completo da OTA na espécie *A. niger* CBS 513.88 está situado em uma região de 31 Kb na extremidade do cromossomo 3 em linhagens ocratoxigênicas e é formado por 9 genes (FERRACIN et al., 2012). Segundo estes autores, a linhagem *A. niger* ATCC 1015 não produtora de OTA apresenta uma deleção de aproximadamente 22 Kb de tamanho na região do *cluster* mais próximo ao telômero, incluindo os genes *radH* (halogenase flavina dependente), *p450* (citocromo P450), *NRPS* (peptídeo sintase não ribossomal) e *pks* (policetídeo sintase), todos com função de codificar proteínas envolvidas na síntese de OTA (Figura 7). Este mesmo padrão de deleção dos genes *radH*, *p450*, *NRPS* e *pks* foram observados em 44 linhagens de *A. welwitschiae* não produtoras de OTA analisadas por Susca et al. (2016). *A. carbonarius* ITEM 5010, altamente produtor de OTA e relacionado com a espécie *A. niger*, possui a mesma organização e a mesma direção de transcrição dos genes do *cluster* da ocratoxina.

Figura 7 – Representação esquemática do *cluster* gênico completo da biossíntese da ocratoxina A em linhagens da espécie *Aspergillus niger* (CBS 513.88 e ATCC 1015) produtora e não produtora de ocratoxina A, respectivamente. As setas indicam a direção da transcrição dos genes.



Fonte: próprio autor, no entanto, para a construção desta figura utilizou-se de informações contidas nos trabalhos de Andersen et al. (2011) e Ferracin et al. (2012).

Vários genes *pks* e *NRPS* estão presentes no genoma de *Aspergillus* e seus produtos estão diretamente envolvidos na biossíntese de muitos metabólitos secundários (PEL et al., 2007; FERRACIN et al., 2012). A expressão do gene *p450* juntamente com a expressão dos genes *pks* e *NRPS* estão diretamente envolvidas com a biossíntese da OTA nas espécies *A. ochraceus, A. niger* e *A. carbonarius.* O gene *pks AcOTApks* presente no *cluster* da OTA na linhagem ITEM 5010 de *A. carbonarius,* está relacionado com a formação do grupo policetídeo nos passos iniciais da via de biossíntese da OTA e exibe similaridade com a sequência que codifica uma *pks* na espécie *A. niger* CBS 513.88. A inativação deste gene resultou na incapacidade de produção da micotoxina, sendo possível correlacionar a expressão deste gene com a produção da micotoxina (GALLO et al., 2014). A expressão do gene *NRPS* também é necessária para a síntese desta micotoxina, pois o produto codificado por este gene é responsável pela ligação da fenilalanina no grupo policetídeo. Quando este gene, *AcOTAnrps,* foi inativado em *A. carbonarius*, a habilidade da linhagem produzir OTA foi completamente eliminada (GALLO et al., 2012).

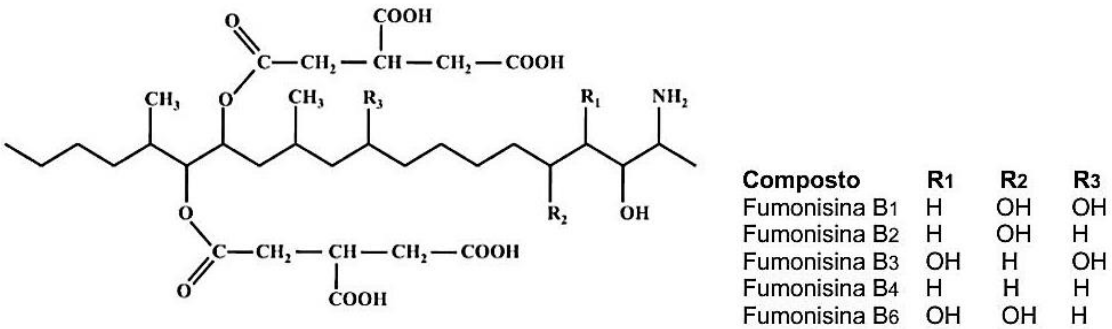
2.2.3 Fumonisinas

As fumonisinas se constituem em outra importante classe de micotoxinas derivada da família dos policetídeos. A estrutura química da molécula das fumonisinas consiste em uma cadeia linear de carbonos contendo um átomo de nitrogênio, 1 a 4 grupos hidroxilas e 2 éster tri-carboxílico em várias posições ao longo da cadeia principal de carbonos (MORETTI et al., 2013). As fumonisinas podem ser classificadas em quatro grupos, as fumonisinas séries A, B, C e P baseando-se na variação estrutural dos átomos de nitrogênio (nas fumonisinas série B é uma amina) e nas diferenças no tamanho do comprimento da cadeia de carbono (20 carbonos nas fumonisinas A, B e P e 19 carbonos nas fumonisinas C) (HUFFMAN et al., 2010; MORETTI et al., 2013). A figura 8 ilustra a estrutura química da molécula das fumonisinas.

As fumonisinas foram inicialmente descritas em 1988 em linhagens de *Fusarium verticillioides* (GELDERBLOM et al., 1988). Posteriormente, outras

espécies do gênero *Fusarium* foram descritas como capazes de produzir fumonisinas (FB_1, FB_2 e FB_3) (DESJARDINS, 2006). FB_1 é a mais estudada, mas quando comparadas quanto a suas toxicidades, FB_2 é mais citotóxica, no entanto, ambos os análogos são frequentemente encontrados em alimentos e rações. Nos últimos anos, linhagens de *Aspergillus section Nigri* pertencentes às espécies *A. niger* e *A. welwitschiae* foram identificadas como produtoras de FB_2, FB_4 e FB_6 em diversos substratos, como citado anteriormente (FRISVAD et al., 2007; NOONIM et al., 2009; MOGENSEN et al., 2010; VARGA et al., 2010; FRISVAD et al., 2011; PERRONE et al., 2011; HONG et al., 2013). As fumonisinas apresentam principalmente potencial neurotóxico, seguido do potencial nefrotóxico, hepatotóxico e carcinogênico, sendo responsável pelo surgimento de doenças como edema pulmonar em suínos, leucoencefalomalácia em equinos, hepatocarcinoma em animais de laboratório, câncer esofágico e defeitos no tubo neural em humanos (ISMAIEL e PAPENBROCK, 2015).

Figura 8 – Estrutura química das fumonisinas e posições de substituição da hidroxila.



Composto	R1	R2	R3
Fumonisina B1	H	OH	OH
Fumonisina B2	H	OH	H
Fumonisina B3	OH	H	OH
Fumonisina B4	H	H	H
Fumonisina B6	OH	OH	H

Fonte: adaptado de Susca et al. (2010).

Normalmente a presença ou ausência de um *cluster* gênico, ou de uma região deste, é essencial para determinar se um isolado fúngico é produtor ou não de determinada micotoxina. Já a existência dos diferentes análogos de uma classe de

micotoxina pode surgir devido a não finalização da via metabólica, o que contribui para a ramificação desta via e consequente produção de outra estrutura química semelhante, ou devido a variações nas funções de genes específicos dentro do *cluster* de biossíntese da micotoxina, resultando em genes funcionais em uma linhagem e não funcionais em outras, em genes presentes em uma linhagem mas ausentes em outras ou em alterações dos produtos gênicos (MORETTI et al., 2013; SUSCA et al., 2016).

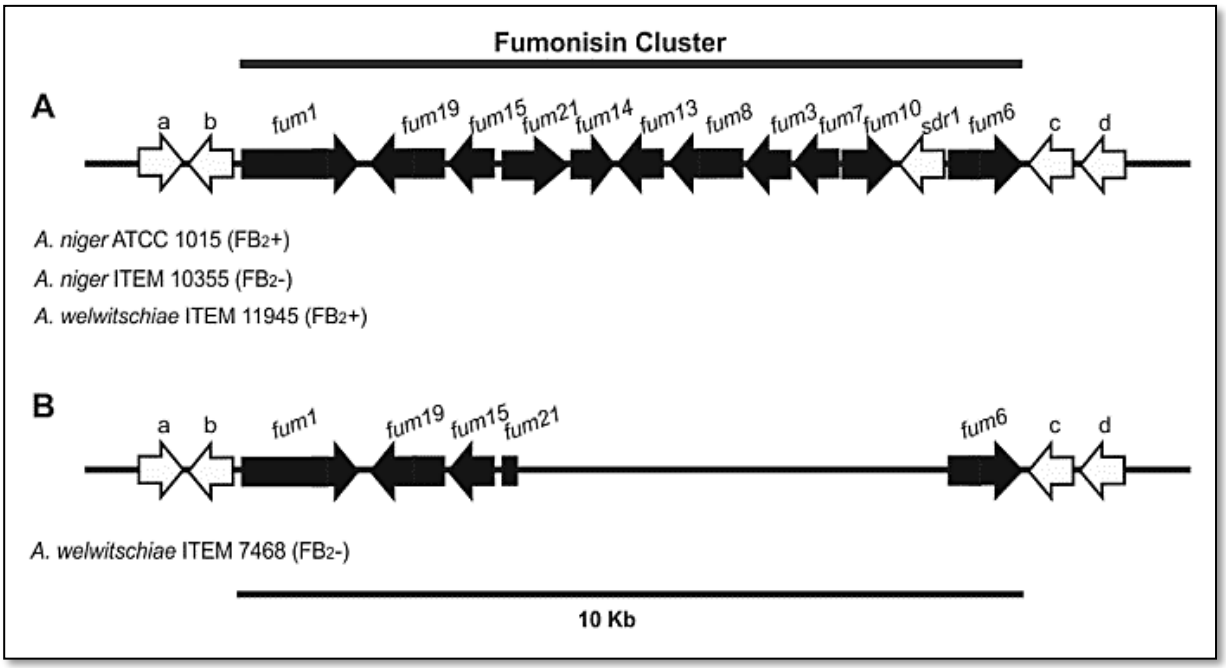
O *cluster* gênico da biossíntese de fumonisinas em linhagens de *Fusarium verticillioides* (*cluster FUM*) é composto por 17 genes que codificam enzimas, proteínas de transporte e fatores transcricionais localizado em uma região de 75 Kb (HUFFMAN et al., 2010; MORETTI et al., 2013). Já em *A. niger* e *A. welwitschiae*, as únicas espécies de *Aspergillus section Nigri* capazes de produzir os análogos das fumonisinas, o *cluster* gênico de biossíntese da fumonisinas (*cluster fum*) é composto por 11 genes homólogos aos genes presentes no *cluster FUM* de *Fusarium* localizado em uma região de 10 Kb no cromossomo 2 (SUSCA et al., 2014b).

Em *Fusarium verticillioides* o gene *FUM1* codifica uma policetídeo sintase (*pks*) necessária para a biossíntese de fumonisinas. O produto deste gene está envolvido na conversão da cadeia de carbonos de fumonisinas na molécula de acetil-CoA no início da síntese. O gene *FUM8* codifica uma α-oxoamina sintase/aminotransferase classe II que catalisa a condensação entre o aminoácido alanina e o composto acil-CoA para formar uma cadeia linear de 20 carbonos do policetídeo, sendo que a deleção deste gene *FUM8* elimina a produção de fumonisinas. Há evidências de que ambos os genes são essenciais para a produção desta micotoxina, considerando-se que linhagens mutantes para os genes *FUM1* e *FUM8* não produzem nenhum análogo das fumonisinas. O gene *FUM21* regula a expressão de todos os outros genes do *cluster,* assim como outros genes localizados externamente ao *cluster* que também influenciam na regulação da produção das fumonisinas, sugerindo que a regulação da biossíntese de fumonisinas em *F. verticillioides* é controlada por múltiplos reguladores (HUFFMAN et al., 2010; MORETTI et al., 2013).

O *cluster* gênico da biossíntese de fumonisinas em linhagens produtoras ou não produtoras de FB_2 da espécie *A. niger*, assim como linhagens produtoras de FB_2

da espécie *A. welwitschiae* possuem a mesma organização e codificam os mesmos produtos gênicos sendo formado pelos genes *fum1*, *fum19*, *fum15*, *fum21*, *fum14*, *fum13*, *fum8*, *fum3*, *fum7*, *fum10*, *fum6* e *sdr1.* No entanto, linhagens não produtoras de FB_2 da espécie *A. welwitschiae* apresentam deleções de alguns genes do *cluster*, estando presentes intactos apenas os genes *fum1*, *fum19* e *fum15* além de uma região parcial dos genes *fum6* e *fum21* (Figura 9) (SUSCA et al., 2014b). Recentemente, identificou-se na linhagem *A. welwitschiae* ITEM 10929, não produtora de FB_2, a presença de um novo padrão de organização do *cluster* gênico. Neste está presente regiões parciais e não funcionais dos genes *fum19* e *fum21* e a ausência apenas do gene *fum15* (SUSCA et al., 2016). Os genes do *cluster* codificam os seguintes produtos: policetídeo sintase (*fum1*), hidroxilases (*fum3, fum6* e *fum15*), desidrogenase (*fum7*), α-oxoamino sintase/aminotransferase (*fum8*), acil-CoA sintase (*fum10*), carbonil redutase (*fum13*), domínio de condensação de proteína (*fum14*), ABC transportador (*fum19*) e fator de transcrição (*fum21*). O *cluster fum* também possui um gene desidrogenase de cadeia curta (*sdr1*) que não tem função reportada na síntese das fumonisinas (SUSCA et al., 2014b; SUSCA et al., 2016). Os genes *FUM2*, *FUM11*, *FUM16*, *FUM17*, *FUM18* e *FUM20* estão ausentes no *cluster* da biossíntese de fumonisinas em linhagens do gênero *Aspergillus*, mas presente no *cluster* em linhagens do gênero *Fusarium*. A ausência do gene *FUM2* no *cluster* de *Aspergillus* faz com que as linhagens deste gênero sejam capazes de produzir FB_2, FB_4 e FB_6 e não os análogos FB_1 e FB_3 (*apud* SUSCA et al., 2010).

Figura 9 – (A) Representação esquemática do *cluster* gênico completo da biossíntese de fumonisinas em linhagens da espécie *Aspergillus niger* (ATCC 1015 e ITEM 10355) produtora e não produtora de fumonisina B_2, respectivamente e *Aspergillus welwitschiae* (ITEM11945) produtora de fumonisina B_2. (B) Representação esquemática do *cluster* gênico completo da biossíntese de fumonisinas em linhagens da espécie *Aspergillus welwitschiae* (ITEM 7468) não produtora de fumonisina B_2. As setas indicam a direção da transcrição dos genes.



Fonte: próprio autor, no entanto, para a construção desta figura utilizou-se de informações contidas no trabalho de Susca et al. (2014b).

Todos os 11 genes presentes no *cluster fum* de linhagens da espécie *A. niger* não produtoras de FB_2 são funcionais, não apresentam inserções ou deleções que geram mudanças no quadro de leitura ou códon de terminação prematuro. Entretanto, a linhagem *A. niger* ITEM 101355 (não produtora FB_2) apresenta a região codificante do gene *fum1* com uma pequena deleção de 12 nucleotídeos que não está presente no gene *fum1* de outras linhagens das espécies *A. niger* e *A. welwitschiae*. Como o gene *fum1* codifica uma policetídeo sintase que age no início da via de biossíntese de fumonisinas, tal mutação pode resultar em um gene não funcional e no fenótipo não produtor na linhagem *A. niger* ITEM 10355, mas não em outras linhagens da espécie *A. niger.* Outra exceção refere-se a uma substituição de base que introduziu um stop códon na região codificadora do gene *fum10* ou uma

proteína não funcional na linhagem *A. niger* ITEM 12918 não produtora de FB_2. No gênero *Fusarium* a presença do gene *FUM10* é necessária para a formação de FB_2. Outra alteração refere-se a uma substituição de base na sequência regulatória do *cluster fum* podendo causar alteração na expressão dos genes. Também acredita-se que a existência de uma mutação na região externa ao *cluster fum* possa afetar negativamente a produção de fumonisinas por atuar bloqueando a expressão de genes do *cluster*, porém, ainda não há evidências do local de ocorrência desta mutação (SUSCA et al., 2014b; SUSCA et al., 2016). Segundo estes autores, devem existir mutações em regiões gênicas não analisadas que contribuem para a existência do fenótipo não produtor de FB_2 entre as linhagens desta espécie, no entanto, ainda não se pode afirmar como ocorre a regulação dos genes presentes no *cluster* da biossíntese de fumonisinas em linhagens não produtoras da espécie *A. niger*.

Linhagens das espécies *A. niger* e *A. welwitschiae* apresentam capacidade de produção de FB_2 variável, sendo que na espécie *A. niger* o número de linhagens produtoras de FB_2 tende a ser maior, embora a quantidade da micotoxina produzida seja menor entre as linhagens. Já a espécie *A. welwitschiae* apresenta um número menor de linhagens produtoras de FB_2, porém, a quantidade desta micotoxina produzida é maior (SUSCA et al., 2014a; 2014b; MASSI et al., 2016).

2.2.4 Relatos do gênero Aspergillus em alimentos e contaminação com micotoxinas

Nos últimos anos, tem sido demonstrada com frequência, pela comunidade científica, a contaminação de diversos produtos agrícolas com espécies de *Aspergillus* e consequentemente com micotoxinas por estes produzidas, tanto na pré e pós-colheita como em etapas seguintes de armazenamento e comercialização.

Amostras de milho, trigo, arroz e amendoim coletadas em supermercados do Egito foram analisadas quanto aos níveis de contaminação fúngica e a presença de aflatoxinas. Foram encontrados oito gêneros fúngicos, sendo a incidência de cada gênero e espécie variável de acordo com o substrato. *A. flavus* e *A. niger* foram as espécies mais incidentes e encontradas em todos os substratos analisados. Dentre as amostras analisadas, 85% apresentaram-se contaminadas principalmente com

AFB_1 e AFG_1 (EL-RAHEEM et al., 2014). Silva et al. (2015) utilizando-se da taxonomia polifásica analisaram 35 linhagens de *Aspergillus section Flavi* obtidas de amostras de café, milho, amendoim, arroz, castanha do brasil e barra de cereal comercializadas no Brasil. Segundo estes autores, duas espécies aflatoxigênicas foram encontradas predominantemente, *A. flavus* e *A. parasiticus*, além das espécies não produtoras de aflatoxinas *A. oryzae*, *A. sojae* e *A. tamarii* em menor frequência.

Amostras de grãos de milho pré-colheita cultivadas na Argentina foram analisadas por Camiletti et al. (2017) e apresentaram 73% de contaminação por *Aspergillus section Flavi*. Segundo estes autores, 95% das cepas foram produtoras de aflatoxinas dos tipos B e G. Amostras de grãos de milho produzidas no Brasil e recém colhidas, foram analisadas quanto a contaminação fúngica e a presença de micotoxinas. Dentre os *Aspergillus section Flavi*, seis espécies foram encontradas: *A. novoparasiticus*, *A. arachidicola*, *A. pseudocaelatus* (todas espécies produtoras de aflatoxinas B e G, cuja descrição foi inédita neste substrado), *A. parasiticus*, *A. flavus*, além da espécie *A. tamarii* (única espécie não produtora de aflatoxina encontrada em grãos de milho). De acordo com Viaro et al. (2017) 56% das amostras estavam contaminadas com AFB_1 e AFB_2, enquanto que 25% das amostras apresentaram contaminação com AFG_1 e AFG_2. Amostras de grãos de milho, amendoim e solos de áreas agrícolas e não agrícolas da África foram analisados e apresentaram contaminação pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, frequentemente relatadas em solos e com grande potencial de contamição de produtos agrícolas e produção de aflatoxinas (KACHAPULULA et al., 2017).

Amostras de solos coletados em áreas de cultivo de amendoim na China apresentaram alta contaminação pela espécie *A. flavus* (94,2%) seguido da espécie *A. parasiticus* (5,8%), evidenciando um alto risco para a contaminação de amendoins com AFB_1 (ZHANG et al., 2017). Recentemente, Martins e colaboradores analisaram a cadeia produtiva brasileira do amendoim quanto à biodiversidade de *Aspergillus section Flavi* e a presença de aflatoxinas. *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. tamarii* e *A. caelatus* foram as espécies encontradas. A presença de aflatoxinas em diferentes estágios da cadeia produtiva do amendoim foram produzidas por linhagens de *A. parasiticus* (AFB_1, AFB_2, AFG_1 e AFG_2) e *A. flavus* (AFB_1 e AFB_2) (MARTINS et al., 2017). Amostras de amendoim coletadas nos Estados Unidos

apresentaram contaminação pelas espécies *A. flavus* (95,5%), *A. parasiticus* (3,3%) e *A. caelatus* (1,2%). Dentre as cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus* analisadas, a capacidade de produção de AFB_1, AFB_2, AFG_1 e AFG_2 apresentou níveis variáveis (FAUSTINELLI et al., 2017).

A cadeia produtiva brasileira do arroz foi analisada quanto a contaminação por *Aspergillus section Flavi* e a consequente presença de aflatoxinas por Katsurayama et al. (2018). Baseados em taxonomia polifásica as espécies *A. novoparasiticus*, *A. arachidicola* e *A. pseudocaelatus* produtoras de aflatoxinas dos tipos B e G foram relatados pela primeira vez neste substrato, além da frequente presença da espécie *A. flavus*. Segundo os autores, estas espécies foram responsáveis pela produção de aflatoxinas em amostras de arroz analisadas neste trabalho e provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Maranhão, sendo possível encontrar amostras disponível para comercialização com limites superior ao permitido pela legislação atualmente vigente no Brasil.

Baranyi et al. (2015) analisaram a ocorrência e o potencial de fungos produtores de micotoxinas contaminar vários produtos agrícolas obtidos de países da Europa Central. Utilizando-se de dados morfológicos e moleculares as seguintes espécies fúngicas foram identificadas: *A. flavus* contendo linhagens produtoras de aflatoxina do tipo B em amostras de milho, queijo, castanhas e especiarias e pela primeira vez na Europa Central as espécies *A. nomius* e *A. pseudonomius*, ambas produtoras de uma maior quantidade de AFG_1 do que AFB_1, em amostras de queijo e milho respectivamente. Outras espécies de *Aspergillus* foram detectadas em menor frequência. Prencipe et al. (2018) analisaram amostras de castanha europeia e farinha de castanha quanto a incidência de *Aspergillus section Flavi* e aflatoxinas, sendo *A. flavus* a espécie predominante, seguido das espécies *A. parasiticus*, *A. oryzae* e *A. tamarii*. Dentre as espécies aflatoxigênicas encontradas, 40% das cepas apresentaram capacidade de produzir aflatoxinas.

Lamboni e colaboradores (2016) avaliaram a ocorrência de *Aspergillus section Flavi* e *Aspergillus section Nigri* em amostras de castanha de caju e a presença de aflatoxina neste substrato. Nas 140 amostras analisadas encontrou-se alta incidência de *Aspergillus section Nigri* e *Aspergillus section Flavi*, além de outros gêneros fúngicos. *A. flavus*, *A. tamarii*, *A. minisclerotigenes* e *A. nomius* foram as espécies de *Aspergillus section Flavi* encontradas em amostras de castanha de caju

desinfectadas previamente antes das análises. Embora algumas espécies micotoxigênicas tenham sido encontradas, estas não foram capazes de produzir altos níveis de AFB_1, AFB_2, AFG_1 e AFG_2 em nenhuma das amostras obtidas neste estudo, porém estes autores não avaliaram a possível contaminação destas amostras com outras micotoxinas capazes de serem produzidas por espécies de *Aspergillus section Nigri*.

A castanha do Brasil tem mostrado ser um produto favorável à contaminação por fungos *Aspergillus section Flavi*, destacando-se a espécie *A. nomius*. A contaminação deste substrato com o fungo *A. nomius* e AFB_1 e AFG_1 foi descrita primeiramente por Olsen et al. (2008), enquanto analisavam as espécies presentes em amostras de castanhas do Brasil. Posteriormente, Gonçalves et al. (2012a) analisaram 20 amostras de castanhas do brasil coletadas na região Amazônica brasileira com relação a contaminação por *Aspergillus section Flavi* e aflatoxinas. Estes autores encontraram 241 *Aspergillus section Flavi* dos quais 41% (99/241) foram produtores de aflatoxinas. As espécies aflatoxigênicas encontradas foram: *A. flavus*, *A. bombycis, A. arachidicola* e principalmente *A. nomius*, enquanto que as espécies não produtoras de aflatoxinas encontradas foram: *A. caelatus* e *A. tamarii.*

A micobiota e consequentemente a presença de micotoxinas foram analisadas em amostras de castanha do brasil obtidas nos diferentes Estados que compõem a região Amazônica Brasileira por Reis et al. (2012). O gênero *Aspergillus* foi encontrado em 5% das amostras com casca e em 4% das amostras sem casca. Fazendo-se uso da taxonomia polifásica, *A. nomius* e *A. flavus* foram as principais espécies de *Aspergillus section Flavi* identificadas em ambos os substratos e em todas as regiões. *A. parasiticus*, *A. tamarii, A. pseudotamarii* e *A. caelatus* também foram identificados, porém em menor frequência. Segundo estes autores, todas as linhagens de *A. nomius, A. parasiticus* e *A. pseudotamarii* foram altamente produtoras de aflatoxinas dos tipos B e G, enquanto que 52% das linhagens de *A. flavus* foram produtoras apenas de AFB_1 e AFB_2. Observou-se que 95% das amostras de castanha do brasil sem casca analisadas e que foram submetidas a um processamento posterior apresentaram níveis de aflatoxina acima do limite permitido, opondo-se aos 9,5% de amostras de castanha do brasil com casca que apresentaram-se contaminadas com níveis baixos.

Utilizando-se da taxonomia polifásica *A. flavus* (*n*=136, 75,5%), *A. nomius* (*n*=40, 22,3%) e *A. parasiticus* (*n*=4, 2,2%) foram as espécies identificadas com maior frequência a partir de 180 amostras de castanhas do brasil analisadas por Baquião et al. (2013). Todas as linhagens de *A. nomius* e *A. parasiticus* produziram altos níveis de aflatoxinas do tipo B e G, enquanto que apenas algumas linhagens de *A. flavus* (*n*=36) foram produtoras somente de aflatoxina tipo B.

A partir de 288 amostras de castanhas do brasil coletadas em diferentes etapas da cadeia produtiva e analisadas por Calderari et al. (2013) quanto a incidência de contaminação fúngica e os níveis de aflatoxinas, observou-se que *A. nomius* (*n*=1235) foi a espécie aflatoxigênica mais frequente encontrada, com 100% das linhagens produzindo aflatoxinas dos tipos B_1, B_2, G_1 e G_2, enquanto que a incidência de *A. flavus* (*n*=1212) também foi elevada, mas apenas 46% das linhagens desta espécie foram produtoras de AFB_1 e AFB_2. *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii* foram espécies aflatoxigênicas encontradas em menor frequência.

Mais recentemente, Reis et al. (2014) utilizando-se da taxonomia polifásica mostraram que *A. flavus* (74,4%) seguido de *A. nomius* (12,7%) foram as principais espécies encontradas nas amostras de castanhas do brasil analisadas, sendo 14,3% as linhagens de *A. flavus* produtoras apenas de aflatoxinas do tipo B e 100% as linhagens de *A. nomius* altamente produtoras de aflatoxinas B e G. *A. caelatus* (10,6%) e *A. tamarii* (2,1%) foram as espécies não aflatoxigênicas encontradas. Já Midorikawa et al. (2014) obtiveram 137 isolados de *Aspergillus section Flavi* entre as amostras de castanhas do brasil analisadas, destacando-se *A. nomius* (43,1%) e *A. flavus* (42,3%) como as espécies mais abundantes e capazes de produzir aflatoxinas B e G e apenas aflatoxinas do grupo B, respectivamente. Somente *A. tamarii* (13,1%) foi encontrada entre as espécies não produtoras desta micotoxina.

Nosso grupo de pesquisa analisou recentemente por meio de métodos morfológicos, moleculares e bioquímicos, uma coleção de 40 linhagens morfologicamente identificadas como *A. nomius* e obtidas de amostras de castanhas do brasil. Foi observado que a maioria das linhagens analisadas realmente pertenciam à espécie *A. nomius* e eram produtoras de aflatoxinas B e G neste substrato. Entretanto, algumas linhagens foram molecularmente reidentificadas como pertentes a espécie *A. pseudonomius*. Esta foi a primeira vez que *A.*

pseudonomius produtor de AFB_1, AFB_2, AFG_1 e AFG_2 foi encontrado em amostras de castanhas do brasil, representado uma espécie em potencial, juntamente com *A. nomius* contaminando esse produto com diferentes análogas das aflatoxinas (MASSI et al., 2014).

Conforme evidenciam os vários trabalhos mencionados acima, *A. nomius* é uma importante espécie fúngica encontrada em amostras de castanhas do brasil, sendo esta espécie altamente produtora de aflatoxina neste substrato. Acredita-se que a principal fonte de contaminação deste produto ocorra ainda na floresta, após o fruto se desprender da árvore e durante o longo período subsequente em que este permanece em contato com o solo antes da colheita que ocorre após uma típica estação quente e chuvosa, além da contaminação durante o período de transporte, estocagem e comercialização do produto (BAQUIÃO et al., 2012). No entanto, outras possíveis fontes de contaminação ainda são incertas e constitui um dos objetivos deste estudo.

Muitas das espécies micotoxigênicas apresentam distribuição mundial, entretanto, outras espécies podem apresentar distribuição limitada a uma determinada região ou preferencialmente a um determinado substrato (MORETTI et al., 2013). A contaminação de amostras de grãos de café com OTA e mais recentemente com FB_2 é um problema mundial, não somente para as áreas produtoras, mas também para os países onde o produto é apenas comercializado. *A. ochraceus* foi a principal espécie isolada em amostras de café em estudos pioneiros, sendo apontada como responsável pela contaminação com OTA neste produto (VARGA et al., 1996; BAYMAN et al., 2002; SCHMIDT et al., 2004). Porém, estudos posteriores indicam que outras espécies de *Aspergillus* pertencentes à *Aspergillus section Nigri* e *Aspergillus section Circumdati* também contribuem para a produção de OTA e FB_2 em grãos de café (PERRONE et al., 2007; PANDIT et al., 2014; HASHIMOTO et al., 2015).

Perrone et al. (2007) utilizaram amostras de diferentes variedades de grãos de café obtidas da Tailândia para análise da micobiota por meio da taxonomia polifásica, e posterior análise das espécies capazes de produzir OTA neste substrato. Os resultados obtidos evidenciaram alta contaminação das amostras com *Aspergillus section Nigri*, sendo *A. niger* e *A. carbonarius* as espécies toxigênicas predominantes. Níveis similares de contaminação também foram observados com

linhagens de *Aspergillus section Circumdati*, indicando que espécies pertencentes a ambas as seções podem ser as responsáveis pela contaminação das amostras de café com OTA. Djossou et al. (2015) analisaram amostras de grãos de café da Costa do Marfim da variedade robusta após a colheita e encontraram predominantemente *Aspergillus section Nigri* (52%), destacando-se *A. carbonarius* e espécies do "agregado" *A. niger*, sendo que linhagens destas espécies foram capazes de produzir OTA neste substrato. Taniwaki et al. (2014) analisaram amostras de grãos de café variedade arábica provenientes de dois estados brasileiros (Minas Gerais e São Paulo) com relação a presença de fungos toxigênicos e a contaminação do substrato com OTA. Segundo estes autores, *A. westerdijkiae* e *Aspergillus section Nigri* foram encontradas em ambas as regiões, enquanto que *A. carbonarius* foi encontrado apenas no Estado de Minas Gerais. Todas as linhagens de *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* foram produtoras de OTA, enquanto que a produção da micotoxina variou de 0 a 23% entre as linhagens de *Aspergillus section Nigri*. Altos níveis de OTA em amostras de café provenientes das duas regiões foram detectados. Noonim et al. (2009) analisaram amostras de café (*Coffea arábica* e *Coffea canephora*) provenientes da Tailândia com relação a contaminação com fungos *black aspergilli* e fumonisinas por eles produzidos. Ambas as variedades de café apresentaram alta incidência de *Aspergillus section Nigri*, sendo que 67% destes foram produtores de FB_2 e FB_4. Estes autores descreveram pela primeira vez a contaminação de grãos de café com esta micotoxina.

Amostras de uvas e derivados tem se mostrado ser um ótimo substrato para a contaminação fúngica, principalmente por *Aspergillus section Nigri* e toxinas por eles produzidas. A contaminação de amostras de uvas destinadas à fabricação de sucos e vinhos ocorre frequentemente com espécies de *Aspergillus section Nigri*. Estudos envolvendo o uso deste substrato concentram-se em países da região do Mediterrâneo, América do Sul e Austrália e evidenciam que as espécies do "agregado" *A. niger, A. carbonarius* e *Aspergillus* unisseriados são as prevalentes em uvas (BELLÍ et al., 2006; LEONG et al., 2007; LASRAM et al., 2012; PASSAMANI et al., 2012; SPADARO et al., 2012; CHIOTTA et al., 2013; KIZIS et al., 2014; GARMENDIA e VERO, 2016). Apesar deste substrato permitir o isolamento de espécies descritas como produtoras de OTA, a capacidade de linhagens fúngicas

produzirem esta micotoxina em amostras de uvas é relativamente baixa (CHULZE et al., 2006; CHIOTTA et al., 2013).

Viticulturas localizadas em diferentes regiões da Argentina foram analisadas por Chiotta et al. (2013) com o objetivo de determinar a incidência de *Aspergillus section Nigri* e o nível de OTA presentes neste substrato. Estes autores encontraram principalmente linhagens do "agregado" *A. niger* (*A. niger* e *A. tubingensis*), *A. carbonarius* e espécies unisseriadas de *Aspergillus section Nigri*, sendo que a frequência de cada grupo variou de acordo com a região de origem da amostra. Segundo estes autores, todas as linhagens de *A. carbonarius* (*n*=70) foram produtoras de OTA, enquanto que entre os *A. niger*, 12 linhagens (*n*=36) apresentaram-se produtoras desta micotoxina. Apesar da presença de linhagens toxigênicas, o nível de OTA detectada nas amostras de uva e vinho analisadas foram baixas. Garmendia e Vero (2016) avaliaram a ocorrência e a biodiversidade de *Aspergillus section Nigri* em uvas "Tannat" destinadas a fabricação de vinhos no Uruguai, bem como a presença de OTA. Estes autores demonstraram pela primeira vez a ocorrência de *black aspergilli* em uvas "Tannat" desta região, sendo as espécies *A. welwitschiae* (48%) e *A. uvarum* (39%) as mais prevalentes, além de *A. luchuensis* (9%), *A. niger* (2%) e *A. brasiliensis* (2%). Dentre estes, apenas as linhagens de *A. welwitschiae* (64%) foram capazes de produzir níveis detectáveis de OTA.

Quarenta e oito linhagens de *Aspergillus section Nigri* obtidos de amostras de uvas foram analisadas molecularmente com relação a presença do gene *fum8* envolvido com a biossíntese da FB_2 e a capacidade de produção da respectiva micotoxina. O gene *fum8* foi detectado em 11 linhagens da espécie *A. niger*, sendo que 9 destas linhagens foram capazes de produzir a micotoxina, indicando o potencial risco de contaminação de amostras de uvas e vinho com *A. niger* portadores do gene *fum8* essencial para biossíntese da micotoxina (SUSCA et al., 2010). Chiotta et al. (2011) encontraram *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. japonicus* e *A. homomorphus* em amostras de uvas da Argentina, no entanto, apenas espécies do "agregado" *A. niger* foram capazes de produzir OTA e FB_2 neste substrato. Qi et al. (2016) analisaram 10 variedades de uvas obtidas na região do Canadá com relação a diversidade de espécies presentes e o risco de contaminação do substrato com OTA e FB_2. Estes autores encontram 253 *black aspergilli*, sendo *A.*

welwitschiae (43%), *A. uvarum* (32%), *A. brasiliensis* (11%), *A. tubingensis* (9%) e *A. niger* (4%) as espécies predominantes. Todas as linhagens de *A. niger* foram produtoras de FB_2 e apenas 26% dos *A. welwitschiae* foram capazes de produzir a micotoxina. No entanto, nenhuma linhagem analisada foi produtora de OTA neste substrato. Aproximadamente 32% das amostras de uvas apresentaram-se contaminadas com FB_2 e como esperado, nenhuma amostra estava contaminada com OTA.

Recentemente nosso grupo de estudos buscou avaliar a incidência de *Aspergillus section Nigri* em amostras de uvas destinadas a fabricação de suco obtidas de diferentes regiões brasileiras, bem como a capacidade das linhagens em produzirem OTA e FB_2 neste substrato. Utilizando-se de dados morfológicos, bioquímicos e moleculares as seguintes espécies foram encontradas: *A. japonicus, A. niger, A. welwitschiae, A. brunneoviolaceus, A. uvarum, A. aculeatus, A. vadensis, A. carbonarius* e uma nova espécie, *A. labruscus*. Dentre as linhagens encontras 3,2% foram produtoras de OTA, 40,1% das linhagens analisadas foram produtoras de FB_2 e oito linhagens do "agregado" *A. niger* foram produtoras de ambas as micotoxinas. Apesar da existência de linhagens produtoras de micotoxinas, OTA e FB_2 não foram encontradas nas amostras de uvas analisadas (FERRANTI et al., 2018).

Susca et al. (2013) usaram dados moleculares para analisar uma coleção de linhagens de *Aspergillus* obtidos de uvas passas de diversos países. *Aspergillus section Nigri* foram predominantes nestas amostras, sendo *A. tubingensis* (*n*=138), *A. welwitschiae* (*n*=38), *A. carbonarius* (*n*=27), *A. uvarum* (*n*=16) e *A. niger* (*n*=11) as principais espécies identificadas em frutas secas de diferentes localidades do mundo, indicando um risco de contaminação do substrato com OTA e FB_2.

Analisando amostras de uvas passas obtidas na Argentina, Merlera et al. (2015) encontraram 100% das amostras (*n*=50) contaminadas com *Aspergillus section Nigri*, com predominância das espécies *A. tubingensis* (35,4%), *A. carbonarius* (32,3%), *A. luchuensis* (10,7%), *A. japonicus* (7,7%), *A. niger* (6,2%), *A. welwitschiae* (4,6%) e *A. ibericus* (3,1%), sendo *A. carbonarius* a espécie responsável pela produção de OTA neste substrato e *A. niger*/*A. welwitschiae* as espécies responsáveis pela produção de FB_2.

Não só amostras de uvas passas, mas amostras de frutas secas em geral apresentam-se frequentemente contaminadas com espécies fúngicas capazes de produzir diferentes micotoxinas. Segundo Saadullah e Abdullah (2015) *A. flavus* (66,0%) e *A. parasiticus* (31,3%) são as mais frequentes espécies aflatoxigênicas encontradas neste produto, enquanto que das cinco espécies de *black aspergilli* encontradas, as mais frequentes espécies foram *A. niger* (73,4%) e *A. carbonarius* (31,3%) portadoras de linhagens capazes de produzir OTA. Azaiez et al. (2015) encontraram amostras de diversos tipos de frutas secas e tâmaras coletadas em mercados da Tunísia e Espanha contaminadas com altos níveis de diferentes micotoxinas (tâmaras 83%, uvas passas 80%, figos 64%, damasco 59% e ameixa 26%), e foram pioneiros em relatar a ocorrência simultânea de aflatoxinas e OTA em frutas secas.

Amostras de uvas e frutas secas também apresentam-se frequentemente contaminadas com fumonisinas. Mogensen et al. (2010) investigaram o potencial de produção de FB_2 e FB_4 e OTA nas linhagens de *Aspergillus section Nigri* obtidas de uvas e frutas secas provenientes de supermercados de diferentes países. Estes autores observaram que 77% das linhagens de *A. niger* foram produtoras de FB_2, mas por outro lado, nenhuma linhagem de *A. niger* produtora de OTA foi encontrada.

A cadeia produtiva do cacau foi analisada por Copetti et al. (2011) com o objetivo de avaliar a micobiota presente em amostras de cacau provenientes do Estado da Bahia (Brasil), desde os estágios inicias de produção até o produto final. Estes autores encontraram alta incidência de espécies micotoxigênicas destacando-se *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, espécies do "agregado" *A. niger*, *A. carbonarius* e outras em menor frequência, principalmente durante a etapa de secagem do produto nos estágios iniciais de produção. Este mesmo grupo sugere que a presença de diferentes espécies de *Aspergillus* no cacau possa contribuir para a contaminação deste substrato com aflatoxinas e OTA (COPETTI et al., 2010; 2014).

Produtos agrícolas provenientes da Europa Central incluindo vários tipos de cereais, cebolas, castanhas e especiarias foram analisadas por Szigeti et al. (2012) com o objetivo de examinar a ocorrência das espécies de *Aspergillus* micotoxigênicos e a capacidade de produção das micotoxinas nestes substratos. Amostras de cebolas apresentaram-se contaminadas com *A. welwitschiae* (= *A.*

awamori) produtor de OTA e FB_2. Em amostras de castanhas e especiarias, *A. westerdijkiae*, *A. welwitschiae*, *A. niger* e *A. flavus* foram as principais espécies micotoxigênicas encontradas. Linhagens de *A. flavus* produtoras de aflatoxinas foram identificadas em cereais como milho, trigo e cevada.

Amostras de bulbos de cebolas coletadas na Hungria foram analisadas quanto a micobiota presente e a contaminação por fumonisinas. Do total de amostras analisadas (*n*=6), cinco amostras apresentaram contaminação por apenas uma espécie de *black aspergilli*, *A. welwitschiae*. Linhagens desta espécie foram capazes de produzir diferentes análogos das fumonisinas nestas amostras, ainda que em pequenas quantidades (VARGA et al., 2012). Posteriormente, Gherbawy et al. (2015) analisaram 40 amostras de cebolas coletadas na Arábia Saudita. Estes autores encontraram 60 isolados fúngicos pertencentes a 10 gêneros. Os *Aspergillus section Nigri* foram encontrados em 37 amostras de cebolas e todos os isolados pertencem à espécie *A. welwitschiae*. Estas linhagens não foram produtoras de OTA, mas produziram FB_2 em 37,5% das amostras analisadas.

Grãos de milho podem favorecer o desenvolvimento de diversas espécies de *Aspergillus* e consequente produção de OTA e fumonisinas. Por isso, Soares et al. (2013) objetivaram analisar linhagens do “agregado” *A. niger* obtidas de amostras de milho coletadas em regiões portuguesas com relação aos níveis de contaminação com OTA e FB_2. Segundo estes autores, 77% das amostras analisadas apresentaram-se contaminadas com *Aspergillus section Nigri*, sendo todos pertencentes ao “agregado” *A. niger*. Entre estes isolados, 14% das linhagens foram produtoras de OTA e 39% das linhagens produtoras de FB_2, indicando um risco para a contaminação do substrato com estas micotoxinas. Logrieco et al. (2014) analisaram 17 amostras de milho coletadas na Itália Central com relação a contaminação com *Aspergillus section Nigri* e FB_2. Utilizando-se dados moleculares, *A. tubingensis* (*n*=18) e *A. welwitschiae* (*n*=12) foram as espécies identificadas, e responsáveis pela contaminação de 6% a 68% das amostras de milho analisadas. Cinco linhagens de *A. welwitschiae* foram produtoras de FB_2 e potencialmente responsáveis pela contaminação de todas as amostras com esta micotoxina.

Como relatado nestes trabalhos, é frequente a incidência do gênero *Aspergillus* em diversos alimentos, sendo que muitas das espécies fúngicas presentes nestes produtos são capazes de produzir micotoxinas, como aflatoxinas,

ocratoxinas e fumonisinas, representando desta forma, um risco à saúde humana e animal.

2.3 Marcadores moleculares para a identificação e detecção de espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus*

A identificação das mais diversas espécies de *Aspergillus* durante longo período ocorreu unicamente por meio de análises macro e micromorfológicas. Porém, nos últimos anos, as análises clássicas têm se mostrado insuficientes, pois algumas espécies foram definidas em função de diferenças observadas por métodos moleculares e bioquímicos. Atualmente, a identificação de alguns grupos de fungos exige a associação de análises morfológicas, bioquímicas e moleculares para a precisa identificação em nível de espécie (SAMSON et al., 2014). A associação de análises morfológicas, bioquímicas e moleculares para esclarecimento das relações taxonômicas de fungos tem sido denominada de “taxonomia polifásica”.

Sequências das regiões ITS (Espaços Internos Transcritos, em inglês *Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossômico (DNAr), aceitas como DNA *barcoding* para fungos (SCHOCH et al., 2012), bem como sequências parciais dos genes que codificam para as proteínas β-tubulina e calmodulina de todas as espécies de referência do gênero *Aspergillus* estão disponíveis em bancos de dados e são indicadas para auxiliar na identificação de espécies fúngicas (VARGA et al., 2011a; SAMSON et al., 2014). Apesar da região ITS ser considerada padrão ouro para identificação molecular de fungos, esta região não é suficiente para discriminar todas as espécies, pois algumas compartilham sequências idênticas ou pouco variáveis. Em função disso, sequências gênicas codificadoras das proteínas β-tubulina e/ou calmodulina são consideradas marcadores moleculares secundários necessários no processo de identificação de *Aspergillus*, pois como mencionado anteriormente, os atuais bancos de dados estão bem estabelecidos, os *loci* são relativamente fáceis de amplificar e possuem um polimorfismo adequado dentro e entre espécies (BENNEDT, 2010; SAMSON et al., 2014; *apud* VISAGIE et al., 2014a). Com menor frequência, sequências de nucleotídeos dos genes que codificam para o fator de

elongação 1-alfa (TEF-1α) e RNA polimerase II (RPB2) também vêm sendo utilizadas para auxiliar na identificação de espécies do gênero *Aspergillus*.

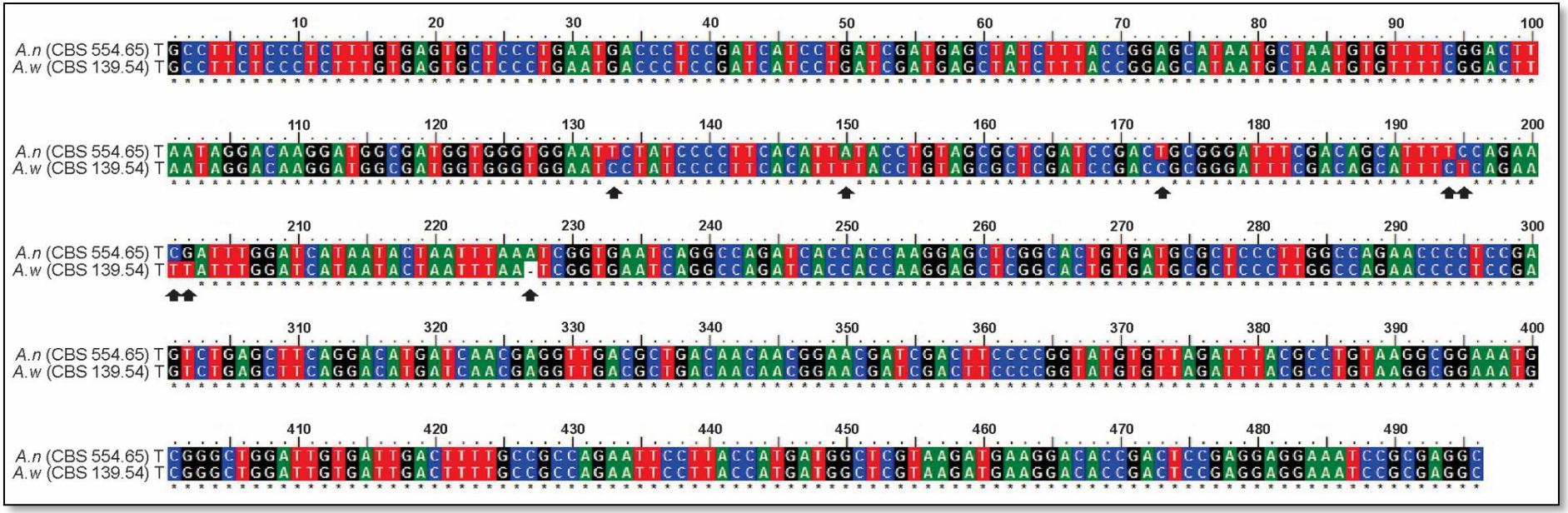
Perrone et al. (2011) analisaram as sequências gênicas *CaM*, *benA* e TEF-1α de 62 linhagens de *A. welwitschiae* (= *A. awamori sensu* Perrone), algumas linhagens de *A. niger* e algumas linhagens de outras espécies que formam o "agregado" *A. niger*. Linhagens de *A. welwitschiae* apresentaram diversidade nas sequências analisadas permitindo aos autores identificar 8 diferentes haplótipos baseados nas sequências do gene *CaM*, 4 diferentes haplótipos baseados nas sequências do gene *benA* e 11 haplótipos para o TEF-1α. Quando analisados filogeneticamente algumas linhagens representantes de *A. niger*, *A. welwitschiae* e espécies pertencentes ao "agregado" *A. niger*, com relação aos três genes mencionados anteriormente, observou-se uma considerável variabilidade entre os genes, sendo o gene *CaM* o que mostrou-se mais informativo. Segundo Perrone et al. (2011) o *amplicon* do gene *benA* possui 428 pb, sendo que após a exclusão de gaps e/ou dados perdidos, 307 pb representam nucleotídeos conservados e 109 pb são nucleotídeos variáveis. Já o *amplicon* do gene *CaM* possui 561 pb, sendo 431 pb representados por nucleotídeos conservados e 121 pb os que contém nucleotídeos variáveis. Por fim, o TEF-1α possui um *amplicon* com 666 pb, sendo 588 pb conservados e 71 pb variáveis. Considerando que *A. niger* e *A. welwitschiae* são morfologicamente muito semelhantes, a existência de SNPs (Polimorfismo de Nucleotídeo Único, em inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) entre estas duas espécies irmãs são úteis e tais análises são indispensáveis no processo de identificação (PERRONE et al., 2011). Hong et al. (2013) realizaram análises moleculares baseadas em comparações de sequência gênicas (*CaM*, *benA*, TEF-1α e RPB2) entre linhagens de *A. niger* e *A. welwitschiae* e confirmaram a eficiência do uso destas sequências no processo de identificação fúngica. Portanto, pode-se utilizar eficientemente destas sequências gênicas individualizadas ou combinadas durante o processo de identificação de *A. niger* e *A. welwitschiae*, bem como de outras espécies do gênero *Aspergillus*. Recentemente, Samson et al. (2014) realizaram um estudo de caso para *Aspergillus section Nigri* analisando inicialmente 1.500 sequências parciais do gene *CaM* disponíveis no *GenBank* contemplando todas as espécies da *section Nigri*. O alinhamento de 536 pb contendo todas estas sequências indica que 129 sequências parciais do gene *CaM* são responsáveis por

representar a diversidade existente entre as linhagens de *Aspergillus section Nigri* analisadas. As análises dos SNPs presentes nestas linhagens representantes da *section Nigri* permitiram os autores identificar somente 3 SNPs fixos para *A. welwitschiae* em relação a *A. niger* sendo as respectivas posições e bases as que seguem: 202 (T), 209 (T) e 519 (T).

A figura 10 mostra um alinhamento parcial do gene que codifica para a proteína calmodulina (fragmento de 496 pb) contendo 8 SNPs capazes de diferenciar as espécies tipos *A. niger* (CBS 554.65) de *A. welwitschiae* (CBS 139.54), sendo as respectivas posições e bases as que seguem: 133 (T/C), 150 (A/T), 173 (T/C), 194 (T/C), 195 (C/T), 201 (C/T), 202 (G/T) e 227 (A/-). O alinhamento parcial dos genes que codificam para as proteínas β-tubulina (fragmento de 418 pb) e TEF-1α (fragmento de 667 pb) possuem 2 SNPs cada para a diferenciação das espécies tipos A. *niger* (CBS 554.65/ITEM4501) de *A. welwitschiae* (CBS 139.54/ITEM4509). As respectivas posições e bases são: *benA* 257 (G/T) e 264 (T/A) e TEF-1α 10 (A/G) e 14 (G/A) (Figuras 11 e 12, respectivamente). O alinhamento parcial do gene RPB2 (fragmento de 1.000 pb) contém 13 SNPs para diferenciação das espécies tipos A. *niger* (CBS 554.65) de *A. welwitschiae* (CBS 139.54), sendo as respectivas posições e bases as que seguem: 12 (T/C), 33 (G/C), 63 (T/C), 201 (T/C), 300 (T/G), 441 (G/A), 444 (T/C), 471 (T/C), 522 (C/T), 543 (C/T), 699 (G/C), 855 (C/T) e 972 (G/T) (Figura 13).

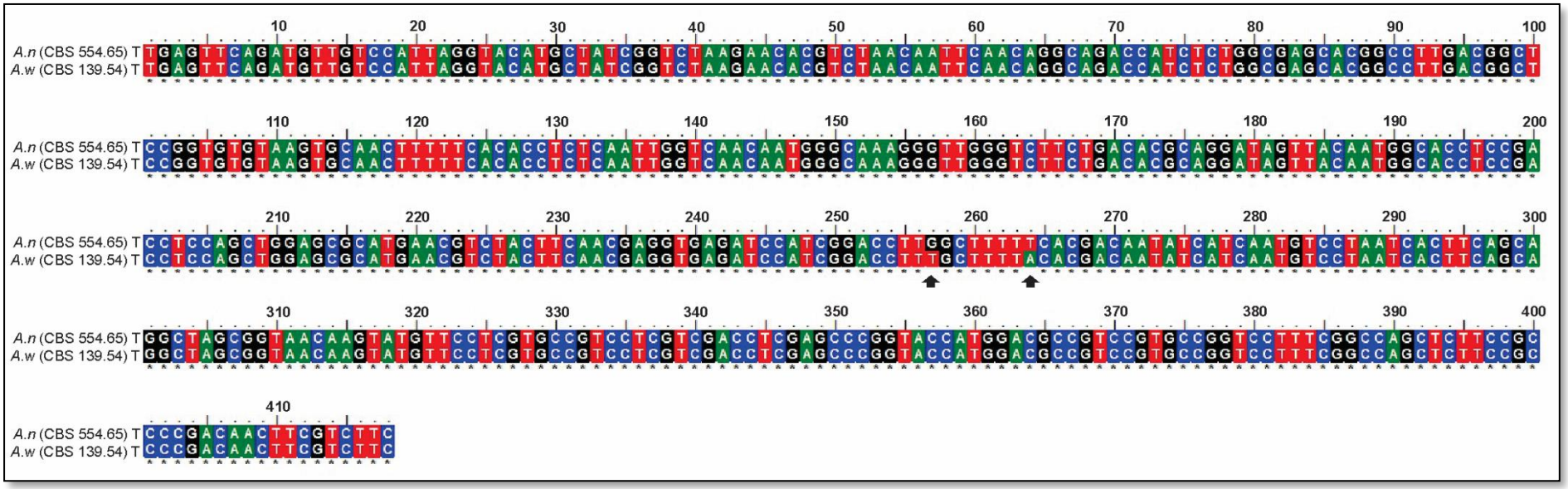
Técnicas de biologia molecular vêm sendo utilizadas para revelar marcadores moleculares uteis para a detecção de espécies ou isolados toxigênicos. A seleção de regiões do genoma que são conservadas entre os indivíduos de uma dada espécie e variáveis entre as demais espécies permitem o desenvolvimento de *primers* espécie-específico para a rápida e precisa detecção e/ou identificação de um organismo de interesse. Segundo Sartori et al. (2010), sequências de DNA anônimas, obtidas atráves de uma região aleatória do DNA genômico pelo uso de técnicas moleculares como RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism)*, sequências de genes funcionais, como *CaM*, *benA* e *pks*, além de sequências das regiões ITS do DNAr podem ser eficientemente utilizadas para o desenvolvimento de *primers* específicos para detecção de diferentes espécies toxigênicas de *Aspergillus section Nigri* (Tabela 1), *Aspergillus section Circumdati* (Tabela 2) e *Aspergillus section Flavi* (Tabela 3).

Figura 10 – Alinhamento parcial do gene da calmodulina (fragmento de 496 pb) sinalizando 8 SNPs para diferenciação das espécies tipos *Aspergillus niger* (CBS 554.65) e *Aspergillus welwitschiae* (CBS 139.54) produtoras de OTA e/ou FB_2.



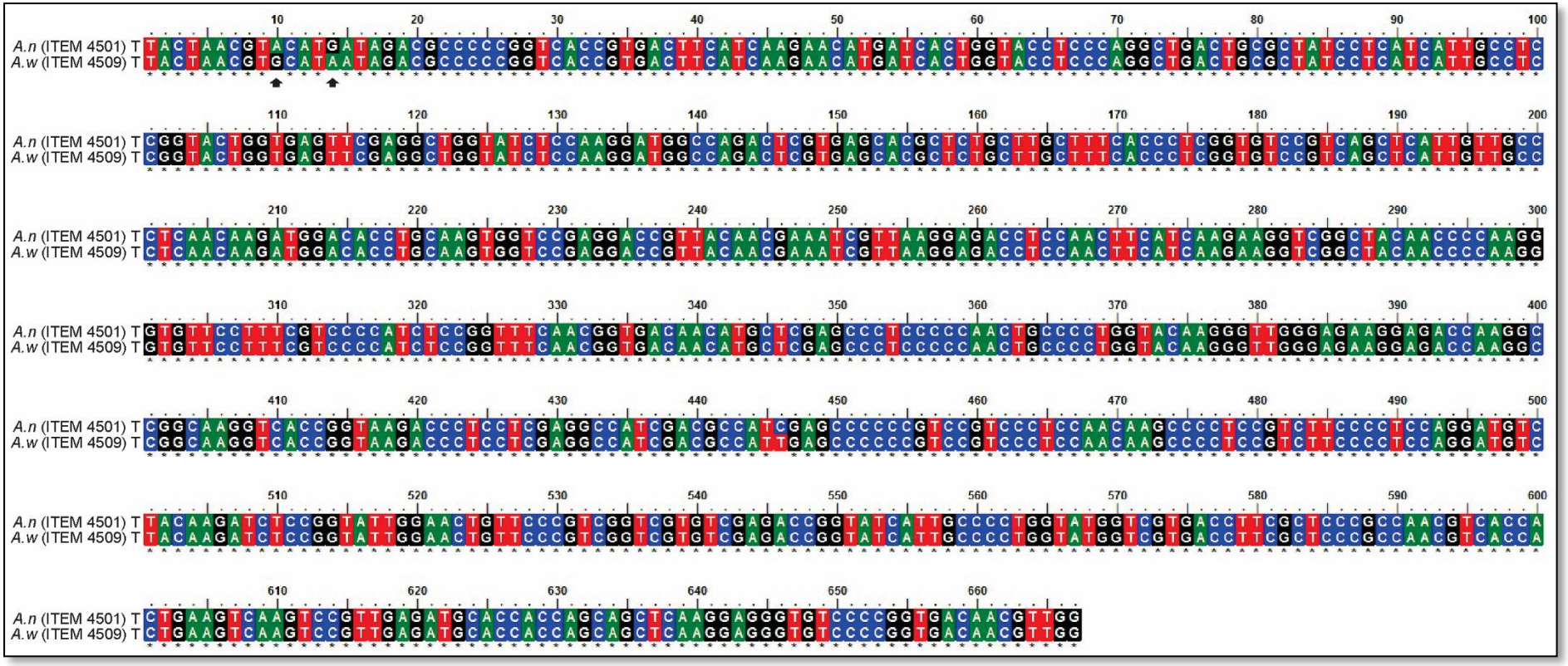
Fonte: próprio autor, no entanto, para a construção desta figura utilizou-se de informações contidas no trabalho de Perrone et al. (2011) e Hong et al. (2013).

Figura 11 – Alinhamento parcial do gene da β-tubulina (fragmento de 418 pb) sinalizando 2 SNPs para diferenciação das espécies tipos A*spergillus niger* (CBS 554.65) e *Aspergillus welwitschiae* (CBS 139.54) produtoras de OTA e/ou FB_2.



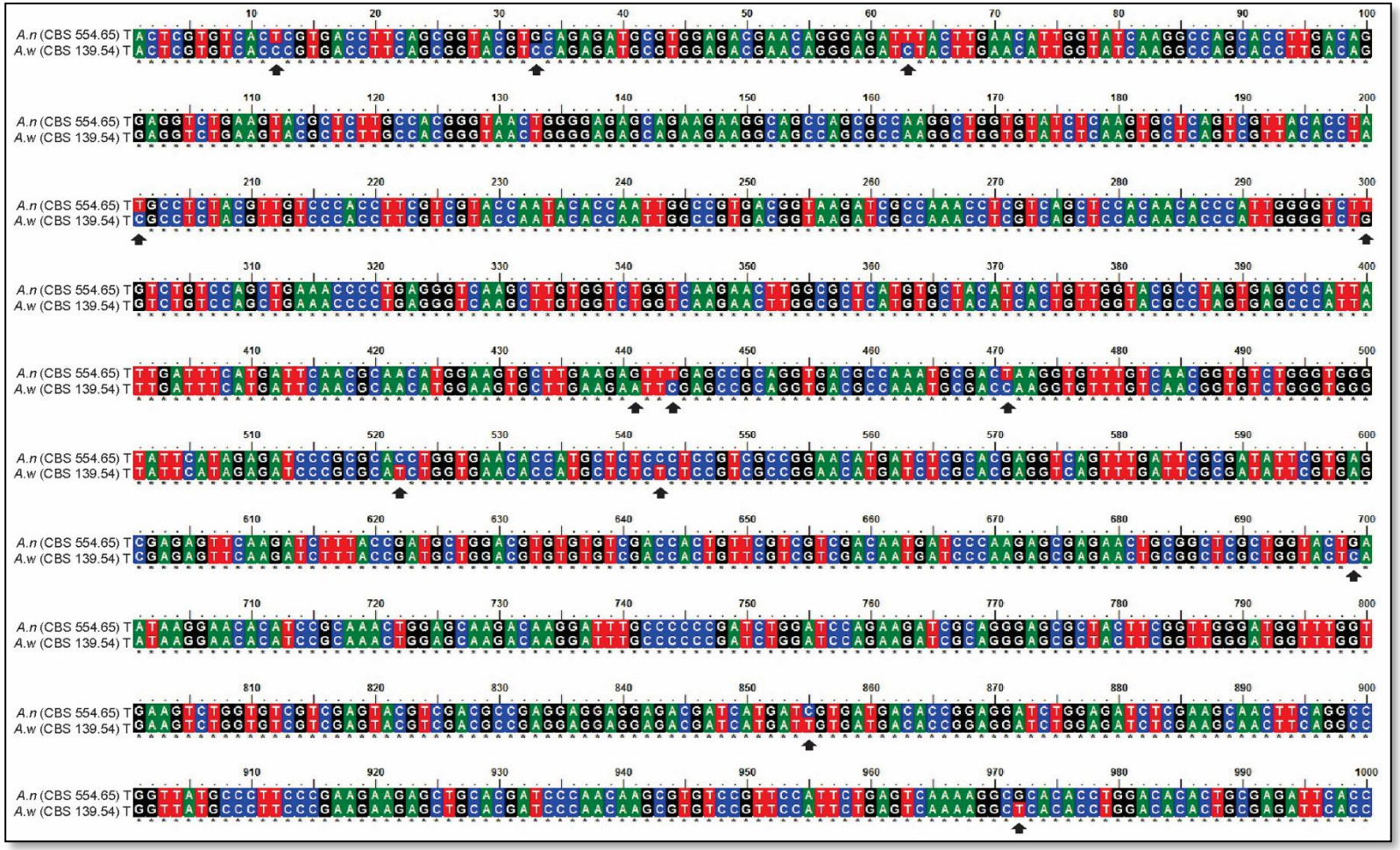
Fonte: próprio autor, no entanto, para a construção desta figura utilizou-se de informações contidas no trabalho de Perrone et al. (2011) e Hong et al. (2013).

Figura 12 – Alinhamento parcial do gene fator de elongação 1-alfa (fragmento de 667 pb) sinalizando 2 SNPs para diferenciação das espécies tipos *Aspergillus niger* (ITEM4501) e *Aspergillus welwitschiae* (ITEM4509) produtoras de OTA e/ou FB_2.



Fonte: próprio autor, no entanto, para a construção desta figura utilizou-se de informações contidas no trabalho de Perrone et al. (2011) e Hong et al. (2013).

Figura 13 – Alinhamento parcial do gene RNA polimerase II (fragmento de 1.000 pb) sinalizando 13 SNPs para diferenciação das espécies tipos *Aspergillus niger* (CBS 554.65) e *Aspergillus welwitschiae* (CBS 139.54) produtoras de OTA e/ou FB_2.



Fonte: próprio autor, no entanto, para a construção desta figura utilizou-se de informações contidas no trabalho de Perrone et al. (2011) e Hong et al. (2013).

Fungaro et al. (2004) por meio da utilização da técnica de RAPD encontraram um fragmento específico, denominado $OPX7_{809}$, para a espécie *A. carbonarius*. As sequências de nucleotídeos obtidas para esse fragmento, após a clonagem e sequenciamento do inserto, possibilitaram o desenvolvimento do par de *primer* $OPX7F_{809}$/$OPX7R_{809}$ que permite a detecção de *A. carbonarius* por meio da amplificação de um fragmento de DNA de 809 pb e a não amplificação de linhagens pertencentes a outras espécies de *Aspergillus* em amostras de café. A clonagem seguida do sequenciamento de um fragmento único encontrado para a espécie *A. niger*, também por meio da técnica de RAPD, permitiram o desenvolvimento de um par de *primer* específico ($OPX7F_{372}$/$OPX7R_{372}$) capaz de produzir um produto de amplificação de 372 pb para identificação de *A. niger*, importante espécie fúngica frequentemente encontrada contaminando amostras de café e outros alimentos com OTA (SARTORI et al., 2006).

Espécies produtoras de OTA como *A. carbonarius* e *A. ochraceus*, possuem suas variabilidades genéticas analisadas também por meio da técnica de AFLP. Fragmentos exclusivos para cada uma destas espécies foram selecionados e suas respectivas sequências de DNA anônimas foram utilizadas para o desenvolvimento de marcadores específicos para *A. carbonarius* e *A. ochraceus* em estudos realizados por Schmidt e colaboradores. A presença de produtos amplificados de 189 pb e 351 pb obtidos com os pares de *primers* A1B_fw/A1B_rv e C1B_fw/C1B_rv, respectivamente, permitem a identificação de linhagens de *A. carbonarius* (Schmidt et al., 2004). Três pares de *primers* (OCA-V/OCA-R, Ochra pA-F/Ochra pA-R e Ochra pD-F/Ochra pD-R) foram desenvolvidos para detecção de *A. ochraceus* em amostras de grãos de café naturalmente e artificialmente contaminadas com esta espécie fúngica. A especificidade do par de *primer* OCA-V/OCA-R foi avaliada e permite a identificação de linhagens de *A. ochraceus* através da detecção de *amplicons* de 260 pb e não amplificação do DNA de isolados relacionados de *Aspergillus* (Schmidt et al., 2003).

Utilizando-se o alinhamento de sequências do gene *CaM*, marcadores específicos foram desenvolvidos para identificação e/ou detecção de diversas espécies de *Aspergillus* produtores de micotoxinas. Perrone et al. (2004) fazendo uso de sequências do gene *CaM*, desenvolveram pares de *primers* espécie-específico para detecção de linhagens de *A. carbonarius* produtoras de OTA e

linhagens de *A. japonicus* não produtoras de micotoxinas. Segundo estes autores, o par de *primer* CARBO1/CARBO2 produz um *amplicon* de 371 pb e pode ser eficientemente utilizado para detecção da espécie *A. carbonarius*. Visando detectar e quantificar *A. carbonarius* produtor de OTA em amostras de uvas, Mulè et al. (2006) desenvolveram o par de *primer* (CARBO_q1/CARBO_q2) específico para *A. carbonarius* e passível de ser utilizado por meio da técnica de PCR em tempo real, pois produz um *amplicon* de aproximadamente 160 pb.

Primers forward específicos para as espécies *A. niger* (nigspec) e *A. welwitschiae* (*awaspec*) foram desenvolvidos por Gherbawy et al. (2015). Segundo estes autores, o uso de cada um destes *primers forward* em conjunto com o *primer* cmd6 *reverse* desenvolvido por Hong et al. (2006) permitem a precisa identificação das espécies *A. niger* e *A. welwitschiae*, respectivamente. Palumbo e O´Keeffe (2015) utilizaram sequências do gene *CaM* para o desenvolvimento de *primers* espécie-específico para precisa identificação das espécies *A. niger*, *A. welwitschiae* e *A. carbonarius* produtoras de micotoxinas e *A. tubingensis* não produtora de micotoxinas, mas todas espécies frequentemente encontradas em alimentos. Normalmente, sequências do gene *CaM* contêm sete SNPs que permitem a diferenciação das espécies *A. niger* e *A. welwitschiae*, sendo tais diferenças utilizadas pelos autores para o desenvolvimento dos pares de *primers*. Os *primers forward* específicos para *A. niger* (An F) e *A. welwitschiae* (Aw F) contém ambos 2 bases na região 3’ e 2 bases internamente que são específicos para cada espécie, enquanto que uma diferença na última base da região 3’ dos *primers reverse* (An R/Aw R) torna-os espécie-específico para *A. niger* e *A. welwitschiae* respectivamente. *A. tubingensis* e *A. carbonarius* são espécies mais divergentes possuindo um maior número de bases específicas nos pares de *primers* desenvolvidos (At F/At R e Ac F/Ac R). Linhagens da espécie *A. niger* quando amplificados por esse par de *primer* (An F/An R) produz um *amplicon* de 357 pb, os pares de *primers* Aw F/Aw R, At F/At R e Ac F/Ac R produzem *amplicons* de 357 pb, 215 pb e 252 pb, respectivamente. Apesar de *A. tubingesis* não ser espécie produtora de micotoxinas, estes autores desenvolveram um marcador específico para *A. tubingensis* por ser uma espécie frequentemente encontrada em alimentos.

A. niger e/ou *A. welwitschiae*, espécies portadoras de linhagens capazes de produzir OTA e FB_2 simultanemente em diferentes alimentos, podem ser

eficientemente identificados utilizando sequências do gene que codifica para a proteína β-tubulina. Segundo Massi et al. (2016), o par de *primer benA*-An/Aw-F/*benA*-An/Aw-R foi desenvolvido para detecção das espécies *A. niger* e/ou *A. welwitschiae* simultaneamente. Os autores confirmaram a especificidade do par de *primer* por meio da amplificação de um produto de 192 pb do DNA de *A. niger* e/ou *A. welwitschiae* isolados de amostras de frutas secas, castanha do brasil, grãos de café, uvas, cacau e cebolas e a não amplificação do DNA de outras espécies de *Aspergillus section Nigri*. *A. westerdijkiae* é uma espécie irmã desmembrada a partir de *A. ochraceus* e produtora de altos níveis de OTA em diversos alimentos. Considerando-se que a distinção entre *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* passou a ser necessária, sequências do gene *benA* foram utilizadas por Morrello e colaboradores para o desenvolvimento de um marcador exclusivo para linhagens de *A. westerdijkiae*. Segundo Morello et al. (2007) a amplificação do DNA de *A. westerdijkiae* com o par de *primer* Bt2Aw-F/Bt2Aw-R, produz um *amplicon* de 347 pb permitindo a detecção e quantificação da espécie por meio da técnica de PCR em tempo real em amostras de grãos de café.

Existem vários genes *pks* encontrados em diversas regiões no genoma fúngico e frequentemente estes genes estão envolvidos com a biossíntese de metabólitos secundários, incluindo micotoxinas (PEL et al., 2007; FERRACIN et al., 2012). Diante disto, trabalhos foram desenvolvidos utilizando-se de sequências de genes *pks* para o desenvolvimento de marcadores espécie-específico para detecção de linhagens toxigênicas de *Aspergillus*. Para a detecção de *A. ochraceus*, produtor de OTA, Dao et al. (2005) desenvolveram o par de *primer* AoOTA-L/AoOTA-R, a partir de sequências de um gene *pks* (AoLC35-12 domínio KS – *β-ketoacyl synthase*) presente no *cluster* de biossíntese de OTA na linhagem *A. ochraceus* NRRL 3174, que produz um produto de amplificação de 690 pb apenas em linhagens da espécie *A. ochraceus* produtoras de OTA. É importante lembrar que alguns pares de *primers* ditos específicos para *A. ochraceus* podem amplificar linhagens pertencentes às espécies *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*, pois são espécies muito próximas que foram desmembradas após muitos estudos já terem sido realizados.

Posteriormente, com o objetivo de monitorar e quantificar a contaminação de amostras de uvas e outros substratos com a espécie *A. carbonarius* e a provável

contaminação com OTA, vários autores desenvolveram pares de *primers* espécificos para esta importante espécie fúngica. Atoui et al. (2007) fazendo uso de sequências do gene *pks* (Ac12RL3 domínio AT – *acyl transferase*) desenvolveram um par de *primer* (Ac12RL_OTAF/Ac12RL_OTAR) capaz de amplificar uma região de 141 pb em *A. carbonarius* e não gerar produto de amplificação em isolados de outras espécies. Este par de *primer* foi utilizado eficientemente pelos autores na técnica de PCR em tempo real para quantificar *A. carbonarius* produtor de altos níveis de OTA em amostras de uvas. Selma et al. (2008) fazendo uso de sequências do gene *pks* (AcKS10 domínio KS - *β-ketosynthase domain*) desenvolveram um par de *primer* (AcKS10L/AcKS10R) capaz de produzir um produto de amplificação de 161 pb específico para *A. carbonarius*, passível de ser utilizado para detecção desta espécie de forma rápida e sensível por meio da técnica de PCR em tempo real. Fazendo uso do par de *primers* Acpksfor/Acpksrev2, Rossi et al. (2010) detectaram um *amplicon* de 330 pb referente a amplificação de uma região do gene *pks* (AcPKS domínio KS - *β-ketosynthase domain*) em linhagens toxigenicas de *A. carbonarius* a partir de amostras de uvas analisadas. Linhagens produtoras de OTA pertencentes a espécie *A. carbonarius* também podem ser amplificadas utilizando o par de *primer* AcPKS-F1/AcPKS-R1 capaz de produzir um produto de amplificação de 186 pb referente a amplificação de uma região do gene *pks* (AcPKS domínio KS – β-*ketosynthase domain*) e a não amplificação de linhagens produtoras de OTA pertencentes a outras espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (SPADARO et al., 2011).

Estudando diferentes genes *pks* presentes no genoma de *A. niger*, Ferracin et al. (2012) desenvolveram marcadores espécie-específico para linhagens toxigenicas desta espécie. Os pares de *primers* PKS15KS-F/PKS15KS-R e PKS15C-Met-F/PKS15C-Met-R, desenvolvidos a partir da análise das regiões dos domínios KS e C-MeT (*C-methyltranferase*) do gene *pks* (An15g07920), produzem um produto de amplificação de 776 pb e 998 pb, respectivamente em linhagens de *A. niger* produtoras de OTA e não são capazes de amplificar o DNA de linhagens de *A. niger* não produtoras desta micotoxina. Linhagens de *A. niger* também são produtoras de FB_2 em diversos alimentos, por isso Palumbo et al. (2011) usaram sequências do gene *pks* presente no *cluster* de biossíntese de FB_2 para desenvolverem um par de

primer (fum1.2f/fum1.2r) capaz de amplificar um fragmento de DNA de 557 pb permitindo a identificação de isolados de *A. niger* em amostras de uvas passas.

Linhagens de *A. niger/A. welwitschiae* podem ser identificadas simultaneamente utilizando pares de *primers* específicos desenvolvidos a partir de sequências do gene *pks* (An15g07920 domínio AT – *acyl transferase*) envolvido com a biossíntese de OTA. O par de *primer* (ANPKS-F/ANPKS-R) específico para detecção de *A. niger/A. welwitschiae* produz um fragmento de amplificação de 951 pb (CASTELLÁ e CABAÑES, 2011). Os fragmentos obtidos a partir das amplificações de diferentes linhagens de *A. niger/A. welwitschiae* com esse par de *primer* (ANPKS-F/ANPKS-R) foram clonados e sequenciados. As respectivas sequências de nucleotídeos foram utilizadas por estes autores para desenvolver um novo par de *primer* (ANPKSFRT/ANPKSRRT) capaz de produzir um fragmento de 120 pb referente a amplificação de uma região do gene *pks* (An15g07920) em linhagens de *A. niger/A. welwitschiae*. Estes autores reportaram pela primeira vez o uso de um par de *primer* que permite a rápida e sensível detecção e quantificação de espécies de *A. niger/A. welwitschiae* produtoras de OTA por meio da técnica de PCR em tempo real (CASTELLÁ e CABAÑES, 2011). Por fim, espécies que contemplam o “agregado” *A. niger* podem ser detectadas por meio do par de *primer* AtNig1/AtNig2 capaz de produzir um *amplicon* de 120 pb referente a amplificação de uma região do gene *pks* (domínio AT– *acyl transferase*) e a não amplificação de outras espécies de *Aspergillus section Nigri* (SELMA et al., 2009).

Sequências de nucleotídeos da região ITS do DNAr também foram eficientemente utilizadas para desenvolver pares de *primer* específicos para detecção de espécies do gênero *Aspergillus* produtoras de micotoxinas. O par de *primer* OCRA1/OCRA2 está localizado a partir da posição 76 da região ITS1 e posição 462 da região ITS2 respectivamente, permitindo desta forma, a amplificação de um fragmento de 400 pb somente em linhagens da espécie *A. ochraceus*, enquanto que o par de *primer* CAR1/CAR2, localizados nas posições 91 e 480 respectivamente, permitem a amplificação de um fragmento de 420 pb somente em linhagens da espécie *A. carbonarius* (PATIÑO et al., 2005). González-Salgado et al. (2009) analizaram sequências da região ITS de DNAr de diversas espécies de *Aspergillus section Nigri* e desenvolveram um par de *primer* espécie-específico (QCARBO1/QCARBO2) capaz de amplificar um fragmento de 66 pb na região ITS2

somente em linhagens de *A. carbonarius,* podendo ser eficientemente utilizado para detecção da espécie por meio da técnica de PCR em tempo real. O par de *primer* AcITSfor2/AcITSrev1 permite a amplificação de um fragmento de 239 pb somente em linhagens da espécie *A. carbonarius* (Rossi et al., 2010). De acordo com os autores, o uso conjunto dos *primers* AcITSfor2/AcITSrev1 e Acpksfor/Acpksrev2 (citado anteriormente) em uma única reação de PCR multiplex, pode ser eficientemente utilizado para a detecção de linhagens da espécie *A. carbonarius* produtoras de OTA diretamente em amostras de uvas. González-Salgado et al. (2005) utilizaram sequências da região ITS do DNAr e desenvolveram pares de *primers* espécie-específicos para *A. niger* e outras espécies de *Aspergillus section Nigri* não produtoras de micotoxinas. Segundo os autores, o uso do par de *primer* ITS1/NIG-R permite a detecção somente de linhagens da espécie *A. niger* por meio da presença de um produto de amplificação de 420 pb.

A fim de detectar diferentes espécies de *Aspergillus section Circumdati* produtoras de OTA e frequentemente encontradas contaminando simultaneamente vários substratos, Gil-Serna et al. (2009) fazendo uso da região ITS do DNAr, desenvolveram pares de *primers* específicos para detecção de *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* e *A. steynii.* O par de *primer* STEYF/STEYR produz um *amplicon* de 315 pb específico para linhagens da espécie *A. steynii*, enquanto que os pares de *primers* OCRAF/OCRAR e WESTF/WESTR produzem ambos um *amplicon* de 430 pb referente ao fragmento que permite a identificação das espécies *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*, respectivamente.

Espécies de *Aspergillus section Flavi* produtoras de aflatoxinas também contaminam frequentemente diversos substratos, no entanto, marcadores específicos para identificação das espécies pertencentes a esta seção são escassos, e limitam-se a detecção de *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* consideradas as principais espécies aflatoxigênicas encontradas em alimentos.

González-Salgado et al. (2008) utilizaram sequências de nucleotídeos da região ITS do DNAr para desenvolver um marcador específico para *A. flavus*. O par de *primer* FLA1/FLA2 permite a amplificação de uma região de 500 pb no DNA genômico de *A. flavus*, sendo capaz de detectar linhagens desta espécie em amostras de farinha de trigo de diferentes marcas comerciais. O par *de primer* A.flav-For/A.flav-Rev permite a amplificação da região ITS1 somente em linhagens de *A.*

flavus, podendo este *primer* espécie-específico ser eficiente utilizado para detecção de *A. flavus* por meio da técnica de PCR em tempo real (WALSH et al., 2011). Shweta et al. (2013) utilizando sequências do gene *O-methyltransferase* (*omt-A*), que codifica uma enzima chave na biossíntese da AFB_1, desenvolveram um par de *primer* espécie-específico para detecção de linhagens de *A. flavus* produtoras e não produtoras de micotoxinas. Segundo estes autores, os *primers* omt-F/omt-R produzem um *amplicon* de 300 pb e podem ser eficientemente utilizados para detecção da espécie *A. flavus* em amostras de milho artificialmente contaminadas e não são capazes de produzir um produto de amplificação em amostras deste substrato não contaminadas com esta importante espécie fúngica. Linhagens de *A. flavus* também podem ser detectadas utilizando o par de *primer* (F-omt/R-omt) capaz de produzir um produto de amplificação de 123 pb referente a amplificação de uma região conservada do gene *omt-A* e passível de ser utilizado na técnica de PCR em tempo real (RODRIGUEZ et al., 2012). Em amostras de farinha de trigo, a espécie *A. parasiticus* também é frequentemente encontrada, por isso Sardiñas et al. (2010) utilizando-se do alinhamento de sequências da região ITS do DNAr de *Aspergillus*, desenvolveram o par de *primer* (PAR1/PAR2) capaz de produzir um fragmento de amplificação de aproximadamente 430 pb altamente específico e sensível para detectar e quantificar linhagens de *A. parasiticus* em amostras de farinha de trigo artificialmente contaminadas. Posteriormente, Sardiñas et al. (2011), utilizando-se de sequências de nucleotídeos da região ITS, desenvolveram pares de *primers* espécie-específicos para identificação de *A. flavus* e *A. parasiticus*. Os *primers* FLAVIQ1/FLAQ2 específicos para *A. flavus* e FLAVIQ1/PARQ2 específicos para *A. parasiticus* produzem um fragmento de 100 pb cada, sendo indicados para diferenciação e quantificação destas duas espécies aflatoxigênicas em amostras de farinha de trigo por meio da técnica de PCR em tempo real.

Recentemente, um par de *primer* espécie-específico para *A. nomius* foi desenvolvido por Massi et al. (2015) utilizando-se do alinhamento de sequências do gene *benA* das espécies que contemplam o Clado *A. nomius*. Segundo estes autores, o par de *primer* BtubNomF/BtubNomR permite a amplificação do DNA de *A. nomius*, produzindo um *amplicon* de 185 pb. Este par de *primer* foi eficientemente utilizado para detecção de *A. nomius* em visitantes florais da castanheira do brasil

pertencentes as espécies *Xylocopa frontalis*, *Bombus transversalis*, *Centris denudans*, *C. ferrugínea* e *Epicharis flava*.

Considerando-se a presença frequente de espécies produtoras de aflatoxinas, ocratoxinas e fumonisinas em diversos produtos destinados à alimentação humana e/ou animal, a necessidade de controlar eficientemente os níveis de contaminação fúngica e a presença de micotoxinas nos alimentos, além da importância de utilizar-se na indústria de alimentos linhagens de *Aspergillus* não produtoras de micotoxinas, a precisa identificação de fungos toxigênicos nos mais variados alimentos destinados ao consumo interno ou a exportação é importante e necessária. Diante disto, técnicas moleculares podem auxiliar nos procedimentos de avaliação da qualidade do produto ofertado, possibilitando predizer a possível contaminação do alimento com fungos e micotoxinas.

Tabela 1 - Sequências de *primers* utilizadas para detecção de espécies toxigênicas de *Aspergillus section Nigri*.

Espécie	Utilidade	Região alvo	Par de *primer*	Referência
A. carbonarius	Detecção espécie-específico	Marcador RAPD	($OPX7F_{809}$) F5' AGG CTA ATG TTG ATA ACG GAT GAT ($OPX7R_{809}$) R5' GCT GTC AGT ATT GGA CCT TAG AG	Fungaro et al. (2004)
		Marcador AFLP	(A1B_fw) F5' GAA TTC ACC ACA CAT CAT AGC (A1B_rv) R5' TTA ACT AGG ATT TGG CAT TGA AC	Schmidt et al. (2004)
		Marcador AFLP	(C1B_fw) F5' GAA TTC ACG GTG CTC GAC CC (C1B_rv) R5' TTA ACT GCT GGC GGA AGA GGC	Schmidt et al. (2004)
		Gene *CaM*	(CARBO_q1) F5' CCG ATG GAG GTC ATG ACA TGA (CARBO_q2) R5' AAT GCG AAC CGG ATA TTA ACT TCT G	Mulè et al. (2006)
		Gene *CaM*	(Ac F) F5' AGC CGT TTT CCA AGC GAC TTG AGC (Ac R) R5' CCT CGT GTG AAC ACA AGC CCG C	Palumbo e O´Keeffe (2015)
		Gene *CaM*	(CARBO1) F5' AAG CGA ATC GAT AGT CCA CAA GAA TAC (CARBO2) R5' TCT GGC AGA AGT TAA TAT CCG GTT	Perrone et al. (2004)
		Região ITS	(CAR1) F5' GCA TCT CTG CCC CTC GG (CAR2) R5' GTT GGA GTT GTC GGC AG	Patiño et al. (2005)
		Região ITS	(QCARBO1) F5' GGG CTT TGT CAC ATG CTC TGT A (QCARBO2) R5' CTG GAA AAA AAG GTT GGA GTT GTC	González-Salgado et al. (2009)
		Região ITS	(AcITSfor2) F5' GTG AAG TCT GAG TCG ATT GTT (AcITSrev1) R5' GGA AAA AAA GGT TGG AGT T	Rossi et al. (2010)
		Gene *pks*	(Ac12RL_OTAF) F5' AAT ATA TCG ACT ATC TGG ACG AGC G (Ac12RL_OTAR) R5' CCC TCT AGC GTC TCC CGA AG	Atoui et al. (2007)
		Gene *pks*	(AcKs10L) F5' CCG GCC TTA GAT TTC TCT CAC C (AcKs10R) R5' CCC TGA TCC TCG TAT GAT AGC G	Selma et al. (2008)
		Gene *pks*	(Acpksfor) F5' GCA GCG GGA GTC AAT GTA AT (Acpksrev2) R5' GCG TCG TAC AAA GCC TCT T	Rossi et al. (2010)

(continuação na próxima página)

Tabela 1 (continuação)

Espécie	Utilidade	Região alvo	Par de *primer*	Referência
A. carbonarius	Detecção espécie-específico	Gene *pks*	(AcPKS-F1) F5' AGC ATC TAT GCT GGC CAA TC (AcPKS-R1) R5' AAT GTA CTC TCG CGG GCT AA	Spadaro et al. (2011)
		Marcador RAPD	($OPX7F_{372}$) F5' CAG TCG TCC AGT ACC CTA AC ($OPX7R_{372}$) R5' GAG CGA GGC TGA TCT AAG TG)	Sartori et al. (2006)
		Gene *CaM*	(nigspec) F5' GAC AGC ATT TTC CAG AAC GA (cmd6) R5' CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG	Gherbawy et al. (2015); Hong et al. (2006)
		Gene *CaM*	(An F) F5' GGA TTT CGA CAG CAT TTT CCA GAA CG (An R) R5' GAT AAA ACC ATT GTT GTC GCG GTC G	Palumbo e O´Keeffe (2015)
A. niger	Detecção espécie-específico	Região ITS	(ITS1) F5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G (NIG-R) R5' CCG GAG AGA GGG GAC GGC	White et al., 1990 González-Salgado et al. (2005)
		Gene *pks*	(PKS15KS-F) F5' CAA TGC CGT CCA ACC GTA TG (PKS15KS-R) R5' CCT TCG CCT CGC CCG TAG	Ferracin et al. (2012)
		Gene *pks*	(PKS15C-Met-F) F5' GCT TTC ATG GAC TGG ATG (PKS15C-Met-R) R5' CAT TTC GTT GAT CCC ATC G	Ferracin et al. (2012)
		Gene *pks*	(fum1.2f) F5' CCA TCG TGG GAT CTC AGA GAT G (fum1.2r) R5' CGC CAA TGT CAA GCA TAT GGT C	Palumbo et al. (2011)
		Gene *benA*	(benA-An/Aw-F) F5' TGG GCA AAG GGT TGG GTC TT (benA-An/Aw-R) R5' ACG AGG ACG GCA CGA GGA	Massi et al. (2016)
A.niger/A.welwitschiae	Detecção espécie-específico	Gene *pks*	(ANPKS-F) F5' CGA CGA CTA ATC GCA AGT CA (ANPKS-R) R5' CAT CGT TGC TCA TAG GGG TT	Castellá e Cabañes (2011)
		Gene *pks*	(ANPKSFRT) F5' TCT CTC GGC AGG CAG CAT (ANPKSRRT) R5' CAC TCG CTC CAG TTG ATG GA	Castellá e Cabañes (2011)
"agregado" *A. niger*	Detecção espécie-específico	Gene *pks*	(AtNig1) F5' GAC TGA GCC CAG ATG ACC TAC A (AtNig2) R5' CGC TGT CGC CGG ATA CTG	Selma et al. (2009)

(continuação na próxima página)

Tabela 1 (continuação)

Espécie	Utilidade	Região alvo	Par de *primer*	Referência
A. welwitschiae	Detecção espécie-específico	Gene *CaM*	(awaspec) F5' ATT TCG ACA GCA TTT CTC AGA ATT A (cmd6) R5' CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG	Gherbawy et al. (2015); Hong et al. (2006)
		Gene *CaM*	(Aw F) F5' GGG ATT TCG ACA GCA TTT CTC AGA ATT (Aw R) R5' GAT AAA ACC ATT GTT GTC GCG GTC A	Palumbo e O´Keeffe (2015)

Tabela 2 - Sequências de *primers* utilizadas para detecção de espécies toxigênicas de *Aspergillus section Circumdati.*

Espécie	Utilidade	Região alvo	Par de *primer*	Referência
A. ochraceus	Detecção espécie-específico	Marcador AFLP	(OCA-V) F5' ATA CCA CCG GGT CTA ATG CA (OCA-R) R5' TGC CGA CAG ACC GAG TGG ATT	Schmidt et al. (2003)
		Marcador AFLP	(Ochra pA-F) F5' TTA ACA GGG AAC AAT CCA TAT AG (Ochra pA-R) R5' GAA TTC ACC CAG AAC TTG CCG	Schmidt et al. (2003)
		Marcador AFLP	(Ochra pD-F) F5' TTA ACA GGC ACC GGA GAC ATA GTT AG (Ochra pD-R) R5' TTA ACA GAT TTG AGA ACC CCA TTC	Schmidt et al. (2003)
		Região ITS	(OCRA1) F5' CTT CCT TAG GGG TGG CAC AGC (OCRA2) R5' GTT GCT TTT CAG CGT CGG CC	Patiño et al. (2005)
		Região ITS	(OCRAF) F5' CTT TTT CTT TTA GGG GGC ACA G (OCRAR) R5' CAA CCT GGA AAA ATA GTT GGT TG	Gil-Serna et al. (2009)
		Gene *pks*	(AoOTA-L) F5' CAT CCT GCC GCA ACG CTC TAT CTT TC (AoOTA-R) R5' CAA TCA CCC GAG GTC CAA GAG CCT CG	Dao et al. (2005)
A. westerdijkiae	Detecção espécie-específico	Gene *benA*	(Bt2Aw-F) F5' TGA TAC CTT GGC GCT TGT GAC G (Bt2Aw-R) R5' CGG AAG CCT AAA AAA TGA AGA G	Morello et al. (2007)
		Região ITS	(WESTF) F5' CTT CCT TAG GGG TGG CAC AG (WESTR) R5' CAA CCT GAT GAA ATA GAT TGG TTG	Gil-Serna et al. (2009)
A. steynii	Detecção espécie-específico	Região ITS	(STEYF) F5' CCA CGC GGC CGC CGG GGG AG (STEYR) R5' CGG GGG GGA CGA GGA CCC AAC	Gil-Serna et al. (2009)

Tabela 3 - Sequências de *primers* utilizadas para detecção de espécies toxigênicas de *Aspergillus section Flavi.*

Espécie	Utilidade	Região alvo	Par de *primer*	Referência
A. flavus	Detecção espécie-específico	Região ITS	(FLA1) F5' GTA GGG TTC CTA GCG AGC C (FLA2) R5' GGA AAA AGA TTG ATT TGC GTT C	González-Salgado et al. (2008)
		Região ITS	(FLAVIQ1) F5' GTC GTC CCC TCT CCG G (FLAQ2) R5' CTG GAA AAA GAT TGA TTT GCG	Sardiñas et al. (2011b)
		Região ITS	(A.flav-For) F5' CGA GTG TAG GGT TCC TAG CGA (A.flav-Rev) R5' CCG GCG GCC ATG AAT	Walsh et al. (2011)
		Gene *omt-A*	(omt-F) F5' GAC CAA TAC GCC CAC ACA G (omt-R) R5' CTT TGG TAG CTG TTT CTC GC	Shweta et al. (2013)
		Gene *omt-A*	(F-omt) F5' GGC CGC CGC TTT GAT CTA GG (R-omt) R5' ACC ACG ACC GCC GCC	Rodriguez et al. (2012)
A. parasiticus	Detecção espécie-específico	Região ITS	(PAR1) F5' GTC ATG GCC GCC GGG GGC GTC (PAR2) R5' CCT GGA AAA AAT GGT TGT TTT GCG	Sardiñas et al. (2010)
		Região ITS	(FLAVIQ1) F5' GTC GTC CCC TCT CCG G (PARQ2) R5' GAA AAA ATG GTT GTT TTG CG	Sardiñas et al. (2011b)
A. nomius	Detecção espécie-específico	Gene *benA*	(BtubNomF) F5' AGC AGA AAC ATG AGC TCG GAT A (BtubNomR) R5' TTC CCG TCA GAC CCA TCC A	Massi et al. (2015)

2 OBJETIVOS

3.1 Objetivos geral

Este trabalho teve como objetivo desenvolver marcadores moleculares espécie-específicos para a detecção das espécies toxigênicas *Aspergillus nomius, Aspergillus niger* e *Aspergillus welwitschiae.* Além disso, configurou-se como objetivo desse trabalho desenvolver um sistema de PCR multiplex capaz de detectar genes essenciais para a biossíntese de ocratoxina A e fumonisina B_2 no genoma de linhagens de *Aspergillus niger* e *Aspergillus welwitschiae* isoladas de diferentes produtos destinados à alimentação humana. Adicionalmente, foi objetivo deste trabalho, fazer uso do sistema multiplex desenvolvido, aliado ao sequenciamento de uma porção do gene que codifica para calmodulina, para desvendar as espécies que contaminam cebolas comercializadas no estado do Paraná, Brasil, e prospectar a presença de genes essenciais para a biossíntese de OTA e FB_2 em cebolas.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar sequências de nucleotídeos parcial do gene da β-tubulina de todas as espécies pertencentes à *Aspergillus section Flavi,* Clado *Aspergillus nomius,* que encontram-se disponíveis no banco de dados do GenBank, a fim de se desenvolver *primers* espécie-específicos para detecção da espécie *Aspergillus nomius*.

- Utilizar o par de *primer* específico para *Aspergillus nomius* e verificar a possibilidade de que visitantes florais da castanheira do Brasil (*Bertholletia excelsa*) sejam portadoras desta espécie fúngica.

- Analisar sequências de nucleotídeos parcial do gene da β-tubulina de todas as espécies pertencentes à *Aspergillus section Nigri,* disponíveis no banco de

dados do GenBank, a fim de se desenvolver *primers* espécie-específicos para detecção de linhagens pertencentes as espécies *Aspergillus niger/Aspergillus welwitschiae*.

- Analisar sequências de nucleotídeos do gene *radH* (locus tag An15g07880 de *Aspergillus niger* CBS 513.88) envolvido com a biossíntese de ocratoxina A, a fim de se desenvolver um par de *primer* capaz de amplificar essa região. Usar o par de *primer* desenvolvido por Ferracin et al. (2012) capaz de amplificar o gene *pks* (locus tag An15g07920 de *Aspergillus niger* CBS 513.88) também envolvido com a biossíntese de ocratoxina A.

- Analisar sequências de nucleotídeos do gene *fum8* (locus tag An01g06870 de *Aspergillus niger* CBS 513.88) envolvido com a biossíntese de fumonisina B_2, a fim de desenvolver um *primer reverse* capaz de amplificar essa região. O *primer forward* foi obtido de Susca et al. (2010) com modificações.

- Desenvolver uma metodologia de PCR multiplex para detecção da presença de genes essenciais da biossíntese de ocratoxina A (*radH* e *pks*) e fumonisina B_2 (*fum8*) no genoma de linhagens das espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus welwitschiae*.

- Utilizar a metodologia de PCR multiplex para avaliar linhagens de *Aspergillus niger/Aspergillus welwitschiae* obtidos de amostras de uvas, castanha do brasil, grãos de café, frutas secas, cacau e cebolas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados sob a forma de artigos científicos descritos a seguir, segundo as normas das respectivas revistas:

4.1 Artigo Científico I:

“Identification of *Aspergillus nomius* **in Bees Visiting Brazil Nut Flowers”**

Artigo publicado na Revista *Microbes and Environments* (v. 30, p. 273-275, 2015).

4.2 Artigo Científico II:

“Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* **and** *Aspergillus welwitschiae***”**

Artigo publicado na Revista *International Journal of Food Microbiology* (v. 221, p. 19-28, 2016).

4.3 Artigo Científico III:

“Black aspergilli from onion samples and their potential for mycotoxin production”

Artigo em fase de redação e posteriormente será enviado para publicação.

Microbes and Environments

Short Communication

Identification of *Aspergillus nomius* in Bees Visiting Brazil Nut Flowers

Abstract

We designed a primer pair (BtubNomF/BtubNomR) specifically for amplifying *Aspergillus nomius* DNA. *In vitro* assays confirmed BtubNomF/BtubNomR specificity, corroborating its usefulness in detecting and identifying *A. nomius*. We then investigated the occurrence of *A. nomius* in floral visitors of *Bertholletia excelsa* trees by means of PCR, and *A. nomius* was detected in the following bees: *Xylocopa frontalis*, *Bombus transversalis*, *Centris denudans*, *C. ferruginea* and *Epicharis flava*. The presence of *A. nomius* in bees visiting Brazil nuts opens up new avenues for obtaining novel insights into the process whereby Brazil nuts are contaminated by aflatoxin-producing fungi.

Keywords: aflatoxin, *Aspergillus* section *Flavi,* molecular detection, pollinators of *Bertholletia excelsa*

The Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) is a South American tree native to the Amazonian rainforest. It can reach a height of 45 meters. Flowering begins at the end of the rainy season in September and extends to February (5). The flower is large and zygomorphic with two or three sepals and six yellowish petals. It incorporates a curled hood formed by congruent staminodes (ligule) which, with the petals, forms a chamber containing the stamens, stigma and nectaries. The size and robustness of the hood mean that pollination is restricted to medium and large-sized bees strong enough to uncurl it, and predominantly *Eulaema mocsaryi* and *Xylocopa frontalis* (6).

The fruit is an extremely hard spherical capsule of ligneous mesocarp. Inside the fruit, the seeds (or nuts) have a ligneous rough shell. The fruit remains on the tree for 15 months. When mature, it falls to the ground where it interacts with the soil for days or weeks before it is harvested.

The occurrence of aflatoxins in Brazil nuts is one of the main obstacles to their commercialization. Although the soil has been systematically identified as the dominant source of fungal contamination (1,3), the incidence of aflatoxigenic fungi in nuts collected directly from the trees was previously reported to be high (2).

Among the aflatoxigenic fungi, *Aspergillus nomius,* belonging to section *Flavi*, has been identified as the main culprit for the presence of aflatoxins in Brazil nuts (4, 8, 10-12). The taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* is complex, and it can be very difficult, and even impossible to identify some species morphologically.

In the present study, strains of *Aspergillus* section *Flavi* were analyzed using β-tubulin gene sequences in order to develop specific primers for the detection of *A. nomius.* The primer pair provided herein was used to verify the possible incidence of *A. nomius* in visitor bees of Brazil nuts, thereby opening up new possibilities for deepening our knowledge of the process whereby Brazil nuts are contaminated by aflatoxin-producing fungi.

In order to develop specific primers for detecting *A. nomius,* the β-tubulin gene sequences from the *A. nomius* clade (*A. pseudonomius*, *A. bombycis* and *A. nomius*) were downloaded from the GenBank database and aligned using BioEdit v.7.0.5.3 software (9). Nineteen of the *A. nomius* sequences deposited (NRRL 3353; NRRL 6552, NRRL 26455; NRRL 26886; NRRL 26885; NRRL 26883; NRRL 5919; 823/07; NRRL 26454; NRRL 26452; NRRL 26450; NRRL 26451; NRRL 26881; NRRL 26879; NRRL 6343; NRRL 26878; NRRL 26882; NRRL 26880; NRRL 26884) were interpreted in our study as belonging to *A. pseudonomius,* as recommended in the recent study (10). The sequence variations of all 50 taxa belonging to the *A. nomius* clade, available in the GenBank database (accessed June 14, 2014), allowed us to define eight distinct haplotypes based on the *benA* locus. These eight haplotypes, representing strains around the world, were used to design the primer pair denoted BtubNomF and BtubNomR (5’ AGC AGA AAC ATG AGC TCG GAT A 3’ and 5’ TTC CCG TCA GAC CCA TCC A 3’) to specifically amplify *A. nomius* DNA (Fig. 1). In order to predict specificity to *A. nomius* strains, this primer combination was tested *in*

silico against all *Aspergillus* section *Flavi* species. We found that both primers were 100% identical to all *A. nomius* strains, but, when combined, were not 100% identical to any of the other strains of the species belonging to the section *Flavi.*

All *Aspergillus* section *Flavi* strains available in our laboratory (*A. flavus* (*n*=10), *A. arachidicola* (*n*=2), *A. tamari* (*n*=2), *A. pseudotamari* (*n*=2), *A. caelatus* (*n*=2), *A. pseudocaelatus* (*n*=2), *A. bertholletius* (*n*=5), *A. pseudonomius* (*n*=6), *A. bombycis* (*n*=2) and *A. nomius* (*n*=34)) were used to assess the specificity of the primer pair designed to detect *A. nomius*. The PCR reaction was carried out in a total reaction volume of 25 µL containing 1 X PCR buffer, 2.0 mM of $MgCl_2$, 0.2 mM of dNTP mixture, 0.4 µM of each primer, 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies), and 10 ng of DNA template. The amplification program consisted of one cycle at 95°C for 5 min, then 34 cycles at 95°C for 30 s, 65°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and a final extension step at 72°C for 4 min. Under these PCR conditions, primer pair BtubNomF/BtubNomR provide an amplicon of 185 bp for all *A. nomius* strains, but did not produce PCR products of the correct size from any of the other *Aspergillus* section *Flavi* species available in our collection, indicating that it may be used to identify *A. nomius* in culture (Fig. 2).

Since *A. nomius* is often associated with insects (14), we decided to investigate, by means of PCR, the presence of *A. nomius* in bees visiting *B. excelsa*. Floral visitors were captured in a Brazil nut plantation situated at kilometer 215 on the Manaus-Itacoatiara road in the Brazilian state of Amazonas (3º 2'S 58º 45'W). This area is part of the Aruanã farm, extending over 12,000 ha, including 3,600 ha planted with Brazil nut trees, spaced 20 m apart. It is the largest Brazil nut plantation in the world, with approximately 1,300,000 trees. Bees visiting flowers were collected using entomological nets. They were then killed in an ethyl acetate killing jar, and individual species were identified using morphological characters. To extract bee DNA, we removed the abdomen of *Xylocopa frontalis* (*n*=8), *Bombus transversalis* (*n*=1), *Centris denudans* (*n*=2), *C. ferruginea* (*n*=1) and *Epicharis flava* (*n*=1). The remaining materials were ground with a mortar and pestle under liquid nitrogen and homogenized with extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1% SDS; 0.75 M NaCl; 20 mM EDTA). Proteinase K solution (100 mg mL^{-1}) was then added to the mixture. Samples were incubated at 64°C for 2 h and the resulting solution was deproteinized with phenol-chloroform standard protocol. Isopropanol was used to precipitating

nucleic acid, which were then ressuspended in 50 mL TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA). A portion of the cytochrome b gene (13) from extracted DNA was amplified using PCR with the primers CB-J-10933F (5' TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC 3') and CB-N-11367R (5' ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT 3'). Amplified DNA fragments were observed in the DNA of all bees with the expected lengths by agarose gel electrophoresis.

In order to investigate the presence of fungal species in the bees collected, standard PCR was run on the DNA of all bees using the β-tubulin universal primers Bt2a/Bt2b described previously (7). Amplification products showing the presence of fungus (590 bp) were obtained from seven samples of *X. frontalis,* one sample of *B. transversalis,* two samples of *C. denudans*, one sample of *C. ferruginea*, and one sample of *E. flava.* The PCR products generated using the Bt2a/Bt2b primers were purified with Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) diluted 100x. We then used 2 µL as a template in a NESTED-PCR reaction with the BtubNomF/BtubNomR primer pair, specifically designed to detect *A. nomius.* The PCR conditions were as described for testing primer specificity. By means of NESTED-PCR results, the *A. nomius* amplicon (185 bp) was detected in three samples of *X. frontalis*, and one sample each of *B. transversalis*, *C. denudans*, *C. ferruginea* and *E. flava.* All NESTED-PCR products were sequenced and the BLASTn results confirmed the presence of *A. nomius*.

In order to confirm the effectiveness of NESTED-PCR for detecting *A. nomius* in bee visitors, two bulks of amplicons generated using the Bt2a/Bt2b (590 bp in size) were performed. The first bulk (A) included all seven PCR products that were positive for *A. nomius* while the second bulk (B) included all five PCR products that were negative for *A. nomius*. Both bulks were cloned separately into a sequencing vector (TOPO® TA Cloning® Kit; Invitrogen). The *E. coli* recombinant colonies (31 from bulk A and 21 from bulk B) were selected for insert sequencing. The inserts were sequenced for both orientations using the BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) and an ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions. Sequence identity verified using the NCBI BLASTn engine (http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) corroborated the presence of *A. nomius* and *A. niger* in bulk A, and the presence of

Penicillium ochrochloron, Acremonium sp.*, Cyphellophora europeae, Phialophora europeae* and *Discula* sp. in bulk B.

In conclusion, we succeeded in demonstrating for the first time the presence of *A. nomius* in bees visiting Brazil nuts, and the applicability of the BtubNomF/BtubNomR primer pair to its rapid diagnosis. We also obtained some new insights into the process of Brazil nut contamination by aflatoxin-producing fungi.

Acknowledgements

Our study was supported (grants and fellowships) by the following Brazilian institutions:

Fundação Araucária, Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).

References

1. Arrus, K., G. Blank, R. Clear, R.A. Holley, and D. Abramson. 2005. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. J. Food Prot. 68:1060–1065.

2. Baquião, A.C., P. Zorzete, T.A. Reis, E. Assunção, S. Vergueiro, and B. Correa. 2012. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. Food Control 28:224–229.

3. Baquião, A.C., M.M.M. de Oliveira, T.A. Reis, P. Zorzete, D.D. Atayde, and B. Correa. 2013. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. Food Chem. 139:1127–1132.

4. Calderari, T.O., B.T. Iamanaka, J.C. Frisvad, J.I. Pitt, D. Sartori, J.L. Pereira, M.H.P. Fungaro, and M.H. Taniwaki. 2013. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: from rainforest to consumer. Int. J. Food Microbiol. 160:267–272.

5. Campos, A.M., J.L. Freitas, E.S. Santos, and R.B.L. e Silva. 2013. Fenologia reprodutiva de *Bertholletia excelsa* Bonpl. em floresta de terra firme em Mazagão, Amapá. Biota Amazônia 3:1–8.

6. Cavalcante, M.C., F.F. Oliveira, M.M. Maués, and B.M. Freitas.2012. Pollination requirements and the foraging behavior of potential pollinators of

cultivated Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) trees in Central Amazon Rainforest. Psyche. 2012. Article ID 978019, 9 pp., doi: 10.1155/2012/978019.

7. Glass, N.L., and G.C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 61:1323-1330.

8. Gonçalves, J.S., L.M. Ferracin, M.L.C. Vieira, B.T. Iamanaka, M.H. Taniwaki, and M.H.P. Fungaro. 2012. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. World J. Microbiol. Biotechnol. 28:1817–1825.

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

10. Massi F.P., M.L.C. Vieira, D. Sartori, R.E.S. Penha, C.F. Munhoz, J.M. Ferreira, B.T. Iamanaka, M.H. Taniwaki, J.C. Frisvad, and M.H.P. Fungaro. 2014. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. Int. J. Food Microbiol. 186:14–21.

11. Olsen M., P. Johnsson, T. Möller, R. Paladino, and M. Lindblad. 2008. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? World Mycotoxin J. 1:123–126.

12. Reis T.A., T.D. Oliveira, A.C. Baquião, S.S. Gonçalves, P. Zorzete, and B. Corrêa. 2012. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. Int. J. Food Microbiol. 159:61–68.

13. Simons C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Entomol. Soc. America 87:651-701.

14. Varga J., J.C. Frisvad, and R.A. Samson. 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. Stud. Mycol. 69:57–80.

Figure legends

Figure 1 - Primer pair designed specifically for amplifying *A. nomius* strains.

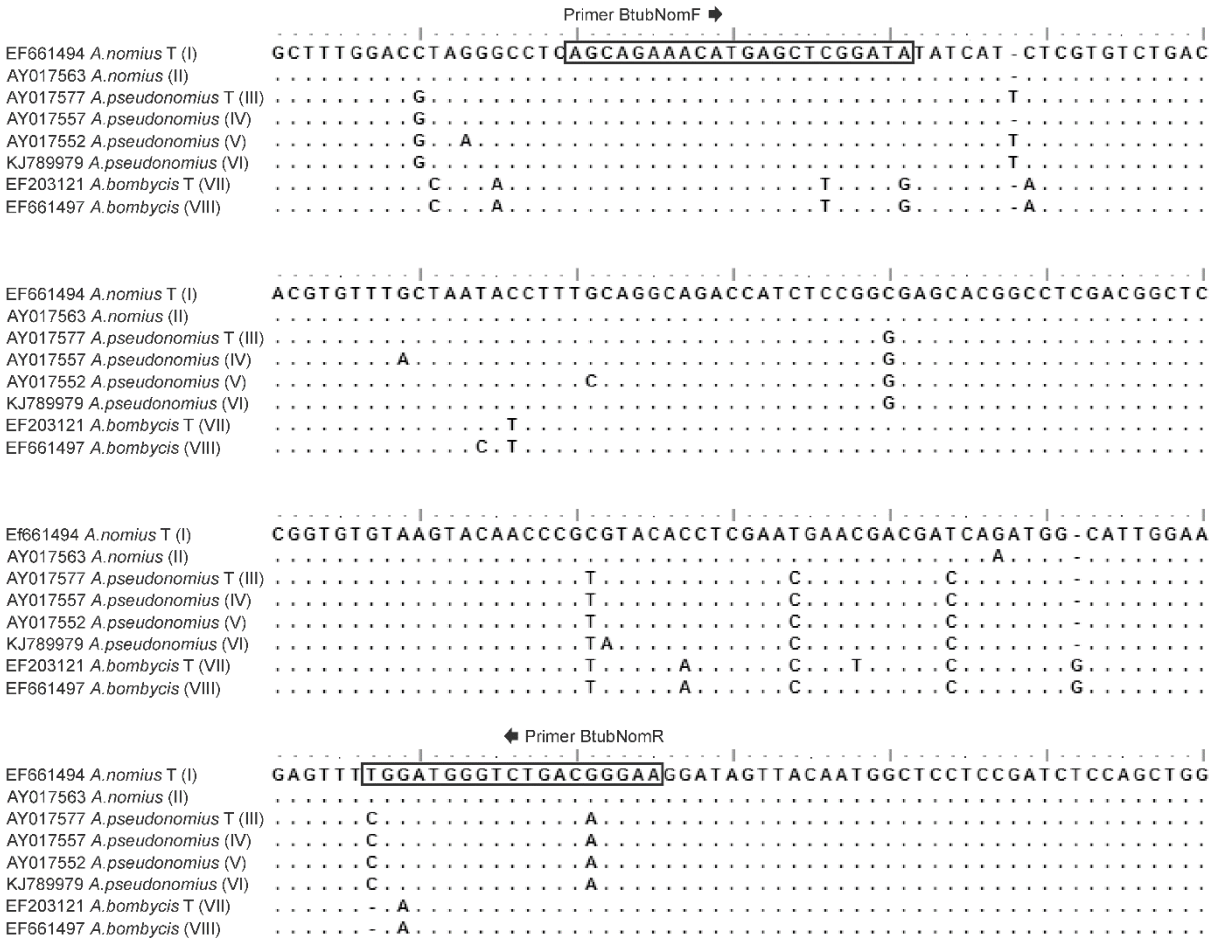


Fig. 1 MASSI, F.P.

Figure 2 - Result of PCR using the BtubNomF/BtubNomR primer pair to amplify *A. nomius* (A), *A. pseudonomius* (B) and *A. bombycis* (C) strains. NC indicates negative control. Only *A. nomius* strains showed the 185 bp specific amplicon.

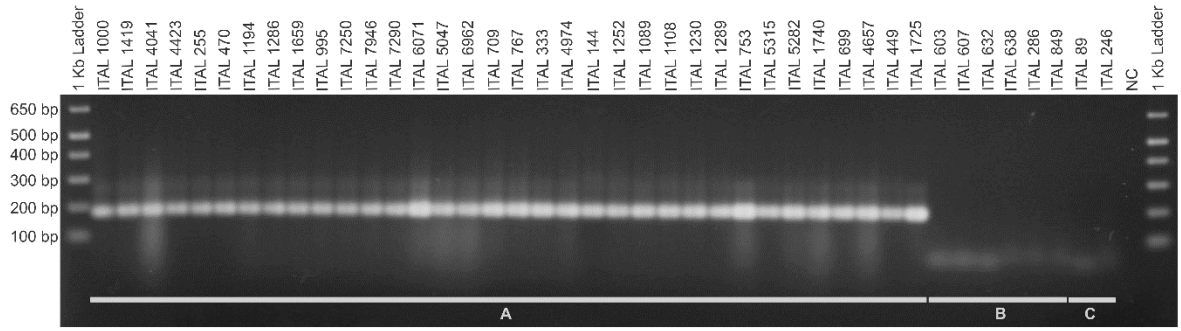


Fig. 2 MASSI, F.P.

International Journal of Food Microbiology

Research Article

Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* **and** *Aspergillus welwitschiae*

Abstract

Aspergillus niger “aggregate” is an informal taxonomic rank that represents a group of species from the section *Nigri*. Among *A. niger* “aggregate” species *A*. *niger sensu stricto* and its cryptic species *Aspergillus welwitschiae* (= *Aspergillus awamori sensu* Perrone) are proven as ochratoxin A and fumonisin B_2 producing species*. A. niger* has been frequently found in tropical and subtropical foods. *A. welwitschiae* is a new species, which was recently dismembered from the *A. niger* taxon. These species are morphologically very similar and molecular data are indispensable for their identification. A total of 175 Brazilian isolates previously identified as *A. niger* collected from dried fruits, Brazil nuts, coffee beans, grapes, cocoa and onions were investigated in this study*.* Based on partial calmodulin gene sequences about one-half of our isolates were identified as *A. welwitschiae*. This new species was the predominant species in onions analyzed in Brazil. *A. niger* and *A. welwitschiae* differ in their ability to produce ochratoxin A and fumonisin B_2*.* Among *A. niger* isolates, approximately 32% were OTA producers, but in contrast only 1% of the *A. welwitschiae* isolates revealed the ability to produce ochratoxin A. Regarding fumonisin B_2 production, there was a higher frequency of FB_2 producing isolates in *A. niger* (74%) compared to *A. welwitschiae* (34%). Because not all *A*. *niger* and *A. welwitschiae* strains produce ochratoxin A and fumonisin B_2, in this study a multiplex PCR was developed for detecting the presence of essential genes involved in ochratoxin (polyketide synthase and *radH* flavin-dependent halogenase) and fumonisin (α-oxoamine synthase) biosynthesis in the genome of *A. niger* and *A. welwitschiae* isolates. The frequency of strains harboring the mycotoxin genes was

markedly different between *A. niger* and *A. welwitschiae*. All OTA producing isolates of *A. niger* and *A. welwitschiae* showed in their genome the *pks* and *radH* genes, and 95.2% of the nonproducing isolates did not contain these genes. The α-oxoamine synthase gene was detected in 100% and 36% of the *A. niger* and *A. welwitschiae* isolates, respectively. The loss of ochratoxins A production in *A. niger* and *A. welwitschiae* is highly associated with gene deletions within the ochratoxin biosynthetic gene cluster. The loss of fumonisin production in *A. welwitschiae* is associated with gene deletions within the fumonisin biosynthetic gene cluster, but this is not the case with *A. niger*.

Keywords: *Aspergillus niger*, *A. welwitschiae,* ochratoxin A, fumonisin B_2, multiplex PCR, gene deletions

1. Introduction

Aspergillus niger “aggregate” is an informal taxonomic rank that represents a group of morphologically very similar species of *Aspergillus* section *Nigri* demanding DNA sequence analysis of calmodulin (*CaM*) and β-tubulin (*benA*) genes for the identification of their members. The taxonomical status of *A. niger* “aggregate” has evolved continuously; for instance, the taxon *Aspergillus niger sensu stricto* was recently dismembered into *Aspergillus welwitschiae* and *A. niger* (Perrone et al., 2011). Despite the industrial importance of both these species, they are recognized as producers of mycotoxins, namely ochratoxin A (OTA) and fumonisin B_2 (FB_2) (Abarca et al., 1994; Frisvad et al., 2007, 2011; Perrone et al., 2011). Excluding *Aspergilus lacticoffeatus*, which is a color mutant of *A. niger* (see Varga et al., 2011), there are 10 *A. niger* “aggregate” species, only two of which were conclusively proven to be OTA and FB_2 producers.

Ochratoxin A is a nephrotoxic and potentially carcinogenic mycotoxin found in a variety of food commodities such as cereals, coffee beans, cocoa beans, grapes, dried fruits and spices (Malir et al., 2013; Ostry et al., 2013). Fumonisin B_2 is another

mycotoxin frequently found in cereals that can cause a variety of toxic effects in different animal species and has been associated with esophageal cancers in humans (Rocha et al., 2014; Scott, 2012).

Interestingly, not all the strains of *A*. *niger* are able to produce OTA or FB_2. Before *A. niger* was dismembered into two taxa, Frisvad et al. (2011) analyzed a group of available industrial strains reporting that 33% and 83% of them were OTA and FB_2 producers respectively. Nowadays, there is a consensus that all *A. niger* isolates have to be carefully checked for mycotoxin production before they can be used for industrial purposes.

In general, genes encoding enzymes involved in mycotoxin biosynthesis are located physically adjacent constituting gene clusters that usually harbor genes for polyketide synthases (PKS), non-ribosomal peptide synthases (NRPS), hydrolases, oxidases, methylases, transporters, and regulatory proteins (Turner, 2010). The *in silico* analyses performed by Ferracin et al. (2012) have shown that the *pks-locus* tag An15g07920 located in the ochratoxin gene cluster of the ochratoxigenic *A. niger* CBS 513.88 strain is absent in the non-ochratoxigenic ATCC 1015 strain. Moreover, an *in vivo* analysis of several Brazilian strains has shown there is an association between the presence of this particular *pks* gene and the capability to synthesize OTA (Ferracin et al., 2012).

Regarding fumonisin, the presence of a putative fumonisin gene cluster in the *A. niger* genome, harboring at least 10 genes, was reported by Pel et al. (2007). The gene *fum8*, located in this gene cluster, encodes an α-oxoamine synthase (Fum8p), which is an essential enzyme for fumonisin biosynthesis, and the disruption of *fum8* was proven to result in the loss of FB_2 biosynthesis in *A. niger* (Shimizu et al., 2015).

Because *A. niger* and/or its cryptic species *A. welwitschiae* are very common in grapes, coffee beans, onions, Brazil nuts, and dried fruits, in this study the presence of genes encoding essential proteins for ochratoxin and fumonisin biosynthesis in a Brazilian isolate collection was examined, using a multiplex PCR developed by our group for this purpose.

2. Material and methods

2.1 Fungal isolates

Fungal isolates were provided by the following Brazilian institutions: Universidade Estadual de Londrina (*n*=85) and Instituto de Tecnologia de Alimentos (*n*=90). They were collected from dry fruits (*n*=19), Brazil nuts (*n*=30), coffee beans (*n*=27), grapes (*n*=40), cocoa (*n*=3) and onions (*n*=56). The Brazilian geographical regions where the samples were collected are shown in Supplementary Fig. 2 (see supplementary file Data in Brief, Massi et al., submitted for publication).

2.2 DNA extraction

Conidia of each isolate were inoculated into 7 mL of liquid complete medium (Pontecorvo et al., 1953) and incubated at 25 °C for 24 h. Mycelia were collected, frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder. Nucleic acids were purified using the BioPur Mini Spin Extraction Kit (Biometrix, Brazil), according to the manufacturer's instructions.

2.3 Partial calmodulin gene sequence analyses

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), and the resulting fragments purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). Sequencing reactions were then carried out using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) and their products processed in an ABI 3500XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA). The sequences were subsequently aligned with those from *Aspergillus* section *Nigri* available in the GenBank database. A phylogeny reconstruction was obtained by using a distance-based Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The tree was drawn using MEGA 6.05 (TAMURA et al., 2013) with 1000 bootstrap replicates for assessing node confidences.

2.4 Ochratoxin A production

The capacity of each isolate to produce ochratoxin A (OTA) was analyzed according to a quantitative method described by Filtenborg et al. (1983). Few modifications were made. The species were three point inoculated into Yeast Extract Sucrose Agar (YES Agar) and incubated at 25 ºC for 7 days. An agar plug was removed from the center of the colony, the OTA extracted with methanol:chloroform (1:1) and the plug placed on a silica plate for thin layer chromatography. The mobile phase used was toluene: ethyl acetate: formic acid 90%: chloroform (7:5:2:5, v/v/v/v). The OTA was visualized under UV light at 254 and 365 nm. An OTA standard (Sigma, St. Louis, USA) was used to compare the fluorescence spectrum and the retention index of the strains' compounds relative to those of OTA.

2.5 Fumonisin production

The production of fumonisin B_2 by the isolates was tested using the methodology in Frisvad et al. (2007) with modifications. The isolates were inoculated onto agar Czapek Yeast Extract 20% Sucrose (CY20S Agar) and incubated at 25°C for 7 days. Five small pieces of mycelium were removed (plugs) from the centre of the colony and transferred into a vial. One milliliter of methanol was added and stirred by vortex for 3 min. Two filtrations were carried out with a Millex membrane; 0.45 µM and 0.22 µM, 55 µL of the extract was transferred to an HPLC vial, adding 55 µL of o-phthaldialdehyde reagent (OPA), according to the method described by Visconti et al. (2001). The vial was stirred in vortex for 30 s. A 20 µL aliquot of the extract was injected into the chromatograph. Detection and quantification of FB_2 was performed in a Shimadzu LC-10VP (Shimadzu, Japan) HPLC with a fluorescence detector (model RF-10AXL), set at 335 nm excitation and 440 nm emission. The chromatography column used was a YMC-Pack ODS-A (YMC Co., Japan) (5 mm, 4.6 x 150 mm) with a mobile phase of acetonitrile: water: acetic acid (51: 47: 02, v/v/v), a flow rate of 1 mL/min and an oven temperature of 40 °C. Samples as well as a fumonisin B_2 standard (Sigma, St. Louis, USA) were injected into the HPLC equipment. The detection limit for fumonisin B_2 was calculated as 0.07 µg/g.

2.6 Primer designing

PCR assays were developed for reliable fungal species identification and detection of genes involved in mycotoxin synthesis. The primer sets were designed to have similar melting temperature*s* and to avoid the formation of secondary structures, either for self or to another (Table 1). The primer-pair *benA*-An/Aw was designed to detect the species *A. niger* and *A. welwitschiae*. This involved retrieving the *benA* gene sequences of all black aspergilli from the GenBank databases. The sequences were then aligned using the BioEdit software (Hall, 1999), and visually checked for regions of complete similarity between *A. niger* and *A. welwitschiae,* but not other species belonging to section *Nigri* (Fig. 1). A second primer-pair was designed to detect the gene *radH* (locus tag An15g07880 of *A. niger* CBS 513.88), which encodes a flavin-dependent halogenase involved in OTA biosynthesis; similarly, a third primer-pair was designed to target another essential gene (*pks*), which encodes for a polyketide synthase (locus tag An15g07920 of *A. niger* CBS 513.88), developed by Ferracin et al. (2012). Finally, a primer-pair was designed to detect the gene *fum8* (locus tag An01g06870 of *A. niger* CBS 513.88), which encodes α-oxoamine synthase, an essential enzyme for FB_2 biosynthesis. The forward (fum8vn-F) consisted of the same sequence designed by Susca et al. (2010), denoted vnF1, but with five additional nucleotide residues. The reverse (fum8-R) was designed after the selection of a conserved region, 128 nucleotides away from the target sequence of the forward primer. All primers were analyzed *in silico* for specificity using “Primer-Blast” (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/).

The inclusiveness of *benA*-An/Aw was evaluated experimentally using the DNA from all strains of *A. niger* (*n*=89) and *A. welwitschiae* (*n*=86). The specificity of the *benA-An/Aw* primers was determined experimentally against the following non-target species: *Aspergillus uvarum*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus neoniger*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus luchuensis, Aspergillus fijiensis* and *Aspergillus brasiliensis* (Fig. 2).

2.7 Multiplex PCR

Multiplex amplifications (mPCR) were carried out using the four primer-pairs in a single PCR mixture. All reactions were performed in a final volume of 10 µL containing 1x PCR buffer, 10 ng of DNA template, 0.4 pMoL of each primer, 0.2 mM of dNTP set (Invitrogen, Life Technologies, USA), 2.0 mM of $MgCl_2$ and 1.0 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies, USA). The DNA was amplified in a Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) under the following conditions: initial denaturation at 95 ºC for 5 min, 35 cycles of denaturation at 95 ºC for 40 s, annealing at 58 ºC for 35 s and extension at 72 ºC for 40 s followed by final extension of 72 ºC for 30 min. The amplified products were analyzed using standard (1.4%) agarose gel and capillary electrophoresis. This involved resynthesizing all primers to incorporate a fluorescent dye (6-carboxy-fluorescine (FAM), on the 5' end of pks-F, radH-F and fum8vnF1-F, and hexachloro-6-carboxy-fluorescine (HEX) on the 5' end of *benA*-An/Aw-F). Each amplified sample was diluted 10 x and 8.0 µL of (Hi-Di) formamide and 0.3 µL of GeneScan™ 600 LIZ® internal lane size standard (Applied Biosystems, USA) were added to 2 µL of this diluted sample. An ABI 3500XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA) was used to separate and detect the fluorescently labeled PCR products which were analyzed using GeneMarker® Software (SoftGenetics®).

3. Results and discussion

3.1 Molecular species identification

Initially, a portion of the *CaM* gene was sequenced using all the isolates (175) collected from dried fruits, Brazil nuts, coffee beans, grapes, cocoa and onions, which were previously identified as *A. niger* (unpublished data). The analysis revealed the existence of 10 haplotypes and their sequences were deposited in the NCBI database under Genbank accession numbers KT749947, KT749948, KT749949, KT749950, KT749951, KT749952, KT749953, KT749954, KT749955 and KT749956. Subsequently, the phylogenetic tree was reconstructed showing that the Brazilian isolates herein investigated split into two distinct clades: one grouping with *A. niger* CBS 554.65 type strain and the other with its sibling species, *A. welwitschiae*

CBS 139.54 type strain (Fig. 3). The identification of all isolates based on *CaM* sequences is shown in Table 2.

A. niger is one of the most common species of the “aggregate” and has been frequently found in tropical and subtropical foods, including dried fruits, Brazil nuts, coffee beans, grapes, cocoa and onions (Bayman et al., 2002; Chiotta et al., 2013; Egbuta et al., 2015; Iamanaka et al., 2014; Palumbo et al., 2015; Passamani et al., 2012; Samson and Varga, 2010; Shehu and Muhammad, 2011; Susca et al., 2013; Tyson and Fullerton, 2004). *A. welwitschiae* (=*Aspergillus awamori sensu,* Perrone et al., 2011) is a new species, which was dismembered from the *A. niger* taxon (Hong et al., 2013). As mentioned above, these species are morphologically indistinguishable, but fixed nucleotide differences between them were suggested for their identification (Hong et al., 2013); three SNPs found in the partial *CaM* sequences have been useful for discriminating these sibling species (Samson et al., 2014).

Based on the *CaM* sequences, about one-half of our isolates were identified as *A. welwitschiae* (49%), predominant in onions (96%). *A. niger* was predominant in coffee beans (96%), dried fruits (90%) and grapes (70%). *A. niger* and *A. welwitschiae* were found to have a similar frequency in Brazil nuts, e.g. 47% and 53%, respectively.

According to Hong et al. (2013), *A. welwitschiae* has been found in dried fruits, grapes, coffee beans and cocoa. However, these authors did not mention its proportion with regard to *A. niger sensu stricto*. Examining onion samples from Saudi Arabia, Gherbawy et al. (2015) reported *A. welwitschiae* as the prevalent species, in line with the findings of our study.

3.2 Mycotoxin production

Fungal strains belonging to *A. niger* and *A. welwitschiae* have been reported to produce OTA and FB_2 in culture media as well as in natural substrates (Abarca et al., 1994; Frisvad et al., 2007; Logrieco et al., 2014). However, the impact of this property on human health is still unclear (Pitt et al., 2013), in part due to misidentification of the species and because of the limited knowledge we have

concerning the frequency of isolates with potential for OTA and FB_2 production. According to Palumbo et al. (2013), the recent designation of *A. welwitschiae* as a distinct species should encourage the reexamination of FB_2 producing and nonproducing populations, especially since the ecological and toxicological characteristics of *A. niger* and *A. welwitschiae* overlap extensively.

In our study, we were able to recognize isolates that produce only OTA, only FB_2, both toxins, and also nonproducing isolates in YESA (OTA) or CY20S (FB_2) medium (Table 3). Regardless of the species, approximately 17% of our collection of isolates were OTA producers. This is in accordance with the low frequencies found by several authors investigating the ochratoxin producing abilities of *A. niger* isolates before it was split into two species (Bejaoui et al., 2006; Bellí et al., 2006; Chiotta et al., 2013; Frisvad et al., 2011; Iamanaka et al., 2005; Lasram et al., 2012; Serra et al., 2003; Soares et al., 2013). Similarly, with regard to the FB_2 production capability, we found that 54% of the isolates were producers, as reported by Logrieco et al. (2009); Palumbo et al. (2011) and Varga et al. (2010) examining Italian grapes, dried vine fruits from different geographical regions, and Californian grapes, respectively.

It is important to state that the ability to produce OTA and FB_2 was found to be markedly different when considering the existence of two species. Among *A. niger* isolates, approximately 32% were detected as OTA producers, in contrast to only 1% of the *A. welwitschiae* isolates. Regarding FB_2 production, a higher frequency of FB_2-producing isolates in *A. niger* (74%) in comparison to *A. welwitschiae* (34%) was also observed. This is in line with the very few existing studies; for instance, Storari et al. (2012) did not find any OTA producers in *A. welwitschiae* collected from herbal teas, whereas 37% were FB_2 producers. Gherbawy et al. (2015) examined 37 *A. welwitschiae* isolates collected from onions in Saudi Arabia and did not find any OTA producers, although half of them did produce FB_2.

3.3 Incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis detected by multiplex PCR

Nowadays, the *A. niger* “aggregate” comprises a set of 10 species*: A. niger, A. welwitschiae, A tubingensis, Aspergillus piperis, A. luchuensis, A. neoniger,*

Aspergilus costaricaensis, Aspergillus vadensis, Aspergillus eucalypticola and *A. brasiliensis.* Of all these morphologically similar species, only *A. niger* and *A. welwitschiae* are OTA and FB_2-producing species. This alone means that it is very important to develop a method of distinguishing these toxigenic species from the remainder of the "aggregate". As mentioned in the Material and Methods section, a primer-pair (*benA*-An/Aw) for the simultaneous diagnosis of *A. niger* and *A. welwitschiae* was designed, and its specificity confirmed by an *in silico* analysis. Of the 20,343 *Aspergillus* blast hits analyzed, only the *A. niger* and *A. welwitschiae* (syn. *A. awamori*) strains had 100% sequence similarity. *In vitro*, all PCRs containing *A. niger* (*n*=89) or *A. welwitschiae* (*n*=86) template DNA produced a strong positive signal of 192 bp in length, although no strong fragment was detected when other *Aspergillus* species' DNA were examined (Fig. 2). The usefulness of PCR-based identification by means of the primer-pair herein designed was confirmed by sequence data.

Bearing in mind that not all *A*. *niger* and *A. welwitschiae* strains produce OTA and FB_2, a mPCR was idealized and used to look for the incidence of genes involved in these biosyntheses, and four PCR profiles were found (Table 4). Interestingly, the frequency of strains harboring the mycotoxin genes was markedly different between the two species. With regard to OTA, 32% of *A. niger* strains harbor *radH* and *pks* genes, while in *A. welwitschiae* only 8% of the strains harbor both these genes. There were no strains of either species that contained one or other gene, suggesting a single profile of deletion for all *A. niger* and *A. welwitschiae* strains.

These results are supported by the findings of Ferracin and coauthors indicating that the gene cluster involved in OTA biosynthesis (harboring the *pks*-locus tag An15g07920 and *radH*-locus tag An15g07880) is located at the end of the chromosome III, where deletions are thought to be more common than in other regions. These authors analyzed several *A. niger* strains (before it was split into two species) finding that the *pks* gene An15g07920 was present in 26% of them. Recently, Gherbaway et al. (2015) reported that this gene was missing in all *A. welwitschiae* strains obtained from Saudi Arabian onion samples.

With regard to fumonisin, the mPCR assay revealed that 100% of *A. niger* isolates and 36 % of *A. welwitschiae* isolates harbored the *fum8* gene in their genomes, in line with Susca et al.'s findings when studying *A. niger* and *A.*

welwitschiae isolates recovered from grapes grown in the Mediterranean basin (Susca et al., 2014). These authors reported that *fum8* was present in all isolates of *A. niger*, but in only 40% of *A. welwitschiae*.

With the aim of at identifying the mPCR products more rapidly and with high precision, we used HEX- or FAM-labeled forward primers and automated high-resolution capillary electrophoresis (CE). This kind of procedure can separate, detect, and genotype up to 96 samples in one run and gives accurate genotyping answers in a few hours (Durney et al., 2015). The mPCR products derived from each isolate were identified according to size and color: *A. niger*/*A. welwitschiae* species (green, 192 bp); *radH* (blue, 328 bp)*; pks* (blue, 554 bp); *fum8* (blue, 128 bp). The four profiles revealed by CE are shown in Supplementary Fig. 1 (see Data in Brief, Massi et al., submitted for publication). The mPCR products were very consistent, confirming the effectiveness of the approach herein adopted for addressing the presence/absence of the genes encoding essential proteins for OTA and fumonisin biosynthesis in *A. niger* and its cryptic species, *A. welwitschiae*.

3.4 Association between mPCR-based genotyping and mycotoxin production

All OTA producing isolates of *A. niger* (28) and *A. welwitschiae* (1) harbor in their genomes the *pks* and *radH* genes, and 95.2% of the nonproducing isolates (139/146) did not contain both genes (Tables 2 and 4). These results support the existence of a significant association between the presence of the *pks* gene and the production of OTA, pointed out by Ferracin et al. (2012).

All FB_2 producing strains of *A. niger* and *A. welwitschiae* (95) harbor in their genomes the *fum8* gene, and of the nonproducing isolates, only 68.7% (55/80) did not contain this gene.

Analyzing *A. welwitschiae* apart from *A. niger* isolates, it was possible to conclude that there is an association between the absence of *fum8* (genotype) and the FB_2 nonproduction phenotype in *A. welwitschiae*, but not in *A. niger*. The *fum8* gene was detected in all *A. niger* isolates, regardless of their ability to produce fumonisin. Conversely, *fum8* was not detected in 97% of the *A. welwitschiae* fumonisin non-producing isolates, meaning the loss of this phenotype is closely

associated with gene deletions within the gene cluster. These results are supported by those obtained for *A. welwitschiae* recovered from samples of Mediterranean basin grapes (Susca et al., 2014) and Saudi Arabian onions (Gherbawy et al., 2015).

The extraordinary association found between the OTA negative phenotype and the absence of *pks* and *radH* genes, in both genome species, confirms that the PCR-based analysis developed herein may be useful to predict the OTA production ability in *A. niger* and *A. welwitschiae* strains. Nevertheless, because no association was found between the FUM negative phenotype and the absence of the *fum8* gene in *A. niger*, a method to efficiently predict FB_2 nonproduction in this species remains a challenging task.

In conclusion, though *A. niger* and *A. welwitschiae* overlap extensively in several ecological and morphological characteristics, they are differentiated in regard to the association between the presence of *fum8* gene and the FB_2 production phenotype.

Acknowledgements

This research was supported by the following Brazilian institutions: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (471813/2013), Fundação Araucária, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (FAPESP 2013/05414-8). We also thank Mr. Steve Simmons for proofreading the manuscript.

References

Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G., Cabañes, F.J., 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. Applied and Environmental Microbiology 60, 2650–2652.

Bayman, P., Baker, J.L., Mahoney, N.E., 2002. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. Mycopathologia 155, 161–169.

Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A., 2006. *Black aspergilli* and ochratoxin A production in French vineyards. International Journal of Food Microbiology 111, 46–52.

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. International Journal of Food Microbiology 111, 40–45.

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 Microbiology 36, 182–190.

Durney, B.C., Crihfield, C.L., Holland, L.A., 2015. Capillary electrophoresis applied to DNA: determining and harnessing sequence and structure to advance bioanalyses (2009–2014). Analytical and Bioanalytical Chemistry, DOI 10.1007/s00216-015-8703-5.

Egbuta, M.A., Mwanza, M., Njobeh, P.B., Phoku, J.Z., Chilaka, C.A., Dutton, M.F., 2015. Isolation of filamentous fungi species contaminating some Nigerian food commodities. Journal of Food Research 4, 38–50.

Ferracin, L.M., Fier, C.B., Vieira, M.L.C., Vitorello, C.B.M., Varani, A.M., Rossi, M.M., Santos, M.M, Taniwaki, M.H., Iamanaka, B.T., Fungaro, M.H.P., 2012. Strain-specific polyketide synthase genes of *Aspergillus niger*. International Journal of Food Microbiology 155, 137–145.

Filtenborg, O., Frisvad, J.C., Svendsen, J.A., 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. Applied and Environmental Microbiology 45, 581-585.

Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larsen, T.O., Thrane, U., 2007. Fumonisin B_2 production by *Aspergillus niger*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 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, 1-6.

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_2 Production. Foodborne Pathogens and Disease 12, 414-423.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41, 95-98.

Hong, S.B., Cho, H.S., Shin, H.D.; Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2006. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 477–486.

Hong, S.B., Lee, M., Kim, D.H., Varga, J., Frisvad, J.C., Perrone, K.G., Yamada, O., Machida, M., Houbraken, J., Samson, R.A., 2013. *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important *Black Aspergillus* in East Asia. Plos One 8, 1-9.

Iamanaka, B.T., Taniwaki, M.H., Menezes, H.C., Vicente, E., Fungaro, M.H.P., 2005. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. Food Additives and Contaminants 22, 1258–1263.

Iamanaka, B.T., Teixeira, A.A., Teixeira, A.R.R., Copetti, M.V., Bragagnolo, N., Taniwaki, M.H., 2014. The mycobiota of coffee beans and its influence on the coffee beverage. Food Research International 62, 353–358.

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.

Logrieco, A., Ferracane, R., Haidukowsky, M., Cozzi, G., Visconti, A., Ritieni, A., 2009. Fumonisin B_2 production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must. Food Additives and Contaminants 26, 1495–1500.

Logrieco, A.F., Haidukowski, M., Susca, A., Mulè, G., Munkvold, G.P., Moretti, A., 2014. *Aspergillus* section *Nigri* as contributor of fumonisin B_2 contamination in maize. Food Additives and Contaminants Part A 31, 149-155.

Malir, F., Ostry, V. Novotna, E., 2013. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. Toxin Reviews 32, 19-33.

Massi, F.P., Sartori, D., Ferranti, L.S., Iamanaka, B.T., Taniwaki, M.H., Vieira, M.L.C., Fungaro, M.H.P., 2016. Data on the presence or absence of genes enconding essential proteins for ochratoxin and fumonisin biosynthesis in *Aspergillus niger* and *Aspergilus welwitschaie*. Int. J. Food. Microbiol. (Data in Brief, submitted for publication).

Ostry, V., Malir, F., Ruprich, J., 2013. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. Toxins 5, 1574-1586.

Palumbo, J.D., O'Keeffe, T.L., Vasquez, S.J., Mahoney, N.E., 2011. Isolation and identification of ochratoxin A-producing *Aspergillus* section *Nigri* strains from California raisins. Letters in Applied Microbiology 52, 330–336.

Palumbo, J.D., O`Keeffe, T.L., Gorski, L., 2013. Multiplex PCR analysis of fumonisin biosynthetic genes in fumonisin-nonproducing *Aspergillus niger* and *A. awamori* strains. Mycologia 105, 277–284.

Palumbo, J.D., O`Keeffe, T.L., Ho, Y.S., Santillan, C.J., 2015. Occurrence of ochratoxin A contamination and detection of ochratoxigenic *Aspergillus* species in retail samples of dried fruits and nuts. Journal of Food Protection 78, 836–842.

Passamani, F.R.F., Lopes, N.A., Pereira, G.E., Prado, G. Batista, L.R., 2012. *Aspergillus* Section *Nigri* in Grapes Cultivated in the Tropical Winery Region of Brazil. Food and Public Health 2, 276–280.

Pel, H.J., de Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., de Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M.R., Bendtsen, J.D., Benen, J.A.E., van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M.X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P.M., Danchin, E.G.J., Debets, A.J.M., Dekker, P., van Dijck, P.W.M., van Dijk, A., Dijkhuizen, L., Driessen, A.J.M., d'Enfert, C., Geysens, S., Goosen, C., Groot, G.S.P., de Groot, P.W.J., Guillemette, T., Henrissat, B., Herweijer, M., van den Hombergh, J.P.T.W., van den Hondel, C.A.M.J.J., van der Heijden, R.T.J.M., van der Kaaij, R.M., Klis, F.M., Kools, H.J., Kubicek, C.P., van Kuyk, P.A., Lauber, J., Lu, X., van der Maarel, M.J.E.C., Meulenberg, R., Menke, H., Mortimer, M.A., Nielsen, J., Oliver, S.G., Olsthoorn, M., Pal, K., van Peij, N.N.M.E., Ram, A.F.J., Rinas, U., Roubos, J.A., Sagt, C.M.J., Schmoll, M., Sun, J., Ussery, D., Varga, J., Vervecken, W., van de Vondervoort, P.J.J., Wedler, H., Wösten, H.A.B., Zeng, A.P., van Ooyen, A.J.J., Visser, J., Stam, H., 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. Nature Biotechnollogy 25, 221–231.

Perrone, G., Stea, G., Epifani, F., Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2011. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. Fungal Biology 115, 1138–1150.

Pitt, J.I., Taniwaki, M.H., Cole, M.B., 2013. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. Food Control 32, 205-215.

Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., MacDonald, K.D., Bufton, A.W.J., 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics 5, 141-148.

Rocha, M.E.B., Freire, F.C.O., Maia, F.E.F., Guedes, M.I.F., Rondina, D., 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. Food Control 36, 159–165.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. Molecular Biology and Evolution 4, 406–425.

Samson, R.A., Varga, J., 2010. Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. In: Machida M., Gomi K. (Ed.), *Aspergillus*: molecular biology and genomics. Caister Academic Press, United Kingdom, pp. 19–40.

Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, 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.

Scott, P.M., 2012. Recent research on fumonisins: a review. Food Additives and Contaminants 29, 242-248.

Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., Venâncio, A., 2003. *Black Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. International Journal of Food Microbiology 88, 63–68.

Shehu, K., Muhammad, S., 2011. Fungi Associated with Storage Rots of Onion Bulbs in Sokoto. Nigeria. International Journal of Modern Botany 1, 1–3.

Shimizu, K., Nakagawa, H., Hashimoto, R., Hagiwara, D., Onji, Y., Asano, K., Kawamoto, S., Takahashi, H., Yokoyama, K., 2015. The α-oxoamine synthase gene fum8 is involved in fumonisin B_2 biosynthesis in *Aspergillus niger*. Mycoscience 56, 301–308.

Soares, C., Calado, T., Venâncio, A., 2013. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate isolated from harvested maize in three Portuguese regions. Revista Iberoamericana de Micología 30, 9–13.

Storari, M., Dennert, F.G., Bigler, L., Gessler, C., Broggini, G.A.L., 2012. Isolation of mycotoxins producing *black aspergilli* in herbal teas available on the Swiss market. Food Control 26, 157–161.

Susca, A., Proctor, R.H., Mulè, G., Stea, G., Ritieni, A., Logrieco, A., Moretti, A., 2010. Correlation of mycotoxin fumonisin B_2 production and presence of the fumonisin biosynthetic gene *fum8* in *Aspergillus niger* from grape. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 9266–9272.

Susca, A., Perrone, G., Cozzi, G., Stea, G., Logrieco, A.F., Mulè, G., 2013. Multilocus sequence analysis of *Aspergillus* Sect. *Nigri* in dried vine fruits of worldwide origin. International Journal of Food Microbiology 165, 163–168.

Susca, A., Proctor, R.H., Butchko, R.A.E., Haidukowski, M., Stea, G., Logrieco, A., Moretti, A., 2014. Variation in the fumonisin biosynthetic gene cluster in fumonisin-producing and nonproducing *black Aspergilli*. Fungal Genetics and Biology 73 39–52.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. Mega6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30, 2725-2729.

Turner, G., 2010. Genomics and secondary metabolism in *Aspergillus*. In: Machida, M., Gomi, K. (Eds.). *Aspergillus:* Molecular Biology and Genomics. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 139-155.

Tyson, J.L., Fullerton, R.A., 2004. Effect of soil-borne inoculum on incidence of onion black mould (*Aspergillus niger*). Horticultural and Arable Pathology 141, 138–141.

Varga, J., Kocsubé, S., Suri, K., Szigeti, G., Szekeres, A., Varga, M., Tóth, B., Bartók, T., 2010. Fumonisin contamination and fumonisin producing *black Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. International Journal of Food Microbiology 143, 143–149.

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.

Visconti, A., Solfrizzo, M., De Girolamo, A., 2001. Determination of fumonisins B_1 and B_2 in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: Collaborative study. Journal of the Association of Analytical Chemists International 84, 1828-1838.

Tables

Table 1 - Primer sequences used in the multiplex PCR.

Primer name	Primer sequence (5' - 3')	Amplicon size (bp)	Reference
pks-F	TCC TAC GAC TTC ACC GAC AT	554	Ferracin et al., 2012
pks-R	CAT TTC GTT GAT CCC ATC G		
radH-F	AGG CAT CAT CAA ACC CAT CTT	328	This study
radH-R	GAA ATC AAA CAG GCG TCC GA		
fum8vnF1-F*	TCG TTT GAG TGG TGG CAG AAT	128	*Modified from Susca et al., 2010
fum8-R	GTT GGG CAC AGA TAC CAT TTG		
benA-An/Aw F	TGG GCA AAG GGT TGG GTC TT	192	This study
benA-An/Aw R	ACG AGG ACG GCA CGA GGA		

benA-An/Aw - designed for detection of A. niger and A. welwitschiae;
pks - designed for detection of the polyketide synthase gene involved in ochratoxin biosynthesis;
radH - designed for detection of the radH flavin-dependent halogenase gene involved in ochratoxin biosynthesis;
fum8 - designed for detection of the α-oxoamine synthase gene involved in fumonisin biosynthesis.

Table 2 - *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates found in dried fruits, Brazil nuts, coffee beans, grapes, cocoa and onions from Brazil, fumonisin and ochratoxin phenotypes, and mPCR profile detecting the presence or absence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis.

Isolate	Substrate	Geographical origin	Fungal species[a]	Fumonisin phenotype[b]	Ochratoxin phenotype[b]	Multiplex PCR profile			
						A. niger/A. welwitschiae[c]	*fum8*[d]	*radH*[e]	*pks*[f]
UEL 2.4	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
UEL 2.5	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
UEL 2.9	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
UEL 1.1	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 1.2	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 6.59	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 10.108	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 10.109	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 10.116	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 10.118	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 10.120	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 10.134	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 55.1166	Grapes	Pernambuco	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 56.1211	Grapes	Pernambuco	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 10.126	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 10.132	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 10.137	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 10.140	Grapes	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 21.216	Grapes	Rio Grande do Sul	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 2.3	Grapes	Paraná	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
UEL 10.124	Grapes	Paraná	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
UEL 4.17	Grapes	Paraná	*A. niger*	-	-	+	+	-	-

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Isolate	Substrate	Geographical origin	Fungal species[a]	Fumonisin phenotype[b]	Ochratoxin phenotype[b]	Multiplex PCR profile			
						A. niger/A. welwitschiae[c]	*fum8*[d]	*radH*[e]	*pks*[f]
UEL 4.18	Grapes	Paraná	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
UEL 4.19	Grapes	Paraná	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
UEL 4.31	Grapes	Paraná	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
ITAL 57.1278	Grapes	Pernambuco	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
ITAL 53.1059	Grapes	Pernambuco	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
ITAL 55.1161	Grapes	Pernambuco	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
ITAL 4195	Brazil nuts	Amazonas	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 2636	Brazil nuts	Pará	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 6504	Brazil nuts	São Paulo	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 4138	Brazil nuts	Amazonas	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 7061	Brazil nuts	Amazonas	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 2334	Brazil nuts	Pará	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
ITAL 7377	Brazil nuts	Amazonas	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
ITAL 1357	Brazil nuts	Pará	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
ITAL 2504	Brazil nuts	Pará	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
ITAL 1551	Brazil nuts	Pará	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
ITAL 902	Brazil nuts	Pará	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
ITAL 1400	Brazil nuts	Pará	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
ITAL 880	Brazil nuts	Pará	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
ITAL 238	Brazil nuts	Amazonas	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
UEL Ac 16.75	Onions	Paraná	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
UEL Ac 23.115	Onions	Paraná	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 103	Coffee beans	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 213	Coffee beans	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 643	Coffee beans	Paraná	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 8219	Coffee beans	Espírito Santo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 8216	Coffee beans	Espírito Santo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Isolate	Substrate	Geographical origin	Fungal species[a]	Fumonisin phenotype[b]	Ochratoxin phenotype[b]	Multiplex PCR profile			
						A. niger/A. welwitschiae[c]	*fum8*[d]	*radH*[e]	*pks*[f]
ITAL 8191	Coffee beans	Espírito Santo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 113	Coffee beans	São Paulo	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 121	Coffee beans	São Paulo	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 123	Coffee beans	São Paulo	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 186	Coffee beans	São Paulo	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 413	Coffee beans	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 444	Coffee beans	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 15.03	Coffee beans	Minas Gerais	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 219	Coffee beans	São Paulo	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 15.06	Coffee beans	Minas Gerais	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 11.07	Coffee beans	Espírito Santo	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 12.41	Coffee beans	Espírito Santo	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 104	Coffee beans	São Paulo	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 106	Coffee beans	São Paulo	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 109	Coffee beans	São Paulo	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 185	Coffee beans	São Paulo	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 446	Coffee beans	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 418	Coffee beans	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 642	Coffee beans	Paraná	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 8276	Coffee beans	Roraima	*A. niger*	-	-	+	+	+	+
ITAL 105	Coffee beans	São Paulo	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
ITAL 430	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 331	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 499	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 428	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 429	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 180	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Isolate	Substrate	Geographical origin	Fungal species[a]	Fumonisin phenotype[b]	Ochratoxin phenotype[b]	Multiplex PCR profile			
						A. niger/A. welwitschiae[c]	*fum8*[d]	*radH*[e]	*pks*[f]
ITAL 152	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 318	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 150	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 501	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 494	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 249	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 437	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 490	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	-	+	+	+	+	+
ITAL 493	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	-	+	+	+	+	+
ITAL 405	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
ITAL 500	Dried fruits	São Paulo	*A. niger*	-	-	+	+	-	-
ITAL 632	Cocoa	Bahia	*A. niger*	+	+	+	+	+	+
ITAL 1246	Cocoa	Bahia	*A. niger*	+	-	+	+	-	-
UEL 17.179	Grapes	Rio Grande do Sul	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL 2.6	Grapes	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL 2.7	Grapes	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL 2.8	Grapes	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 47.514	Grapes	Pernambuco	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 58.1350	Grapes	Pernambuco	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 48.544	Grapes	Pernambuco	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 47.456	Grapes	Pernambuco	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 49.580	Grapes	Pernambuco	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 55.1175	Grapes	Pernambuco	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 58.1292	Grapes	Pernambuco	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL 33.351	Grapes	Rio Grande do Sul	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 1642	Brazil nuts	Pará	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
ITAL 6951	Brazil nuts	Amazonas	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Isolate	Substrate	Geographical origin	Fungal species[a]	Fumonisin phenotype[b]	Ochratoxin phenotype[b]	Multiplex PCR profile			
						A. niger/A. welwitschiae[c]	*fum8*[d]	*radH*[e]	*pks*[f]
ITAL 6573	Brazil nuts	São Paulo	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
ITAL 361	Brazil nuts	Pará	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
ITAL 6591	Brazil nuts	São Paulo	*A. welwitschiae*	-	-	+	+	-	-
ITAL 716	Brazil nuts	Amazonas	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 6543	Brazil nuts	São Paulo	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 4410	Brazil nuts	Amazonas	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 670	Brazil nuts	Amazonas	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 714	Brazil nuts	Amazonas	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 684	Brazil nuts	Amazonas	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 748	Brazil nuts	Amazonas	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 797	Brazil nuts	Amazonas	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 987	Brazil nuts	Amazonas	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 3738	Brazil nuts	Pará	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 5614	Brazil nuts	Pará	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 15.931	Onions	São Paulo	*A. welwitschiae*	+	+	+	+	+	+
UEL Ac 4.10	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 8.32	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 13.79	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 15.64	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 17.88	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 19.99	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 22.110	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 28.147	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 28.152	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 30.164[a]	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 31.166	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 37.208	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Isolate	Substrate	Geographical origin	Fungal species[a]	Fumonisin phenotype[b]	Ochratoxin phenotype[b]	Multiplex PCR profile			
						A. niger/*A. welwitschiae*[c]	*fum8*[d]	*radH*[e]	*pks*[f]
UEL Ac 37.212	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 40.226	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 42.289	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 44.267	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 45.242	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 46.273	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 47.246	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 48.279	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 53.293	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 54.300	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 49.305	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	+	-	+	+	-	-
UEL Ac 23.117	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	+	-	-
ITAL 16.177	Onions	São Paulo	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	+	+
ITAL 16.192	Onions	São Paulo	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	+	+
ITAL 16.251	Onions	São Paulo	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	+	+
UEL Ac 2.05	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	+	+
UEL Ac 13.83	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	+	+
UEL Ac 52.315	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	+	+
UEL Ac 1.02	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 4.14	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 9.78	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 17.84	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 21.103	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 24.127	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 25.132	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 27.140	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 27.143	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-

(continued on next page)

Table 2 (continued)

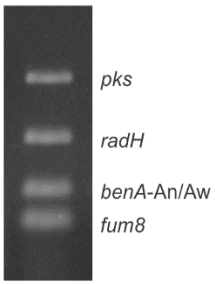
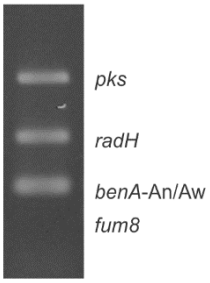
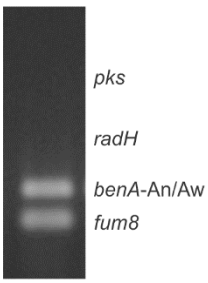
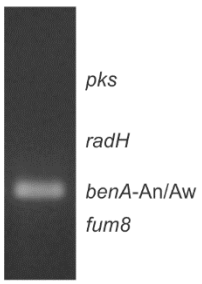
Isolate	Substrate	Geographical origin	Fungal species[a]	Fumonisin phenotype[b]	Ochratoxin phenotype[b]	Multiplex PCR profile			
						A. niger/A. welwitschiae[c]	*fum8*[d]	*radH*[e]	*pks*[f]
UEL Ac 29.154	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 36.203	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 38.215	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 40.231	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 42.288	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 45.236	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 47.248	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 49.304	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 51.314	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 6.21	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 14.53	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 48.282	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 53.295	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL Ac 55.316	Onions	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
UEL 13.09	Coffee beans	Paraná	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 424	Dried fruits	São Paulo	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 425	Dried fruits	São Paulo	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-
ITAL 1113	Cocoa	Bahia	*A. welwitschiae*	-	-	+	-	-	-

[a]Identification by means of CaM sequences;
[b]OTA or FB2 production in Yeast Extract Sucrose Agar (YESA) and CYA with 20% Sucrose Agar (CY20S) respectively;
[c]Identified by the presence of the benA amplicon (192 bp);
[d]Identified by the presence/absence of the fum8 amplicon (128 bp);
[e]Identified by the presence/absence of the radH amplicon (328 bp);
[f]Identified by the presence/absence of the pks amplicon (554bp).

Table 3 - Phenotypic characterization for production of ochratoxin A and fumonisin B_2 by Brazilian *A. niger* and *A. welwitschiae* isolates.

Species	Ochratoxin Phenotype		Fumonisin Phenotype		Both Toxin Phenotype	
	+	-	+	-	+/+	-/-
A. niger (*n*=89)	28 (31.46%)	61 (68.53%)	66 (74.15%)	23 (25.84%)	26 (29.21%)	21 (23.59%)
A. welwitschiae (*n*=86)	1 (1.16%)	85 (98.84%)	29 (33.72%)	57 (66.28%)	1 (1.16%)	57 (66.27%)
Total (*n*=175)	29 (16.57%)	146 (83.42%)	95 (54.28%)	80 (45.71%)	27 (15.42%)	78 (44.57%)

Table 4 - Distinct genotypes of Brazilian *A. niger* and *A. welwitschiae* isolates revealed after mPCR and agarose gel electrophorese.

	PCR Genotype			
Species[a]	Profile 1	Profile 2	Profile 3	Profile 4
				
A. niger (*n*=89)	29	0	60	0
A. welwitschiae (*n*=86)	1	6	30	49
Total (*n*=175)	30	6	90	49

Size of 128 bp, fum8 amplicon;
Size of 192 bp, benA amplicon specific for A. niger/ A. welwitschiae;
Size of 328 bp, radH amplicon;
[a]Identification by means of CaM sequences.

Figure legends

Figure 1 - Alignment of partial β-tubulin gene sequences of all black aspergilli species. The sequences were obtained from the GenBank databases. Priming sites of the primers benA-An/Aw-F and benA-An/Aw-R are boxed. [T] means type strain.

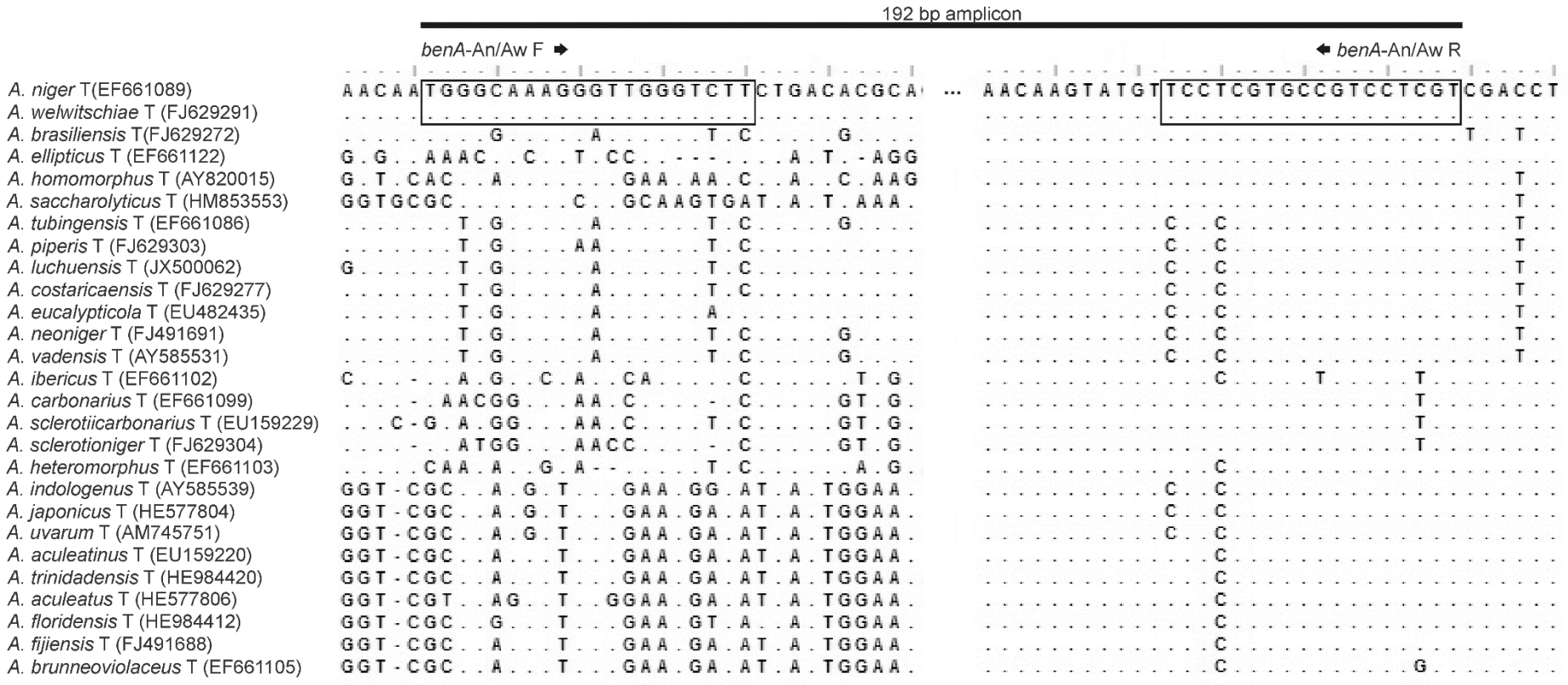


Figure 2 - Specificity of the benA-An/Aw primers for detecting of *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae*. Note that a strong positive signal of 192 bp in length was detected when *A. niger* (lanes 1 to 10) and *A. welwitschiae* (lanes 11 to 20) DNAs were examined. No specific amplification occurred in any of the following non-target species: *Aspergillus uvarum*, *A. aculeatus*, *A. japonicus*, *A. neoniger*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius*, *A. luchuensis*, *A. fijiensis* and *A. brasiliensis* (lanes 21 to 29, respectively). The molecular weight standard (lane MM) is a 1 kb DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, USA).

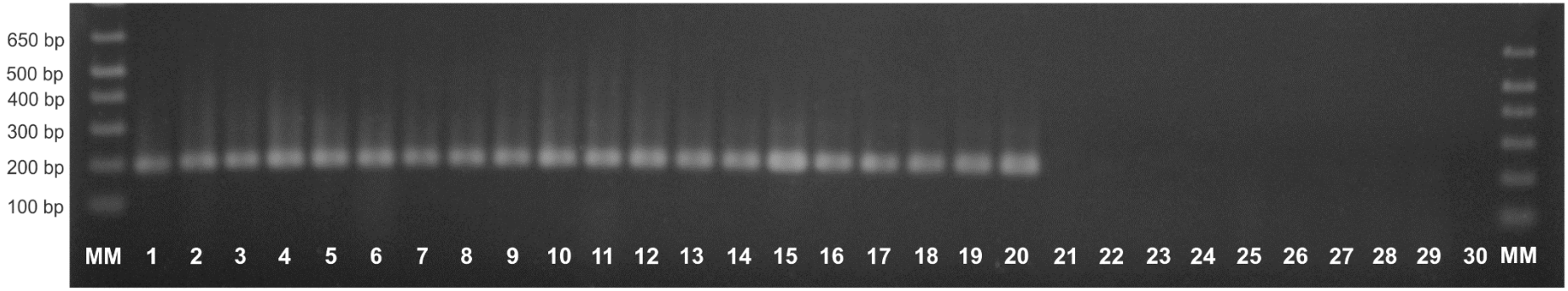
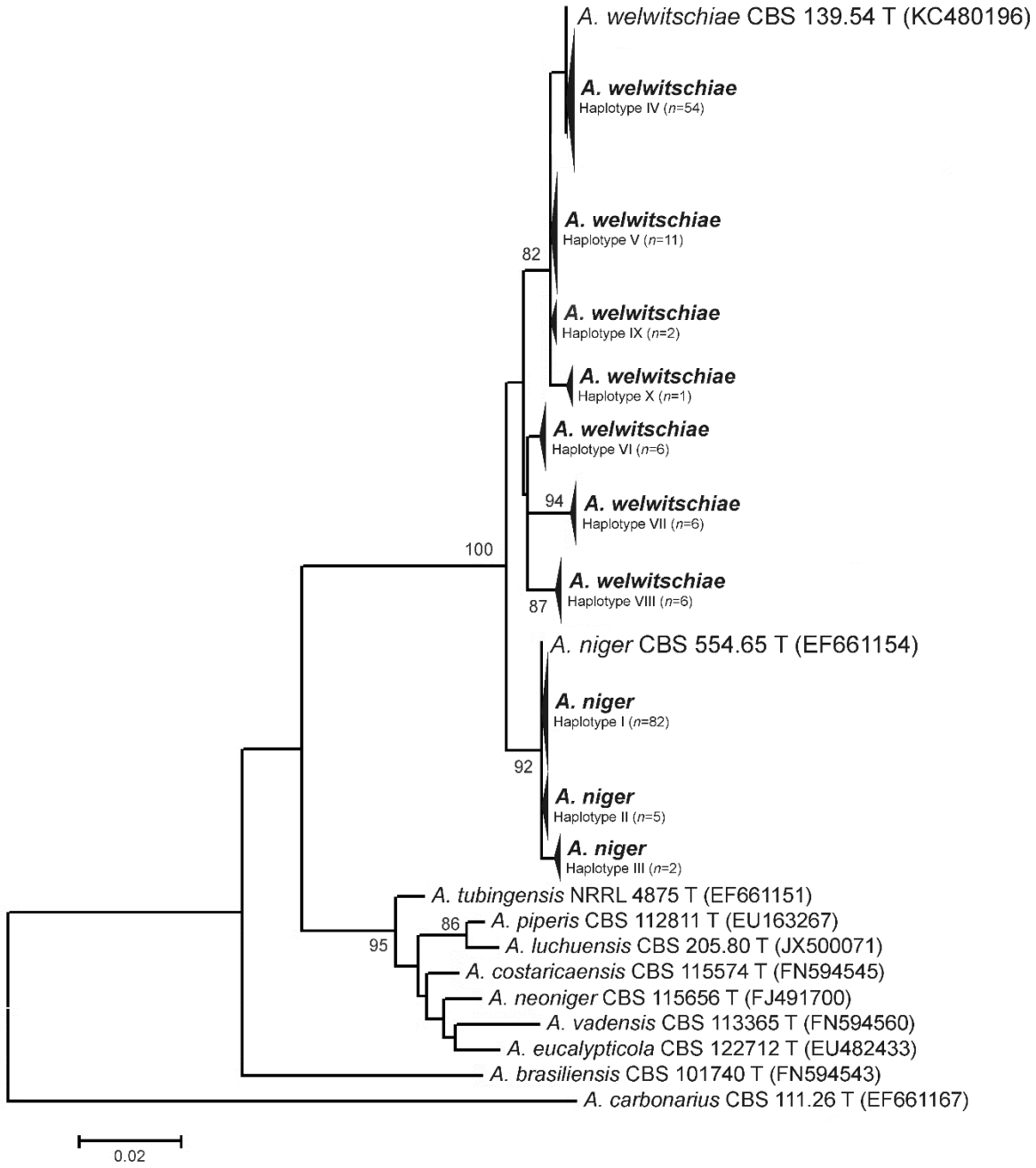


Figure 3 - Neighbor-joining tree reconstructed from the partial calmodulin gene sequences. The sequences of *A. niger*, haplotypes I (KT749947), II (KT749948), III (KT749949) and *A. welwitschiae* haplotypes IV (KT749950), V (KT749951), VI (KT749952), VII (KT749953), VIII (KT749954), IX (KT749955) and X (KT749956) were obtained in the presente study. ^{T} means type strain sequences obtained from GenBank database. The accession numbers of nucleotide sequences are in parenthesis.



Data in Brief

Supplementary Material

Data of the presence or absence of genes encoding essential proteins for ochratoxin and fumonisin biosynthesis in *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*

Abstract

We present the multiplex PCR data for the presence/absence of genes involved in OTA and FB_2 biosynthesis in *Aspergillus niger*/*A. welwitschiae* strains isolated from different food substrates in Brazil. Among the 175 strains analyzed, four mPCR profiles were found: Profile 1 (17 %) highlights strains harboring in their genome the *pks*, *radH* and the *fum8* genes. Profile 2 (3.5%) highlights strains harboring genes involved in OTA biosynthesis i.e. *radH* and *pks*. Profile 3 (51.5%) highlights strains harboring the gene *fum8* gene. Profile 4 (28%) highlights strains not carrying the genes studied herein. This research content is supplemental to our original research article, “Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *A. niger* and *A. welwitschiae*” [1].

Specifications table	
Subject area	Microbiology
More specific subject area	Mycology
Type of data	Figure
How data was acquired	Automated high-resolution capillary electrophoresis (CE). ABI 3500XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA)
Data format	Analyzed

(continued on next page)

Specifications table	
Experimental factors	A total of 175 strains of *A. niger* and *A. welwistchiae* isolated from different food substrates in distinct geographical regions of Brazil were submitted to DNA extraction and multiplex PCR analysis
Experimental features	Multiplex PCR using four primer pairs in one amplification reaction was carried out as described by Massi et al. [1]. The amplified products were analyzed using standard capillary electrophoresis.
Data source location	Brazil
Data accessibility	The data is with this article

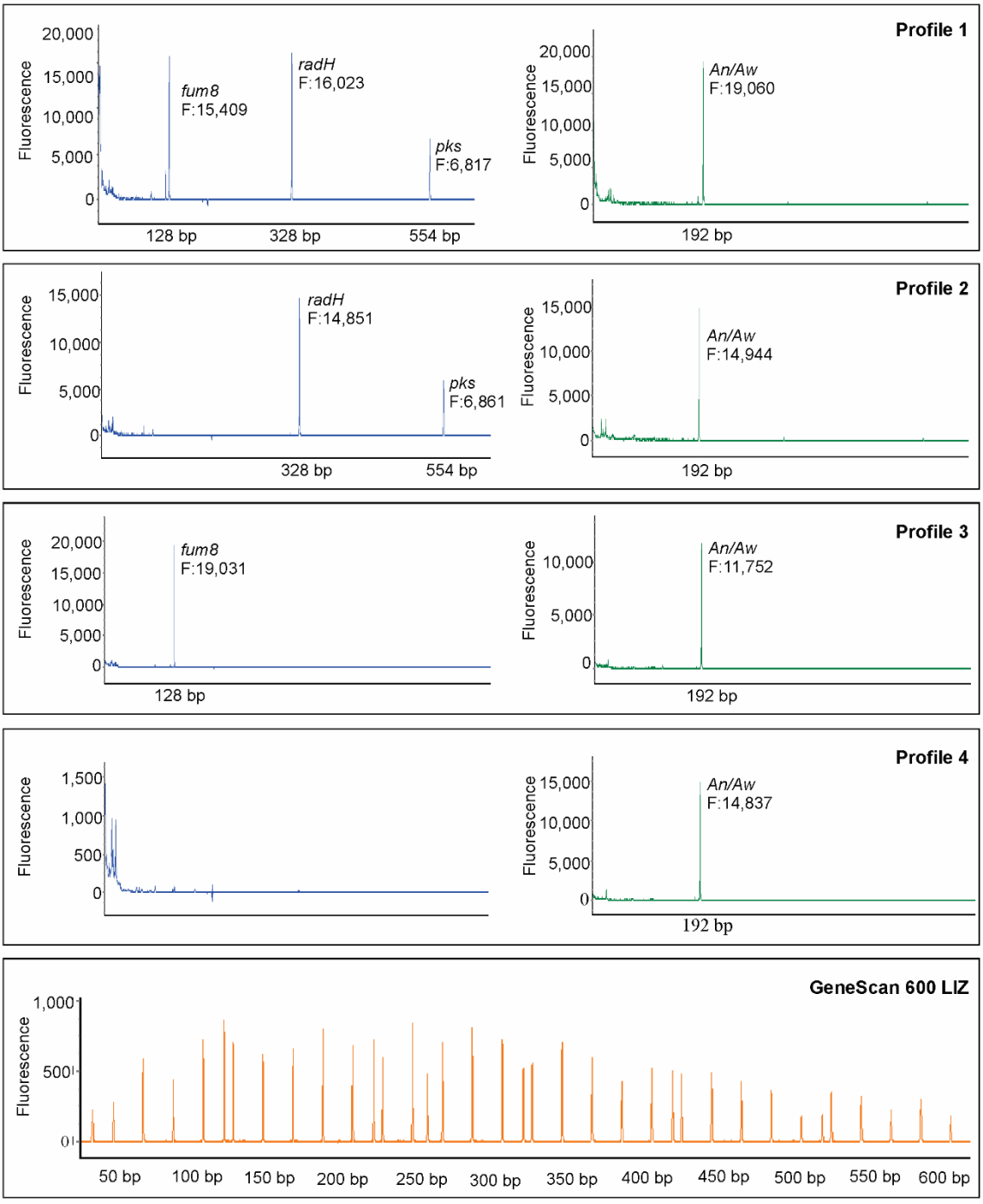
Value of the data

- The methodology presented here is potentially valuable to other researchers for developing similar assays for studying multiple genes simultaneously.
- Particularly, the multiplex PCR as presented here is useful to survey for the occurrence of *A. niger/A. welwitschiae* strains harboring essential genes for ochratoxins and fumonisin biosynthesis.
- The frequency of strains of *A. niger/A. welwitschiae* harboring essential genes for ochratoxins and fumonisin biosynthesis could be compared to that obtained from other countries.
- The multiplex PCR here developed is relevant to evidence specific non-producing mycotoxin phenotypes.

Data

Among 175 *A. niger*/*A. welwitschiae* strains analyzed, we found four mPCR profile (Fig. 1). Profile 1 (17 %) highlights strains harboring the *pks* (shown in blue, 554 bp), *radH* (blue, 328 bp) and *fum8* (blue, 128 bp) genes. Profile 2 (3.5%) highlights strains harboring only genes involved in OTA biosynthesis (*radH* and *pks*). Profile 3 (51.5%) highlights strains harboring only the gene *fum8*. Profile 4 (28%) highlights strains not carrying the mycotoxigenic genes studied herein.

Supplementary figure 1 - Genotype profiles revealed by the ABI 3500XL Genetic Analyser with GeneMarker® Software. Four PCR products amplified with primers labeled with FAM (blue) and HEX (green). Profile 1 indicates that the strain is *A. niger* or *A. welwitschiae* (green, 192 bp), harboring the *pks* (blue, 554 bp), *radH* (blue, 328 bp) and the *fum8* (blue, 128 bp) genes. Profile 2 indicates that the strain is *A. niger* or *A. welwitschiae* harboring the genes involved in OTA biosynthesis i.e. *radH* and *pks*. Profile 3 indicates that the strain is *A. niger* or *A. welwitschiae* harboring the gene *fum8*. Profile 4 indicates that the strain is *A. niger* or *A. welwitschiae* harboring none of genes studied herein.



Experimental design, materials and methods

We used a set of primer-pairs to survey for the presence/absence of genes involved in OTA and FB_2 biosynthesis in *A. niger*/ *A. welwitschiae* strains [1], which were collected from dried fruits (*n*=19), Brazil nuts (*n*=30), coffee beans (*n*=27), grapes (*n*=40), cocoa (*n*=3), and onions (*n*=56). The Brazilian geographical regions where the samples were collected are shown in Fig. 2. The mycotoxigenic genes investigated herein were those encoding a polyketide synthase (*pks*), a flavin-dependent halogenase (*radH*), both involved in ochratoxin biosynthesis, and a α-oxoamine synthase (*fum8*), essential for fumonisin biosynthesis. A pair of *A. niger*/ *A. welwitschiae*-specific primers targeting the β-tubulin gene (*benA*) was also included in the amplification reaction. *Multiplex* amplifications (mPCR) were carried out using four primer-pairs in a single reaction mixture, as described by Massi et al. [1]. Each amplified sample was diluted 10 x and 8.0 µL of (Hi-Di) formamide and 0.3 µL of GeneScan™ 600 LIZ® internal lane size standard (Applied Biosystems, USA) were added to 2 µL of this diluted sample. An ABI 3500XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA) was used to separate and detect the fluorescently labeled PCR products which were analyzed using GeneMarker® Software (SoftGenetics®).

Supplementary figure 2 - Brazilian map depicting the locations from which samples were obtained.

Acknowledgements

This research was supported by the following Brazilian institutions: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 471813/2013-3), Fundação Araucária and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2013/05414-8).

References

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, 221 (2016)19-28.

Research paper

Black aspergilli from onion samples and their potential for mycotoxin production

Abstract

Black aspergilli are responsible for post-harvest losses of some vegetables, including onions, where some species can cause deterioration. Among black aspergilli species, those belonging to *Aspergillus niger* "aggregate" contain morphological characteristics which are very similar; however, *A. niger* and *A. welwitschiae* are the only species that contain strains able to produce mycotoxins, ochratoxin A (OTA) and fumonisin B_2 (FB_2). Therefore, it is important to distinguish them from other non-toxigenic species obtained in Brazilian onion samples as few have been investigated up to now. The aim of this study was to isolate *Aspergillus* section *Nigri* from onion bulb samples acquired monthly in supermarkets and analyzed the fungal isolates by means of multiplex PCR to separate *A. niger/A. welwitschiae* species from the other non-toxigenic species of black aspergilli, as well as detect genes involved with the biosynthesis of OTA and FB_2. The genus *Aspergillus* was found at high frequency (43.4%) among onion bulb samples analyzed. Among the *Aspergillus* species, those belonging to *Aspergillus* section *Nigri* were the most frequent (99.8%). Approximately 97% of the isolates analyzed by multiplex PCR were distinct from the other black aspergilli isolates, as they belong to *A. niger/A. welwitschiae* species. The *fum8* gene, involved in FB_2 biosynthesis, was found in 36.4% of *A. niger/A. welwitschiae* strains, while on the other hand, the *radH* and *pks* genes, involved in OTA biosynthesis, were found in 2.8% of the strains. *A. brasiliensis, A. japonicus, A. tubingensis, A. luchuensis, A. neoniger* and *A. heteromorphus* were not toxigenic species and they were also isolated from onions but at low levels. The presence of OTA and FB_2 was not detected in the onion bulbs analyzed.

Keywords: *Aspergillus* section *Nigri*, ochratoxin A, fumonisin B_2, onion bulbs.

1. Introduction

By means of morphological and physiological criteria, it is not possible to recognize the differences existing between some species of *Aspergillus* section *Nigri* (dubbed the black aspergilli) and an “aggregate“ of species, morphologically very similar, which altogether have been called *Aspergillus niger* “aggregate”. Currently, *Aspergillus brasiliensis, Aspergillus costaricaensis, Aspergillus luchuensis, Aspergillus neoniger, Aspergillus piperis, Aspergillus tubingensis, Aspergillus eucalypticola, Aspergillus vadensis, Aspergillus welwitschiae* and *A. niger* are the species comprising the *A. niger* “aggregate” (Samson et al., 2014).

Among the species assigned to *A. niger* “aggregate”, *A. welwitschiae* and *A. niger sensu stricto* are mycotoxin producers, such as ochratoxin A (OTA) and/or fumonisin B_2 (FB_2). Briefly, mycotoxins are small molecules with adverse effects on animals and humans that are produced as secondary metabolites by some filamentous fungi, mainly those belonging to certain species of the *Aspergillus, Penicillium,* and *Fusarium* genera (Varga, Baranyi, Chandrasekaran, & Vágvölgyi, 2015; Alshannaq & Yu, 2017; Escrivá, Font, Manyes, & Berrada, 2017).

Members of the *A. niger* “aggregate” are frequently responsible for post-harvest losses of some vegetables; moreover, these fungi can also contaminate them with mycotoxins. Several factors affect mycotoxin production including the location of the crop field, the cultural practices adopted and, more importantly, the storage conditions (Barkai-Golan & Paster, 2008).

Onions are one of the most consumed fresh vegetables worldwide. In Brazil, onions are the third vegetable crop of economic importance, and the most recent survey on agricultural production showed that 57,839 hectares were planted yielding 1.7 million tons of bulbs (IBGE/LSPA, 2017). However, fungal diseases can cause significant losses during storage, mainly under tropical and subtropical conditions. The black mould is one of the predominant post-harvest onion diseases, which was initially recognized as caused by *A. niger* (Walker & Lindergren, 1924). The disease is characterized by the presence of a black discoloration at the neck, shallow lesions on the outer scales, streaks of black mycelium and conidia beneath the outer dry

scales and a black discoloration in bruised areas (reviewed in Kumar, Neeraj, Sharma, & Sagar, 2015).

Not too long ago, the taxon *A. niger* was dismembered into *A. welwitschiae* and *A. niger* (Perrone et al., 2011; Hong et al., 2013). These two species are frequently found in food crops, and both are FB_2 and OTA producers (Abarca, Bragulat, Castellá, & Cabañes, 1994; Frisvad, Smedsgaard, Samson, Larsen, & Thrane, 2007; Perrone et al., 2011). OTA is a nephrotoxic and carcinogenic mycotoxin and FB_2 has neurotoxicity and hepatotoxicity in animal species, and has also been associated with esophageal cancers in humans (Voss & Riley, 2013; Malir, Ostry, Pfohl-Leszkowicz, Malir, & Toman, 2016).

Considering the inherent risk of *A. niger* and *A. welwitschiae* occurrence on foodstuffs, several molecular methods have been developed for distinguishing these toxigenic species from the non-toxigenic *A. niger* "aggregate", including the use of the primer-pair *benA*-An/Aw. Using this primer-pair all PCRs containing *A. niger* or *A. welwitschiae* template DNA produce an amplicon of 192 bp in length (Massi et al., 2016).

Not all strains of *A*. *niger* and *A. welwitschiae* are able to produce OTA or FB_2. Based on this statement, some authors have investigated the presence of some essential genes involved in the synthesis of the OTA or FB_2 in *A. niger* and *A. welwitschiae* strains isolated from foodstuffs aiming to predict the contamination risk (Susca et al., 2010; Ferracin et al., 2012; Susca et al., 2014; Massi et al., 2016; Susca et al., 2016). It is consensual that the *fum8* (α-oxoamine synthase) and the *pks* An15g07920 (polyketide synthase) genes are required, respectively, for production of FB_2 and OTA by *Aspergillus* (Shimizu et al., 2015; Massi et al., 2016; Zhang, Apaliya, Mahunu, Chen, & Li, 2016). Based on this, our group developed a multiplex PCR to survey the frequency of *A. niger*/*A. welwitschiae* strains harboring these OTA and FB_2 essential genes (Massi et al., 2016).

Because there are very few studies on the presence of *A. niger* and *A. welwitschiae* in onion bulbs, including the potential risk assessment associated with the mycotoxin production (Varga et al., 2012; Gherbawy et al., 2015; Massi et al., 2016), the aim of this study was to isolate *Aspergillus* section *Nigri* from onion bulb samples acquired monthly in supermarkets, during two consecutive years, and analyze approximately 500 fungal isolates using the above mentioned multiplex PCR

procedure. Moreover, the occurrence of mycotoxins was investigated in onion samples positive for *Aspergillus* strains harboring OTA and FB_2 essential genes.

2. Material and methods

2.1 Isolation of fungi from onion samples

Onion bulb samples (*Allium cepa* L.) yellow variety commercialized in the supermarkets in the Londrina region, Paraná State, south of Brazil were analyzed in relation to the presence of fungi. Ninety-six samples of onion bulbs (approximately 0,3 kg each) were collected monthly from January/2014 to December/2015, from different supermarkets and were transferred into the Laboratory. Approximately 0,15 Kg of each sample were kept at 4°C for mycotoxin analysis and 0,15 Kg of each sample were used for fungal analysis. Outer dry and the inner fleshy scales of the onions were cut (1x1 cm) and disinfected superficially by immersion in 0.4% sodium hypochlorite solution (NaOCl) for 2 min (Pitt & Hocking, 2009). The excess moisture was removed by blotting on sterile filter paper. One hundred pieces of scales (outer dry and inner fleshy) from the bulb were plated in Dichloran 18% Glycerol agar (DG18 agar) (Hocking & Pitt, 1980). A portion containing adventitious roots of the onion bulb samples were equally disinfected and plated. The plates were incubated at 25°C for 5-7 days. The incidence of fungal genera were determined morphologically (Pitt & Hocking, 2009; Samson et al., 2014; Visagie et al., 2014). Approximately, 48 colonies that had the appearance of belonging to *Aspergillus* section *Nigri* in onion bulb samples (outer dry, inner fleshy and adventitious roots) monthly analyzed were isolated and purified in Czapek Yeast Autolysate agar (CYA agar - Pitt, 1979) and incubated at 25 ºC for 7 days.

2.2 DNA extraction from *Aspergillus* section *Nigri* and multiplex PCR

A total of 500 *Aspergillus* section *Nigri* isolates, representing colonies of all samples obtained at random, were grown in liquid Complete Medium (Pontecorvo,

Roper, Hemmons, MacDonald, & Buffon, 1953) at 25°C for 24 hours. The mycelia were collected, frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder. Genomic DNA was extracted using the BioPur Mini Spin Extraction Kit® (Biometrix, Brazil), according to manufacturer's instructions. All of them were analyzed using the multiplex PCR methodology, as described by Massi et al. (2016), in order to distinguish *A. niger/A. welwitschiae* species from the remainder species of the *A. niger* "aggregate" and also to characterize the strains for the presence or absence of two genes required for ochratoxin biosynthesis (*radH* gene, locus tag An15g07880 of *A. niger* CBS 513.88, and the *pks* gene, locus tag An15g07920 of *A. niger* CBS 513.88), respectively encoding one halogenase dependent flavin and one polyketide synthase, and one gene required for fuminisin B_2 synthesis (*fum8* gene, locus tag An01g06870 of *A. niger* CBS 513.88) enconding one α-oxoamine synthase.

2.3 Partial calmodulin gene sequence analyses

Thirteen black aspergilli isolates PCR-negative for *A. niger/A. welwitschiae* species were subjected to partial sequencing of the calmodulin (*CaM*) gene in order to identify them. In addition, 242 *A. niger/A. welwitschiae* isolates (identified by means of multiplex PCR) were randomly sampled to confirm their identity and also to distinguish one from the other. The *CaM* amplicon obtained using the primer-pair cmd5/cmd6, according to the protocol described by Hong et al. (2006), was purified using ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences, UK). The purified amplicon was sequenced using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA), on a ABI3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). The sequences obtained were aligned with sequences from all *Aspergillus* section *Nigri* type strains available in the NCBI database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) using ClustalW and BioEdit software (Hall, 1999). Phylogenetic analysis was performed by MEGA7 software (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016) using the method of Maximum Likelihood (ML) with the best model. To determine the support for each clade, bootstrap analysis was performed with 1,000 replicates.

2.4 Analyses of ochratoxin A and fumonisin B_2 of onion bulb samples

Pool of onion samples (*n*=8), each composed of approximately 0,5 Kg of inner scales, infected with *A. niger/A. welwitschiae* strains harboring the *radH* and *pks* and/or *fum8* genes (identified by using the multiplex PCR) and obtained in the four seasons of the year were analyzed for contamination with ochratoxin A and fumonisin B_2.

For OTA analysis, 25 g of crushed inner scales was used. OTA was extraction using methanol:sodium bicarbonate 3% (1:1, v/v) homogeneized in a shaker, filtered using a quantitative paper filter (Nalgon, Germany) and a glass fiber filter (Vicam, USA). The extract was diluted with phosphate buffer saline (PBS) and applied to an immunoaffinity column (OchraTest^{TM} WB-Vicam, USA). OTA was eluted with HPLC grade methanol. The dried extracted was resuspended with mobile phase methanol:acetonitrile:water:acetic acid (35:35:29:01, v/v/v/v), with an isocratic flow rate of 0.8 mL/min. The detection and quantification were performed using Shimadzu LC-10VP HPLC System (Shimadzu Coporation, Japan) with fluorescence detection RF-10AxL model set at 333 nm excitation and 477 nm emission. The detection limit of the method was determined by the analysis of 8 repetitions of onion samples contaminated with lower levels of OTA (0.3 μg/Kg). Chromatographic separation was achieved using a Shimadzu Shimpack (5 μm, 4.6x250 mm). The positive daily control was performed, contaminating a sample with OTA standard (Sigma, St Louis, USA). This analysis was carried out according to Vargas et al. (2005).

For FB_2 analysis, 5 g of crushed inner scales were used. FB_2 was extraction using methanol:acetonitrile:water (25:25:50, v/v/v), homogeneized in a shaker, filtered using a quantitative paper filter (Nalgon, Germany). The extract was completed with PBS, filtered using glass fiber filter (Vicam, USA) and applied to immunoaffinity column (FumoniTestWB, Vicam, USA). FB_2 was eluted with HPLC grade metanol. The dried extracted was resuspended with acetonitrile:water (1:1, v/v), adding ortho-phthaldialdehyde reagente (OPA) for the derivatization of fumonisins. The detection and quantification was performed using Shimadzu LC-10VP HPLC System (Shimadzu Coporation, Japan) with a fluorescence detector set at 335 nm excitation and 440 nm emission. The detection limit of the method was determined by the analysis of 8 repetitions of onion samples contaminated with lower levels of FB_2 (0.25 μg/g). Chromatographic separation was achieved using a Shimadzu YMC column (5 μm, 4.6x250 mm), 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 positive daily control was performed, contaminating a sample with FB_2 standard (0,5 µg/mL) (Sigma-Aldrich, USA). This analysis was carried out according to Vicam's protocol (FumoniTestWB).

3. Results

3.1 Occurrence of *Aspergillus* section *Nigri* species in onion samples

All outer dry scales, inner fleshy scales and all portion containing adventitious root samples analyzed herein showed fungal infection. The predominant fungal genera observed in all onion samples were *Penicillium* (51.1%) and *Aspergillus* (43.4%). Other fungal genera were observed at low frequency (5.4%). The highest incidence of fungi was observed in the inner scales (50.8%), followed by outer dry scales (41.0%) and adventitious roots (8.2%).

Among the *Aspergillus* counted in onion samples, those belonging to the *Aspergillus* section *Nigri* were the most frequent (99.8%; *n*=8,398 colonies), which was found in 98% (94/96) of the onion bulb and adventitious root samples. The frequency of occurrence, average and range of infection by *Aspergillus* section *Nigri* species are given in Table 1 and their incidence in onion bulb samples acquired monthly, in supermarkets (Londrina, Paraná State, Brazil) during two consecutive years (from January/2014 to December/2015) and the four seasons of the year is shown in Figure 1.

3.2 Detection of *Aspergillus niger*/*Aspergillus welwitschiae* harboring the *radH*, *pks* and *fum8* genes

According to multiplex PCR results, performed on 500 strains randomly sampled out of 8,398 *Aspergillus* section *Nigri* counted as from onion samples, 97.4% (487 strains) were recognized as *A. niger/A. welwitschiae*. Only 13 strains

(2.6%) did not reveal the predicted amplicon when using the specific primers developed for detecting *A. niger/A*. *welwitschiae* (Table 2).

Among the *A. niger/A. welwitschiae* strains, 36.5% (178 strains in 487) harbor the essential gene for fumonisin synthesis, *fum8*. About 2.8% (14 strains in 487) of them harbor the *radH* and *pks* genes, both involved in ochratoxin synthesis. It is worth noting that *A. niger/A. welwitschiae* strains not harboring those genes were the majority (61.2%; 298 strains in 487).

3.3 Species identification based on partial sequencing of the calmodulin gene

The *Aspergillus* section *Nigri* strains (*n*=13) that did not reveal any multiplex PCR product were subjected to partial sequencing of the calmodulin (*CaM*) gene with the aim of identifying them. Four strains were phylogenetically identified as *A. brasiliensis*, three as *A. japonicus*, two as *A. tubingensis*, two as *A. luchuensis*, one as *A. neoniger*, and one as *A. heteromorphus* (Figure 2).

Among the 487 strains recognized as *A*. *niger/A*. *welwitschiae,* approximately half of them (*n*= 242) were also subjected to partial sequencing of the *CaM* gene to confirm their identity but also to distinguish one from the other. Based on the percent identity found using BLASTn and on a phylogenetic inference (data not shown), 237 strains (97.9%) were identified as *A. welwitschiae* and only five (2.1%) as *A. niger.*

3.4 Ochratoxin A and fumonisin B_2 detection

Ochratoxin A and fumonisin B_2 were not detected in all onion samples (*n*=8) infected with *A. niger/A. welwitschiae* strains harboring essential genes for the synthesis of these mycotoxins with the lowest detection limit of 0.1 µg/kg and 0.04 µg/g, respectively for OTA and FB_2.

4. Discussion

Fungi are distributed worldwide and depending on the geographical and climatic conditions, different fungal species can invade foods and produce mycotoxins (Afsah-Hejri, Jinap, Hajeb, Radu, & Shakibazadeh, 2013). There are very few studies on the presence of toxigenic fungi in Brazilian onion bulbs, including the potential risk assessment associated with mycotoxin production (Massi et al., 2016). In our study we investigated the fungal incidence in onion bulb samples purchased monthly, during two consecutive years (2014 and 2015), in Paraná State, Brazil. Similar to the onion bulbs market in Korea (Sang, Han, Oh, Chun, & Kim, 2014), Hungary (Varga et al., 2012), Saudi Arabia (Gherbawy et al., 2015), Bangladesh (Ara, Khatun, & Ashrafuzzaman, 2008) and Nigeria (Samuel & Ifeanyi, 2015), *Penicillium* and *Aspergillus* were the genera most frequently found.

Aspergillus section *Nigri,* an important group of species in food mycology, was isolated from 98% of the onion samples. The highest incidence of these fungi was observed in the inner scales (57,9%), followed by the outer scales (34.7%) and adventitious roots (7.3%). These results differed from the findings of El-Nagerabi & Ahmed (2003) who reported more incidence of black aspergilli in the outer dry scales than in the inner scales in post-harvest onion samples grown in Sudan.

The incidence of *Aspergillus* section *Nigri* in onion samples varied depending on the month of the year. In 2014, the lower incidences of *Aspergillus* section *Nigri* was observed from July to November and in 2015 from May to August, however, the higher incidences occurred in warmer months that favor *Aspergillus* group species development. There are no reports of the fungal incidence accompanied monthly during long periods in onion samples analyzed worldwide.

The multiplex PCR procedure described by Massi et al. (2016) allowed *A. niger/A. welwitschiae* strains to be distinguished from the remainder *Aspergillus* section *Nigri* species. Out of 500 fungal isolates, randomly sampled monthly, *A*. *niger*/*A*. *welwitschiae* were much more frequent than others *A. niger* “aggregate” species, in all months of the year herein investigated. These results are in accordance with several reports that have been shown *A. niger* (Jidda & Benjamin, 2016; Mohammed, Ayansina, & Wassagi, 2015; Samuel & Ifeanyi, 2015; Shehu & Muhammad, 2012) or *A*. *welwitschiae* (Gherbawy et al., 2015; Sang et al., 2014; Varga et al., 2012) as the prevalent species in onion bulbs.

According to the literature, not all the strains of *A*. *niger/A. welwitschiae* are able to produce OTA or FB_2 (Frisvad et al., 2011; Gherbawy et al., 2015; Massi et al., 2016; Palumbo, Keeffe, & Gorski, 2013; Storari, Dennert, Bigler, Gessler, & Broggini, 2012; Susca et al., 2010, 2014; Varga et al., 2010). The loss of ochratoxin A production in *A. niger* and *A. welwitschiae* is highly associated with gene deletions within the ochratoxin biosynthetic gene cluster. The loss of fumonisin production in *A. welwitschiae* is also mainly associated with gene deletions within the fumonisin biosynthetic gene cluster, but this is not the case with *A. niger* (Massi et al., 2016). Based on this statement, some authors have investigated the presence of some essential genes involved in the synthesis of the OTA or FB_2 in *A. niger* and *A. welwitschiae* strains isolated from foodstuffs with the aim of to predicting the contamination risk (Ferracin et al., 2012; Massi et al., 2016; Susca et al., 2010, 2014, 2016) and nowadays or in fact, it is the consensus that the presence and the expression of the *fum8* (α-oxoamine synthase) is required for production of FB_2 and *pks* An15g07920 (polyketide synthase) and *radH* (flavin-dependent halogenase) genes are required for production of OTA by *Aspergillus* strains.

The use of the multiplex PCR procedure as commented on the material and methods section (describe by Massi et al., 2016), besides distinguishing *A. niger/A. welwitschiae* from the remainder of the *A. niger* “aggregate” species it also allowed for the detect of the presence of the essential genes for FB_2 (*fum8*) and OTA (*pks* and *radH*) production. Among the 500 isolates analyzed in the present study the majority (97.2%) do not have the *radH* and *pks* genes involved in ochratoxin biosynthesis in the genome. Similarly to our results, Gherbawy et al. (2015) reported that the *pks* gene involved in OTA biosynthesis was missing in 37 *A. welwitschiae* isolates collected from onion samples market in Saudi Arabia. Regarding to the *fum8* gene involved in FB_2 production, 36.5% of the strains were PCR positive. Susca et al. (2014) studied isolates of *A. niger* and *A. welwitschiae* recovered from grapes and reported that the *fum8* gene is present in only 40% of *A. welwitschiae* strains, but all *A. niger* strains have this gene into their genome. The Susca study on gene content and organization of the *fum* cluster in FB_2-nonproducing isolates of *A. niger* and *A welwitschiae* provide evidence that the *fum* cluster in nonproducing isolates of *A niger* includes all 11 *fum* genes, whereas the cluster in nonproducing isolates of *A welwitschiae* have undergone a large deletion. The genetic basis for fumonisin non

production in isolates of *A welwitschiae* is consistent with the absence of *fum* genes, although in *A. niger* it remains unclear (Susca et al., 2014, 2016).

Perrone and coauthors have shown that the *CaM* sequence can be used to distinguish between *A. niger* and *A. welwitschiae* (Perrone et al., 2011) and based on this type of gene sequence some authors reported that *A. niger* and *A. welwitschiae* can vary in their frequencies of occurrence in different hosts (Susca et al., 2016, and reference therein). *A. welwitschiae* was described as occurring more frequently than *A. niger* in onion bulbs marketed in Brazil (Massi et al., 2016) and Saudi Arabia (Gherbawy et al., 2015). In order to confirm that these observations were not casual, we selected monthly for 24 months, *A. niger*/*A. welwitschiae* isolates to be subjected to partial sequencing of *CaM* with the aim of distinguishing one from the other. Based on percent of identity provided by BLASTn and on a phylogenetic tree (data not shown), 98% of the strains were identified as *A. welwitschiae.* This species was, during all months of the year, the most frequent one.

The 13 *Aspergillus* section *Nigri* isolates that did not give any PCR product when using *A*. *niger/A*. *welwitschiae*-specific primers were identified as *A. brasiliensis* (*n*=4), *A. japonicus* (*n*=3), *A. tubingensis* (*n*=2), *A. luchuensis* (*n*=2), *A. neoniger* (*n*=1), *A. heteromorphus* (*n*=1). All these species were described as occurring in onion bulbs for the first time and none of them are ochratoxin A and/or fumonisin B_2 producers.

The onion samples infected with fungal isolates harboring the *radH* and *pks* genes and/or with fungal isolates harboring the *fum8* gene, purchased during the four seasons of the years 2014 and 2015, did not present a detectable level of OTA and FB_2. These results are in accordance with Van de Perre et al. (2012) who reported that OTA and FB_2 were not detected in onion samples from Belgium, Brazil, Egypt, and India. However, Varga et al. (2012) reported that two samples of the six examined onion samples from Hungary were found to be contaminated with fumonisin isomers include fumonisins B^2-4, 3-epi-FB^4, iso-FB^1 (FB^6) and an iso-FB^2,3 form. More recently Gherbawy et al. (2015) also reported the detection of FB_2 in onion samples from Saudi Arabia.

4. Conclusion

Our study has shown that *Aspergillus* section *Nigri* is very frequently found in onion bulbs purchased in south of Brazil. Among the *Aspergillus* section *Nigri* species, *A. welwitschiae* was the most prevalent in all seasons of the year. Essential genes involved in ochratoxin A synthesis were missing in almost all *A. welwitschiae* strains, and this mycotoxin was not detected in onion bulbs. Even though the *fum8* gene required for fumonisin synthesis was found in approximately 36% of the strains, this mycotoxin was not detected in the onion bulbs.

Acknowledgment

This research was supported by the following Brazilian institution: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castellá, G., & Cabañes, F. J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*, 2650–2652.

Afsah-Hejri, L., Jinap, S., Hajeb, P., Radu, S., & Shakibazadeh, S. (2013). A review on mycotoxins in food and feed: Malaysia case study. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*, 629–651.

Alshannaq, A., & Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *14*, 1-20.

Ara, M. A. M., Khatun, M. L., & Ashrafuzzaman, M. (2008). Fungi causing rots in onions at storage and market. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, *6*, 245–251.

Barkai-Golan, R., & Paster, N. (2008). Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 2. *World Mycotoxin Journal*, *1*, 385–396.

El-Nagerabi, S. A. F., Ahmed, A. H. M. (2003). Storability of Onion Bulbs Contaminated by *Aspergillus niger* Mold. *Mycology, 31*, 515–523.

Escrivá, L., Font, G., Manyes, L., & Berrada, H. (2017). Studies on the presence of mycotoxins in biological samples: An overview. *Toxins*, *9*, 1-33.

Ferracin, L. M., Fier, C. B., Vieira, M. L. C., Monteiro-Vitorello, C. B., Varani, A. de M., Rossi, M. M., Muller-Santos, M., Taniwaki, M. H., Iamanaka, B. T., & Fungaro, M. H. P. (2012). Strain-specific polyketide synthase genes of *Aspergillus niger*. *International Journal of Food Microbiology*, *155*, 137–145.

Frisvad, J. C., Larsen, T. O., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R. A., & Nielsen, K. F. (2011). Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS ONE*, *6*, 2–7.

Frisvad, J. J., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O., & Thrane, U. (2007). Fumonisin B_2 Production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 9727–9732.

Gherbawy, Y., Elhariry, H., Kocsubé, S., Bahobial, A., El Deeb, B., Altalhi, A., Varga, J., & Vágvölgyi, C. (2015). Molecular Characterization of Black *Aspergillus* Species from Onion and Their Potential for Ochratoxin A and Fumonisin B_2 Production. *Foodborne Pathogens and Disease*, *0*, 1-10.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series, 41*, 95-98.

Hocking, A. D., & Pitt, J. I. (1980). Dichloran-Glycerol Medium for Enumeration of Xerophilic Fungi from Low-Moisture Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, *39*, 488–492.

Hong, S.-B., Cho, H.-S., Shin, H.-D., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2006). Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*, 477–86.

Hong, S. B., Lee, M., Kim, D. H., Varga, J., Frisvad, J. C., Perrone, G., Gomi, K., Yamada, O., Machida, M., Houbraken, J., & Samson, R. A. (2013). *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia. *PloS One*, *8*, 1-9.

IBGE/LSPA. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (2017). https://ww2.ibge.gov.br. Accessed 10 January 2017.

Jidda, M. B., & Benjamin, F. (2016). Identification of Fungi Associated with Storage Bulb Rot and Seed of Onion (*Allium cepa* L .) in Maiduguri , Northeastern Nigeria. *International Journal of Modern Botany, 6*, 26–30.

Kumar, V., Neeraj, Sharma, S., & Sagar, N. A. (2015). Post Harvest Management of Fungal Diseases in Onion - A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *4*, 737–752.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution, 33*, 1870-1874.

Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., & Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*, *8*, 12–15.

Massi, F. P., Sartori, D., Ferranti, L. de 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*. *International Journal of Food Microbiology*, *221*, 19–28.

Mohammed, J. N., Ayansina, A. D. V., Wassagi, H. F. (2015). Mycological evaluation of spoilt onion bulbs sold in Lapai town. *Jewel Journal of Scientific Research, 3*, 94-100.

Palumbo, J. D., Keeffe, T. L. O., & Gorski, L. (2013). Multiplex PCR analysis of fumonisin biosynthetic genes in fumonisin-nonproducing *Aspergillus niger* and *A. awamori* strains. *Mycologia, 105*, 277–284.

Perrone, G., Stea, G., Epifani, F., Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology*, *115*, 1138–1150.

Pitt, J. I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. *Academic Press Inc*, London.

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and Food Spoilage (3th ed.). Springer.

Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D., Buffon, A. W. J. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics, 5*, 141-148.

Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrones, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsube, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., & Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, *78*, 141–173.

Samuel, O., & Ifeanyi, O. (2015). Fungi Associated with the Deterioration of Post-harvest Onion Bulbs Sold in Some Markets in Awka, Nigeria. *Bioengineering and Bioscience*, *3*, 90–94.

Sang, M. K., Han, G. D., Oh, J. Y., Chun, S. C., & Kim, K. D. (2014). *Penicillium brasilianum* as a novel pathogen of onion (*Allium cepa* L.) and other fungi

predominant on market onion in Korea. *Crop Protection*, *65*, 138–142.

Shehu, K., & Muhammad, S. (2012). Fungi Associated with Storage Rots of Onion Bulbs in Sokoto. Nigeria. *International Journal of Modern Botany*, *1*, 1–3.

Shimizu, K., Nakagawa, H., Hashimoto, R., Hagiwara, D., Onji, Y., Asano, K., Kawamoto, S., Takahashi, H., & Yokoyama, K. (2015). The a-oxoamine synthase gene fum8 is involved in fumonisin B_2 biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Mycoscience*, *56*, 1–8.

Storari, M., Dennert, F. G., Bigler, L., Gessler, C., & Broggini, G. A. L. (2012). Isolation of mycotoxins producing black aspergilli in herbal teas available on the Swiss market. *Food Control*, *26*, 157–161.

Susca, A., Proctor, R. H., Butchko, R. A. E., Haidukowski, M., Stea, G., Logrieco, A., & Moretti, A. (2014). Variation in the fumonisin biosynthetic gene cluster in fumonisin-producing and nonproducing black aspergilli. *Fungal Genetics and Biology*, *73*, 39–52.

Susca, A., Proctor, R. H., Morelli, M., Haidukowski, M., Gallo, A., Logrieco, A. F., & Moretti, A. (2016). Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1-16.

Susca, A., Proctor, R. H., Mulè, G., Stea, G., Ritieni, A., Logrieco, A., & Moretti, A. (2010). Correlation of mycotoxin fumonisin B_2 production and presence of the fumonisin biosynthetic gene fum8 in *Aspergillus niger* from grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 9266–9272.

Van de Perre, E., Jacxsens, L., Meulenaer, B. (2012). Screening of mycotoxins in tomatoes, onions, bell peppers, soft red fruits and derived tomato products with LC-TOF-MS. May 16th 2012, Braunschweig, 34. Mycotoxin Workshop. Conference Abstracts Braunschweig, Germany.

Varga, J., Baranyi, N., Chandrasekaran, M., & Vágvölgyi, C. (2015). Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: an update. *Acta Biologica Szegediensis*, *59*, 151–167.

Varga, J., Kocsubé, S., Suri, K., Szigeti, G., Szekeres, A., Varga, M., Tóth, B., & Bartók, T. (2010). Fumonisin contamination and fumonisin producing black Aspergilli in dried vine fruits of different origin. *International Journal of Food Microbiology*, *143*, 143–149.

Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Man, V., Tóth, B., Vágvölgyi, C., & Bartók, T. (2012). Black Aspergilli and fumonisin contamination in onions purchased in Hungary. *Acta Alimentaria*, *41*, 414–423.

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. *Journal of AOAC International Main*, *88*, 773-779.

Visagie, C. M., Hirooka, Y., Tanney, J. B., Whitfield, E., Mwange, K., Meijer, M., Amend, A. S., Seifert, K. A., Samson, R. A. (2014). *Aspergillus, Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. *Studies in Mycology*, *78*, 63–139.

Voss, K. A., & Riley, R. T. (2013). Fumonisin Toxicity and Mechanism of Action: Overview and Current Perspectives. *Food Safety*, *1*, 2013006–2013006.

Walker, B. J. C., & Lindergren, C. C. (1924). Fuether studies on relation of onion scale pigmentation to disease resistance. *Journal of Agricultural Research*, *XXIX*, 507–514.

Zhang, H., Apaliya, M. T., Mahunu, G. K., Chen, L., & Li, W. (2016). Control of Ochratoxin A-Producing Fungi in Grape Berry by Microbial Antagonists: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, *51*, 88–97.

Tables

Table 1 – Frequency of occurrence, average of infection and range of infection with *Aspergillus* section *Nigri* species in inner scales, outer scales and adventitious roots of onion samples (*n*= 96).

	Inner scales	Outer scales	Adventitious roots
FO (%)	90.6	80.2	90.6
AI (%)	49.9	41.6	47.9
RI (%)	0.0 to 100.0	0.0 to 100.0	0.0 to 100.0

FO, Frequency of occurrence (number of samples infected with *Aspergillus* section *Nigri*/Number of samples);
AI, Average of infection (sum of percentage infection of samples level/Number of samples);
RI, Range of infection % (range of infected pieces in a sample).

Table 2 – Multiplex PCR results.

An/Aw	*fum8*	*radH*	*pks*	Number of isolates
+	-	-	-	298 (59.6%)
+	+	-	-	175 (35.0%)
+	-	+	+	11 (2.2%)
+	+	+	+	3 (0.6%)
-	-	-	-	13 (2.6%)
Total				500

An/Aw + and - means amplification or not using the *A. niger/A*. *welwitschiae specific* primers;
fum8 + and - means the detection or not of the α-oxoamine synthase gene involved in fumonisin synthesis;
radH + and - means the detection or not of the *radH* gene involved in ochratoxin biosynthesis;
pks + and -: means the detection or not of the polyketide synthase gene involved in ochratoxin synthesis.

Figure legends

Figure 1 - Incidence of *Aspergillus* section *Nigri* in onion bulb samples acquired monthly (from January/2014 to December/2015), during four seasons of the year, in supermarkets (Londrina, Paraná State, Brazil).

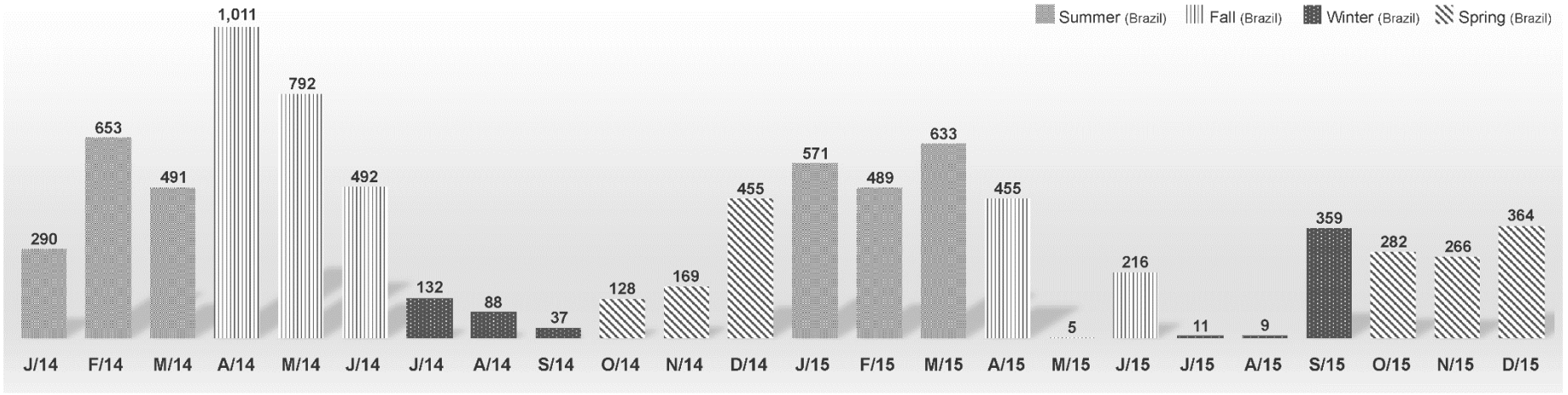
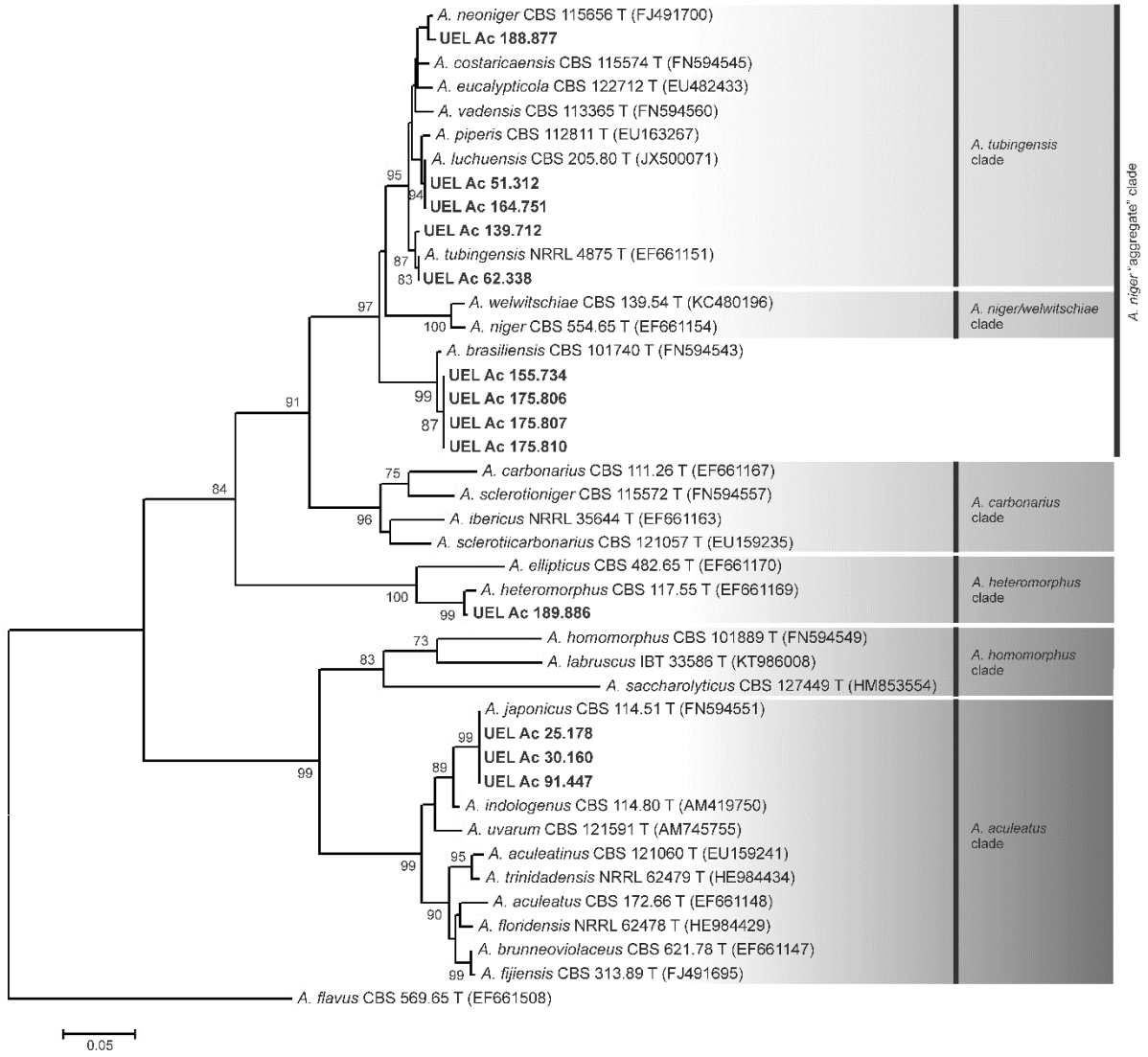


Figure 2 - Maximum Likelihood (ML) phylogenetic tree reconstructed from the partial calmodulin gene sequence aligned with corresponding sequence of type strains (T) from *Aspergillus* section *Nigri* deposited in NCBI database. Bootstrap values ≥ 70% are showed. *Aspergillus flavus* was used with outgroup.



5 CONCLUSÕES FINAIS

- As análises das sequências de nucleotídeos que codificam para o gene da β-tubulina das espécies pertencentes ao clado *A. nomius* disponíveis no NCBI permitiram o desenvolvimento de um par de *primer* espécie-específico para identificação da espécie *A. nomius*. O uso deste par de *primer* possibilitou a detecção da espécie *A. nomius* contaminando abelhas polinizadoras da castanheira do brasil pertencentes as espécies *Xylocopa frontalis*, *Bombus transversalis*, *Centris denudans*, *Centris ferruginea* e *Epicharis flava*, indicando uma provável fonte de contaminação da castanha do brasil por fungos toxigênicos.

- As análises das sequências de nucleotídeos que codificam para o gene da calmodulina permitiram identificar as espécies *A. niger* e *A. welwitschiae* em amostras brasileiras de frutas secas, uvas, grãos de café, castanha do brasil, cebolas e cacau. Linhagens destas espécies diferem com relação a capacidade de produção de OTA e FB_2.

- O desenvolvimento da metodologia de PCR multiplex permitiu detectar diferenças com relação a frequência de linhagens das espécies *A. niger* e *A. welwitschiae* portadoras dos genes *radH*, *pks* e *fum8* essenciais para a produção de OTA e FB_2. Linhagens de ambas as espécies produtores de OTA possuem presentes no genoma os genes *radH* e *pks* e aproximadamente 95% das linhagens não produtoras não possuem estes genes. Todas as linhagens de *A. niger* produtoras de FB_2 apresentaram o gene *fum8* no genoma, enquanto que apenas 36% das linhagens de *A. welwitschiae* possuem esse gene. Portanto, para a OTA a perda da capacidade de produção da micotoxina está relacionada com a deleção de genes do *cluste*r nas espécies *A. niger* e *A. welwitschiae*. Para FB_2 a perda da capacidade de produção da micotoxina está associada com a deleção do gene no *cluster* apenas na espécie *A. welwitschiae*, pois para *A. niger* produtor e não produtor o gene *fum8* sempre está presente.

- O uso da PCR multiplex permitiu separar eficientemente as espécies *A. niger/A. wewlitschaie* das demais espécies de *black aspergilli* encontradas infectando

bulbos de cebolas comercializadas em supermercados do Estado do Paraná, Brasil, no decorrer de dois anos consecutivos. Linhagens de *A. niger/A. welwitschiae* contemplam os genes *fum8*, *radH* e *pks* essenciais para a biossíntese de ocratoxina A e fumonisina B_2.

- As análises das sequências de nucleotídeos que codificam para o gene da calmodulina permitiram identificar as espécies *A. welwiltschiae* e *A. niger* produtoras de micotoxinas e as espécies *A. brasiliensis, A. tubingensis, A. luchuensis, A. neoniger* e *A. heteromorphus* não produtoras de micotoxinas infectando bulbos de cebolas comercializados em supermercados do Estado do Paraná, Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2650–2652, 1994.

ADHIKARI, B.N.; BANDYOPADHYAY, R.; COTTY, P. Degeneration of aflatoxin gene clusters in *Aspergillus flavus* from Africa and North America. **AMB Express**, v. 6, p. 1-16, 2016.

ANDERSEN, M.R.; SALAZAR, M.P.; SCHAAP, P.J.; VONDERVOORT, P.J.I.van, CULLEY, D.; THYKAER, J.; FRISVAD, J.C.; NIELSEN, K.F.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; BERKA, R.M.; BRAUS, G.H.; BRAUS-STROMEYER, S.A.; CORROCHANO, L.M.; DAI, Z.; DIJCK, P.W.M.van; HOFMANN, G.; LASURE, L.L.; MAGNUSON, J.K.; MENKE, H.; MEIJER, M.; MEIJER, S.L.; NIELSEN, J.B.; NIELSEN, M.L.; OOYEN, A.J.J.van; PEL, H.J.; POULSEN, L.; SAMSON, R.A.; STAM, H.; TSANG, A.; BRINK, J.M.van den; ATKINS, A.; AERTS, A.; SHAPIRO, H.; PANGILINAN, J.; SALAMOV, A.; LOU, Y.; LINDQUIST, E.; LUCAS, S.; GRIMWOOD, J.; GRIGORIEV, I.V.; KUBICEK, C.P.; MARTINEZ, D.; PEIJ, N.N.M.E.; ROUBOS, J.A.; NIELSEN, J.; BAKER, S.E. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. **Genome Research**, v. 21, p. 885–897, 2011.

ATOUI, A.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 313–318, 2007.

AZAIEZ, I.; FONT, G.; MAÑES, J.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M. Survey of mycotoxins in dates and dried fruits from Tunisian and Spanish markets. **Food Control**, v. 51, p. 340–346, 2015.

BAYMAN, P.; BAKER, J.L.; DOSTER, M.A.; MICHAILIDES, T.J.; MAHONEY, N.E. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2326-2329, 2002.

BAQUIÃO, A.C.; OLIVEIRA, M.M.M.de; REIS, T.A.; ZORZETE, P.; ATAYDE, D.D.; CORREA, B. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **Food Chemistry**, v. 139, p. 1127–1132, 2013.

BAQUIÃO, A.C.; ZORZETE, P.; REIS, T.A.; ASSUNÇÃO, E.; VERGUEIRO, S.; CORREA, B. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. **Food Control**, v. 28, p. 224–229, 2012.

BARANYI, N.; DESPOT, D.J.; PALÁGYI, A.; KISS, N.; KOCSUBÉ, S.; SZEKERES, A.; KECSKEMÉTI, A.; BENCSIK, O.; VÁGVOLGYI, C.; KLARIC, M.S.; VARGA, J. Identification of *Aspergillus* species in Central Europe able to produce G-type aflatoxins. **Acta Biologica Hungarica**, v. 66, p. 339–347, 2015.

BARANYI, N.; KOCSUBÉ, S.; VÁGVOLGYI, C.; VARGA, J. Current trends in aflatoxin research. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 57, p. 95–107, 2013.

BELLÍ, N.; BAU, M.; MARÍN, S.; ABARCA, M.L.; RAMOS, A.J.; BRAGULAT, M.R. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 40-45, 2006.

BENNETT, J.W. An overview of the Genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. ***Aspergillus* Molecular Biology and Genomics**. 1. ed. Estados Unidos da América: Caister Academic PR, 2010. p. 1-17.

BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K.C.; CLEVELAND, T.E. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 83–93, 2003.

BRAKHAGE, A.A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, doi:10.1038/nrmicro2916, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Diário Oficial da União. Brasilia-DF: Seção 1, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 138, de 8 de fevereiro de 2017. Diário Oficial da União. Brasilia-DF: Seção 1, 2017.

CALDERARI, T.O.; IAMANAKA, B.T.; FRISVAD, J.C.; PITT, J.I.; SARTORI, D.; PEREIRA, J.L.; FUNGARO, M.H.P.; TANIWAKI, M.H. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: from rainforest to consumer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 267–72, 2013.

CALLICOTT, K.A.; COTTY, P.J. Method for monitoring deletions in the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* with multiplex PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, p. 60–65, 2014.

CAMILETTI, B.X.; TORRICO, A.K.; MAURINO, M.F.; CRISTOS, D.; MAGNOLI, C.; LUCINI, E.I.; PECCI, M.P.G. Fungal screening and aflatoxin production by *Aspergillus* section *Flavi* isolated from pre-harvest maize ears grown in two Argentine regions. **Crop Protection**, v. 92, p. 41–48, 2017.

CARVAJAL-CAMPOS, A.; MANIZAN, A.L.; TADRIST, S.; AKAKI, D.K.; KOFFI-NEVRY, R.; MOORE, G.; FAPOHUNDA, S.O.; BAILLY, S.; MONTET, D.; OSWALD, I.P.; LORBER, S.; BRABET, C. PUEL, O. *Aspergillus korhogoensis*, a novel aflatoxin producing species from the Côte d'Ivoire. **Toxins**, v. 9, p. 1–4, 2017.

CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F.J. Development of a Real Time PCR system for detection of ochratoxin A-producing strains of the *Aspergillus niger* aggregate. **Food Control**, v. 22, p. 1367–1372, 2011.

CHEN, A.J.; FRISVAD, J.C.; SUN, B.D.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; DIJKSTERHUIS, J.; KIM, D.H.; HONG, S.B.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A. *Aspergillus* section *Nidulantes* (formerly *Emericella*): Polyphasic taxonomy, chemistry

and biology. **Studies in Mycology**, v. 84, p. 1–118, 2016a.

CHEN, A.J.; HUBKA, V.; FRISVAD, J.C.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; MEIJER, M.; VARGA, J.; DEMIREL, R.; JURJEVIC, Z.; KUBÁTOVÁ, A.; SKLENAR, F.; ZHOU, Y.G.; SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*), and its occurrence in indoor environments and food. **Studies in Mycology**, v. 88, p. 37–135, 2017.

CHEN, A.J.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; JIANG, X.Z.; SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Cervini*. **Studies in Mycology**, v. 85, p. 65–89, 2016b.

CHIOTTA, M.L.; PONSONE, M.L.; SOSA, D.M.; COMBINA, M.; CHULZE, S.N. Biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentinian vineyards and ochratoxin A contamination. **Food Microbiology**, v. 36, p. 182–190, 2013.

CHIOTTA, M.L.; SUSCA, A.; STEA, G.; MULÈ, G.; PERRONE, G.; LOGRIECO, A.; CHULZE, S.N. Phylogenetic characterization and ochratoxin A – Fumonisin profile of black *Aspergillus* isolated from grapes in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 171–176, 2011.

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. 5-9, 2006.

COPETTI, M.V; IAMANAKA, B.T.; PITT, J.I.; TANIWAKI, M.H. Fungi and mycotoxins in cocoa : From farm to chocolate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 178, p. 13–20, 2014.

COPETTI, M.V.; IAMANAKA, B.T.; FRISVAD, J.C.; PEREIRA, J.L.; TANIWAKI, M.H. Mycobiota of cocoa: From farm to chocolate. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1499–1504, 2011.

COPETTI, M.V.; PEREIRA, J.L.; IAMANAKA, B.T.; PITT, J.I.; TANIWAKI, M.H. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 67–70, 2010.

DAO, H.P.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A. Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 61–67, 2005.

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

DJOSSOU, O.; ROUSSOS, S.; ISABELLEE, P.G.; MACARIE, H.; GERMAIN, K.; YOAN, L. Fungal population, including Ochratoxin A producing *Aspergillus* section *Nigri* strains from Ivory Coast coffee bean. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, p. 2576–2589, 2015.

EHRLICH, K.C.; MACK, B.M.; WEI, Q.; LI, P.; ROZE, L.V.; DAZZO, F.; CARY, J.W.; BHATNAGAR, D.; LINK, J.E. Association with *aflR* in endosomes reveals new

functions for *aflJ* in aflatoxin biosynthesis. **Toxins**, v. 4, p. 1582-1600, 2012.

EHRLICH, K.C.; YU, J.; COTTY, P.J. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 518–527, 2005.

EL-RAHEEM, A.; EL-SHANSHOURY, R.; EL-SABBAGH, S.M.; EMARA, H.A.; SABA, H.A.E. Occurrence of moulds, toxicogenic capability of *Aspergillus flavus* and levels of aflatoxins in maize, wheat, rice and peanut from markets in central delta provinces, Egypt. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, p. 852–865, 2014.

FAUSTINELLI, P.C.; PALENCIA, E.R.; SOBOLEV, V.S.; HORN, B.W.; SHEPPARD, H.T.; LAMB, M.C.; WANG, X.M.; SCHEFFLER, B.E.; CASTILLO, J.M.; ARIAS, R.S. Study of the genetic diversity of the aflatoxin biosynthesis cluster in aspergillus section flavi using insertion/deletion markers in peanut seeds from Georgia, USA. **Mycologia**, v. 109, p. 200–209, 2017.

FERRACIN, L.M.; FIER, C.B.; VIEIRA, M.L.C.; VITORELLO, C.B.M.; VARANI, A.M.; ROSSI, M.M.; SANTOS, M.M.; TANIWAKI, M.H.; IAMANAKA, B.T.; FUNGARO, M.H.P. Strain-specific polyketide synthase genes of *Aspergillus niger*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, p. 137–145, 2012.

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. Occurrence and fumonisin B_2 producing potential of *Aspergillus* section *Nigri* in Brazil nuts. **Mycotoxin Research**, v. 33, p. 49-58, 2017.

FERRANTI, L.S.; FUNGARO, M.H.P.; MASSI, F.P.; SILVA, J.J.; PENHA, R.E.S.; FRISVAD, J.C.; TANIWAKI, M.H.; IAMANAKA, B.T. Diversity of *Aspergillus* section *Nigri* on the surface of *Vitis labrusca* and its hybrid grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 268, p. 53-60, 2018.

FOX, E.M.; HOWLETT, B.J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 481-487, 2008.

FRISVAD, J.C.; LARSEN, T.O. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 7859–7877, 2015.

FRISVAD, J.C.; LARSEN, T.O.; THRANE, U.; MEIJER, M.; VARGA, J.; SAMSON, R.A.; NIELSEN, K.F. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. **PloS One**, v. 6, e23496, 2011.

FRISVAD, J.C.; PETERSEN, L.M.; LYHNE, E.K.; LARSEN, T.O. Formation of Sclerotia and Production of Indoloterpenes by *Aspergillus niger* and Other Species in Section *Nigri*. **PLoS ONE**, v. 9, e94857, 2014.

FRISVAD, J.C.; SMEDSGAARD, J.; SAMSON, R.A.; LARSEN, T.O.; THRANE, U. Fumonisin B_2 production by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9727–9732, 2007.

FRISVAD, J.C.; FRANK, J.M.; HOUBRAKEN, J.A.M.P.; KUIJPERS, A.F.A.; SAMSON, R.A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati.* **Studies in Mycology**, v. 50, p. 23–43, 2004.

FUNGARO, M.H.P.; FERRANTI, L.S.; MASSI, F.P.; SILVA, J.J.; SARTORI, D.; TANIWAKI, M.H.; FRISVAD, J.C.; IAMANAKA, B.T. *Aspergillus labruscus* sp. nov., a new species of *Aspergillus* section *Nigri* discovered in Brazil. **Scientific Reports**, v. 1, p. 1–9, 2017.

FUNGARO, M.H.P.; VISSOTTO, P.C.; SARTORI, D.; VILAS-BOAS, L.A.; FURLANETO, M.C.; TANIWAKI, M.H. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. **Current Microbiology**, v. 49, p. 123–127, 2004.

GAMS, W.; CHRISTENSEN, M.; ONIONS, A.H.S.; PITT, J.I.; SAMSON, R.A. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: SAMSON, R.A.; PITT, J.I. **Advances in *Aspergillus* and *Penicillium* systematics**. 1. ed. Nova York: Plenum, 1985. p. 55-62.

GALLO, A.; BRUNO, K.S.; SOLFRIZZO, M.; PERRONE, G.; MULÈ, G.; VISCONTI, A.; BAKER, S.E. New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 8208–8218, 2012.

GALLO, A.; FERRARA, M.; PERRONE, G. Recent advances on the molecular aspects of ochratoxin A biosynthesis. **Current Opinion in Food Science**, v. 17, p. 49–56, 2017.

GALLO, A.; KNOX, B.P.; BRUNO, K.S.; SOLFRIZZO, M.; BAKER, S.E.; PERRONE, G. Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 179, p. 10–17, 2014.

GARMENDIA, G.; VERO, S. Occurrence and biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* on “Tannat” grapes in Uruguay. **International Journal of Food Microbiology**, v. 216, p. 31–39, 2016.

GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAAR, R.; KRIEK, N.P.J. Fumonisins - Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by Fusarium moniliforme. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1806-1811, 1988.

GHERBAWY, Y.; ELHARIRY, H.; KOCSUBÉ, S.; BAHOBIAL, A.; DEEB, B.E.; ALTALHI, A.; J.; VÁGVOLGYI, C. Molecular Characterization of Black *Aspergillus* Species from Onion and Their Potential for Ochratoxin A and Fumonisin B_2 Production. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 0, p. 1-10, 2015.

GIL-SERNA, J.; VÁZQUEZ, C.; SARDIÑAS, N.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T.; PATIÑO, B. Discrimination of the main Ochratoxin A-producing species in *Aspergillus* section *Circumdati* by specific PCR assays. **International Journal of Food Microbiology**, v.

136, p. 83–87, 2009.

GIL-SERNA, J.; VÁZQUEZ, C.; SARDIÑAS, N.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T.; PATIÑO, B. Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati. Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. **Food Control**, v. 22, p. 343–345, 2011.

GONÇALVES, J.S.; FERRACIN, L.M.; CARNEIRO, M.L.V.; IAMANAKA, B.T.; TANIWAKI, M.H.; FUNGARO, M.H.P. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 1817–1825, 2012a.

GONÇALVES, S.S.; STCHIGEL, A.M.; CANO, J.F.; GODOY-MARTINEZ, P.C.; COLOMBO, A.L.; GUARRO, J. *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. **Medical Mycology**, v. 50, p. 152–160, 2012b.

GONZÁLEZ-SALGADO, A.; GONZÁLEZ-JAÉN, T.; VÁZQUEZ, C.; PATIÑO, B. Highly sensitive PCR-based detection method specific for *Aspergillus flavus* in wheat flour. **Food Additives & Contaminants**, v. 25, p. 758-764, 2008.

GONZÁLEZ-SALGADO, A.; PATIÑEO, B.; GIL-SERNA, J.; VÁZQUEZ, C.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T. Specific detection of *Aspergillus carbonarius* by SYBR® Green and TaqMan® quantitative PCR assays based on the multicopy ITS2 region of the rRNA gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 295, p. 57–66, 2009.

GONZÁLEZ-SALGADO, A.; PATIÑO, B.; VÁZQUEZ, C.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T. Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, p. 353–361, 2005.

HASHIMOTO, R.; NAKAGAWA, H.; ONJI, Y.; ASANO, K.; YOKOYAMA, K.; TAKAHASHI, H. Mycotoxin contamination of Vietnamese coffee beans caused by *Aspergillus* section *Nigri* and *Circumdati*. **JSM Mycotoxins**, v. 65, p. 1-6, 2015.

HONG, S.B.; CHO, H.S.; SHIN, H.D.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 477–486, 2006.

HONG, S.B.; LEE, M.; KIM, D.H.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; PERRONE, G.; GOMI, K.; YAMADA, O.; MACHIDA, M.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A. *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia. **PLoS ONE**, v. 8, e63769, 2013.

HORN, B.W.; MOORE, G.G.; CARBONE, I. Sexual reproduction in aflatoxin-producing *Aspergillus nomius*. **Mycologia**, v. 103, p. 174–183, 2011.

HUBKA, V.; NOVAKOVA, A.; KOLARIK, M.; JURJEVIC, Z.; PETERSON, S.W. Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section Jani sect. nov. **Mycologia**, v. 107, p. 169–208, 2015.

HUBKA, V.; NOVÁKOVÁ, A.; PETERSON, S.W.; FRISVAD, J.C.; SKLENÁR, F.;

MATSUZAWA, T.; KUBÁTOVÁ, A.; KOLARIK. M. A reappraisal of *Aspergillus* section *Nidulantes* with descriptions of two new sterigmatocystin-producing species. **Plant Systematics and Evolution**, v. 302, p. 1267–1299, 2016.

HUFFMAN, J.; GERBER, R.; DU, L. Review Recent Advancements in the Biosynthetic Mechanisms for Polyketide-Derived Mycotoxins. **Biopolymers**, v. 93, p. 764–776, 2010.

ISMAIEL, A.; PAPENBROCK, J. Mycotoxins: Producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. **Agriculture**, v. 5, p. 492–537, 2015.

JURJEVIĆ, Ž.; KUBÁTOVÁ, A.; KOLAŘÍK, M.; HUBKA, V. Taxonomy of *Aspergillus* section *Petersonii* sect. nov. encompassing indoor and soil-borne species with predominant tropical distribution. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, p. 2441–2462, 2015.

KACHAPULULA, P.W.; AKELLO, J.; BANDYOPADHYAY, R.; COTTY, P.J. *Aspergillus* section *Flavi* community structure in Zambia influences aflatoxin contamination of maize and groundnut. **International Journal of Food Microbiology**, v. 261, p. 49–56, 2017.

KATSURAYAMA, A.M.; MARTINS, L.M.; IAMANAKA, B.T.; FUNGARO, M.H.P.; SILVA, J.J.; FRISVAD, J.C.; PITT, J.I.; TANIWAKI, M.H. Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Brazilian rice: from field to market. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 213-221, 2018.

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J.W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Natural Reviews Microbiology**, v. 3, p. 937-947, 2005.

KHOURY, A.el; ATOUI, A. Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. **Toxins**, v. 2, p. 461–493, 2010.

KIZIS, D.; NATSKOULIS, P.; NYCHAS, G.J.E.; PANAGOU, E.Z. Biodiversity and ITS-RFLP Characterisation of *Aspergillus* Section *Nigri* Isolates in Grapes from Four Traditional Grape-Producing Areas in Greece. **Plos One**, v. 9, e93923, 2014.

KRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.; VELUW, G.J. van; WANG, F.; MULLER, W.H.; DIJKSTERHUIS, J.; WOSTEN, H.A.B. Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 74, p. 1-29, 2013.

KURTZMAN, C.P.; HORN, B.W.; HESSELTINE, C.W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 53, p. 147–158, 1987.

KUSUMOTO, K.I.; NOGATA, Y.; OHTA, H. Directed deletions in the aflatoxin biosynthesis gene homolog cluster of *Aspergillus oryzae*. **Curr Genet**, v. 37, p. 104-111, 2000.

LAMBONI, Y.; FRISVAD, J.C.; HELL, K.; LINNEMANN, A.R.; NOUT, R.M.J.; TAMO, M.; NIELSEN, K.F.; BOEKEL, M.A.J.S. van; SMID, E.J. Occurrence of *Aspergillus*

section *Flavi* and section *Nigri* and aflatoxins in raw cashew kernels (*Anacarduim occidentale* L.) from Benin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 71-77, 2016.

LASRAM, S.; OUESLATI, S.; MLIKI, A.; GHORBEL, A.; SILAR, P.; CHEBIL,S. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Control**, v. 25, p. 75-80, 2012.

LEONG, S.L.; HOCKING, A.D.; SCOTT, E.S. *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 124-133, 2007.

LOGRIECO, A.F.; HAIDUKOWSKI, M.; SUSCA, A.; MULÈ, G.; MUNKVOLD, G.P.; MORETTI, A. *Aspergillus* section *Nigri* as contributor of fumonisin B_2 contamination in maize. **Food Additives & Contaminants**, v. 31, p. 149–155, 2014.

MAGNANI, M.; FERNANDES, T.; CAVENAGHI, C.E.; HOMECHIM, M.; ONO, E.Y.S.; VILAS-BOAS, L.A.; SARTORI, D.; FURLANETO, M.C.; FUNGARO, M.H.P. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, v. 62, p. 45-49, 2005.

MAIA, P.P.; SIQUEIRA, M.E.P.B. Aflatoxinas em rações destinadas a cães, gatos e pássaros: uma revisão. **Revista da FZVA**, v. 14, p. 235-257, 2007.

MARTINS, L.M.; SANT'ANA, A.S.; FUNGARO, M.H.P.; SILVA, J.J.; NASCIMENTO, M.S.; FRISVAD, J.C.; TANIWAKI, M.H. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in the Brazilian peanut production chain. **Food Research International**, v. 94, p. 101-107, 2017.

MASSI, F.P.; PENHA, R.E.S.; CAVALCANTE, M.C.; VIARO, H.P.; SILVA, J.J.; FERRANTI, L.S.; FUNGARO, M.H.P. Identification of *Aspergillus nomius* in Bees Visiting Brazil Nuts Flowers. **Microbes and Environments**, v. 30, p. 273-275, 2015.

MASSI, F.P.; SARTORI, D.; FERRANTI, L.S.; IAMANAKA, B.T.; TANIWAKI, M.I.; 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.

MASSI, F.P.; VIEIRA, M.L.C.; SARTORI, D.; PENHA, R.E.S.; MUNHOZ, C.F.; FERREIRA, J.M.; IAMANAKA, B.T.; TANIWAKI, M.H.; FRISVAD, J.C.; FUNGARO, M.H.P. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 14–21, 2014.

MERLERA, G.G.; MUÑOZ, S.; COELHO, I.; CAVAGLIERI, L.R,; TORRES, A.M.; REYNOSO, M.M. Diversity of black aspergilli isolated from raisins in Argentina: Polyphasic approach to species identification and development of SCAR markers for *Aspergillus ibericus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 92–101, 2015.

MIDORIKAWA, G.E.O.; SOUSA, M.L.M.; SILVA, O.F.; DIAS, J.S.; KANZAKI, L.I.B.; HANADA, R.E.; MESQUITA, R.M.L.C.; GONÇALVES, R.C.; ALVARES, V.S.; BITTENCOURT, D.M.C.; MILLER, R.N.G. Characterization of *Aspergillus* species on Brazil nut from the Brazilian Amazonian region and development of a PCR assay for identification at the genus level. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 138, 2014.

MOGENSEN, J.M.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U.; NIELSEN, K.F. Production of fumonisin B_2 and B_4 by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 954–958, 2010.

MOORE, G.G.; SINGH, R.; HORN, B.W.; CARBONE, I. Recombination and lineage-specific gene loss in the aflatoxin gene cluster of *Aspergillus flavus*. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 4870–4887, 2009.

MORELLO, L.G.; SARTORI, D.; MARTINEZ, A.L.O.; VIEIRA, M.L.C.; TANIWAKI, M.H.; FUNGARO, M.H.P. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of β-tubulin gene by using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 270–276, 2007.

MORETTI, A.; SUSCA, A.; MULÉ, G.; LOGRIECO, A.F.; PROCTOR, R.H. Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 57–66, 2013.

MULÈ, G.; SUSCA, A.; LOGRIECO, A.; STEA, G.; VISCONTI, A. Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 28–34, 2006.

NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; NIELSEN, K.F.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Fumonisin B_2 production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans. **Food Additives e Contaminants**, v. 26, p. 94–100, 2009.

NORVELL, L.L. (2011). Melbourne approves a new code. Mycotaxon 116: 481–490.

OLSEN, M.; JOHNSSON, P.; MÖLLER, T.; PALADINO, R.; LINDBLAD, M. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? **World Mycotoxin Journal**, v. 1, p. 123–126, 2008.

PALUMBO, J.D.; O´KEEFFE, T.L.; McGARVEY, J.A. Incidence of fumonisin B_2 production within *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from California raisins. **Journal of Food Protection**, v. 74, p. 672–675, 2011.

PALUMBO, J.D.; O'KEEFFE, T.L. Detection and discrimination of four *Aspergillus* section *Nigri* species by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, p. 188–195, 2015.

PANDIT, P.; PANTA, O.P.; KRKI, T.B. Isolation of *Aspergillus ochraceus* and production of ochratoxin in coffee samples. **Nepal Journal of Science and Technology**, v. 15, p. 133-138, 2014.

PASSAMANI, F.R.F.; LOPES, N.A.; PEREIRA, G.E.; PRADO, G.; BATISTA, L.R.

Aspergillus Section *Nigri* in grapes Cultivated in the Tropical Winery Region of Brazil. **Food and Public Health**, v. 2, p. 276-280, 2012.

PATIÑO, B.; GONZÁLEZ-SALGADO, A.; GONZÁLES-JAÉN, M.T.; VÁZQUEZ, C. PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 207–214, 2005.

PEL, H.J.; DE WINDE, J.H.; ARCHER, D.B.; DYER, P.S.; HOFMANN, G.; SCHAAP, P.J.; TURNER, G.; VRIES, R.P.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; ANDERSEN, M.R.; BENDTSEN, J.D.; BENEN, J.A.E.; BERG, M.van den; BREESTRAAT, S.; CADDICK, M.X.; CONTRERAS, R.; CORNELL, M.; COUTINHO, P.M.; DANCHIN, E.G.J.; DEBETS, A.J.M.; DEKKER, P.; DIJCK, P.W.M.van; DIJK, A.van; DIJKHUIZEN, L.; DRIESSEN, A.J.M.; D'ENFERT, C.; GEYSENS, S.; GOOSEN, C.; GROOT, G.S.P.; GROOT, P.W.J.; GUILLEMETTE, T.; HENRISSAT, B.; HERWEIJER, M.; HOMBERGH, J.P.T.W.van de; HONDEL, C.A.M.J.J.van den; HEIJDEN, R.T.J.M.van der; KAAIJ, R.M. van der; KLIS, F.M.; KOOLS, H.J.; KUBICEK, C.P.; KUYK, P.A. van; LAUBER, J.; LU, X.; MAAREL, M.J.E.C. van der; MEULENBERG, R.; MENKE, H.; MORTIMER, M.A.; NIELSEN, J.; OLIVER, S.G.; OLSTHOORN, M.; PAL, K.; PEIJ, N.N.M.E.van; RAM, A.F.J.; RINAS, U.; ROUBOS, J.A.; SAGT, C.M.J.; SCHMOLL, M.; SUN, J.; USSERY, D.; VARGA, J.; VERVECKEN, W.; VONDERVOORT, P.J.J.van de; WEDLER, H.; WÖSTEN, H.A.B.; ZENG, A.P.; OOYEN, A.J.J.van; VISSER, J.; STAM, H. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnollogy**, v. 25, p. 221-231, 2007.

PERRONE, G.; STEA, G.; EPIFANI, F.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. **Fungal Biology**, v. 115, p. 1138–1150, 2011.

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

PERRONE, G.; SUSCA, A.; STEA, G.; MULÈ, G. PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 641–649, 2004.

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

PI, B.; YU, D.; DAI, F.; SONG, X.; ZHU, C.; LI, H.; YU, Y. A genomics based discovery of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Aspergillus ustus*. **PLoS ONE**, v. 10, e0116089, 2015.

PITT, J.I.; LANGE, L.; LACEY, A.E.; VUONG, D.; MIDGLEY, D.; GREENFIELD, P.; BRADBURY, M.; LACEY, E.; BUSK, P.K.; PILGAARD,B.; CHOOI, Y.H.; PIGGOTT, A.M. *Aspergillus hancockii* sp. nov., a biosynthetically talented fungus endemic to

southeastern Australian soils. **PLoS ONE**, v. 12, p. 1–21, 2017.

PRENCIPE, S.; SICILIANO, I.; CONTESSA, C.; BOTTA, R.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L.; SPADARO, D. Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from fresh chestnuts and along the chestnut flour process. **Food Microbiology**, v. 69, p. 159–169, 2018.

QI, T.F.; RENAUD, J.B.; MCDOWELL, T.; SEIFERT, K.A.; YEUNG, K.K.C.; SUMARAH, M.W. Diversity of Mycotoxin-Producing Black Aspergilli in Canadian Vineyards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 1583-1589, 2016.

REIS, T.A.; BAQUIÃO, A.C.; ATAYDE, D.D.; GRABARZ, F.; CORRÊA, B. Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from organic Brazil nuts using a polyphasic approach. **Food Microbiology**, v. 42, p. 34–39, 2014.

REIS, T.A.; OLIVEIRA, T.D.; BAQUIÃO, A.C.; GONÇALVES, S.S.; ZORZETE, P.; CORRÊA, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, p. 61–68, 2012.

RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; LUQUE, M.I.; MARTÍN, A.; CÓRDOBA, J.J. Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin-producing molds in foods. **Food Microbiology**, v. 31, p. 89-99, 2012.

ROSSI, P.; REVERBERI, M.; RICELLI, A.; FABBRI, A.A.; FANELLI, C. Polymerase chain reaction detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes at different time after inoculum. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 2, p. 66–71, 2010.

SAADULLAH, A.A.M.; ABDULLAH, S.K. Contamination of Dried Figs with Fungi and Aflatoxigenic Potential of Some Isolates of *Aspergillus* Section *Flavi*. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 5, p. 76–81, 2015.

SAMSON, R.A.; VARGA, J. Molecular Systematics of *Aspergillus* and itsTeleomorphs. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. ***Aspergillus*** **Molecular Biology and Genomics**. 1. ed. Estados Unidos da América: Caister Academic Press, 2010. p. 19-40.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, 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. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141–173, 2014.

SARDIÑAS, N.; VÁZQUEZ, C.; GIL-SERNA, J.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T.; PATIÑO, B. Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 121–125, 2011.

SARDIÑAS, N.; VÁZQUEZ, C.; GIL-SERNA, J.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T.; PATIÑO, B. Specific detection of Aspergillus parasiticus in wheat flour using a highly sensitive PCR assay. **Food Additives & Contaminants**, v. 27, p. 853-858, 2010.

SARTORI, D.; FURLANETO, M.C.; MARTINS, M.K.; PAULA, M.R.F.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; TANIWAKI, M.H.; FUNGARO, M.H.P. PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 350–354, 2006.

SARTORI, D.; TANIWAKI, M.H.; IAMANAKA, B.T.; FUNGARO, M.H.P. Molecular Diagnosis of Ochratoxigenic Fungi. In: GHERBAWY, Y.; VOIGT, K. **Molecular Identification of Fungi**. 1 ed. Nova York, Springer Berlin Heidelberg, 2010, p. 195-212.

SCHMIDT, H.; BANNIER, M.; VOGEL, R.F.; NIESSEN, L. detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* in gree coffee by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 464-469, 2004.

SCHMIDT, H.; EHRMANN, M.; VOGEL, R.F.; TANIWAKI, M.H.; NIESSEN, L. Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 138–146, 2003.

SCHMIDT, H.; TANIWAKI, M.H.; VOGEL, R.F.; NIESSEN, L. Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 899-909, 2004.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, A.; CHEN, W.; CONSORTIUM, F.B. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **PNAS**, v. 109, p. 6241–6246, 2012.

SELMA, M.V.; MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.V.; AZNAR, R. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 126–134, 2008.

SELMA, M.V.; MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.V.; ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R. Simultaneous detection of the main black aspergilli responsible for ochratoxin A (OTA) contamination in grapes by multiplex real-time polymerase chain reaction. **Food Additives and Contaminants - Part A,** v. 26, p. 180–188, 2009.

SHWETA, S.; MADHAVAN, S.; PARANIDHARAN, V.; VELAZHAHAN, R. Detection of *Aspergillus flavus* in maize kernels by conventional and real-time PCR assays. **International Food Research Journal**, v. 20, p. 3329-3335, 2013.

SILVA, D.M.; BATISTA, L.R.; REZENDE, E.F.; FUNGARO, M.H.P.; SARTORI, D. ALVES, E. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 761–773, 2011.

SILVA, F.C.da; CHALFOUN, S.M.; BATISTA, L.R.; SANTOS, C.; LIMA, N. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. **Annals of Microbiology**, v. 65, p. 2119–2129, 2015.

SIMÕES, M.F.; SANTOS, C.; LIMA, N. Structural diversity of *Aspergillus* (section *Nigri*) spores. **Microscopy and Microanalysis**, v. 19, p. 1151–1158, 2013.

SIQUEIRA, J.P.Z.; SUTTON, D.A.; GENÉ, J.; GARCÍA, D.; WLEDERHOLD, N.; PETERSON, S.W.; GUARRO, J. Multilocus phylogeny and antifungal susceptibility of *Aspergillus* section *Circumdati* from clinical samples and description of *A. pseudosclerotiorum* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, p. 1-12, 2017.

SOARES, C.; CALADO, T.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, p. 9–13, 2013.

SPADARO, D.; PATHARAJAN, S.; KARTIKEYAN, M.; LORÈ, A.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Specific PCR primers for the detection of isolates of *Aspergillus carbonarius* producing ochratoxin a on grapevine. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 267–272, 2011.

SPADARO, D.; PATHARAJAN, S.; LORÈ, A.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Ochratoxigenic Black Species of Aspergilli in Grape Fruits of Northern Italy Identified by Improved PCR-RFLP Produced. **Toxins**, v. 4, p. 42-54, 2012.

SUSCA, A.; MORETTI, A.; STEA, G.; VILLANI, A.; HAIDUKOWSKI, M.; LOGRIECO, A.; MUNKVOLD, G. Comparison of species composition and fumonisin production in *Aspergillus* section *Nigri* populations in maize kernels from USA and Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 75–82, 2014a.

SUSCA, A.; PERRONE, G.; COZZI, G.; STEA, G,; LOGRIECO, A.F.; MULÈ, G. Multilocus sequence analysis of *Aspergillus* Sect . *Nigri* in dried vine fruits of worldwide origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, p. 163–168, 2013.

SUSCA, A.; PROCTOR, R.H.; BUTCHKO, R.A.E.; HAIDUKOWSKI, M.; STEA, G.; LOGRIECO, A.; MORETTI, A. Variation in the fumonisin biosynthetic gene cluster in fumonisin-producing and nonproducing black aspergilli. **Fungal Genetics and Biology**, v. 73, p. 39–52, 2014b.

SUSCA, A.; PROCTOR, R.H.; MORELLI, M.; HAIDUKOWSKI, M.; GALLO, A.; LOGRIECO, A.F.; MORETTI, A. Variantion in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolated from multiple crop and geographic origins. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-15, 2016.

SUSCA, A.; PROCTOR, R.H.; MULÈ, G.; STEA, G.; RITIENI, A.; LOGRIECO, A.; MORETTI, A. Correlation of mycotoxin fumonisin B_2 production and presence of the fumonisin biosynthetic gene *fum8* in *Aspergillus niger* from grape. **Journal of**

Agricultural and Food Chemistry, v. 58, p. 9266–9272, 2010.

SZIGETI, G.; BARANYI, N.; KOCSUBÉ, S.; GYORI, T, SZEKERES, A.; TÓTH, B.; TOROK, O.; HÁFRA, E.; PÁLFY, X.; VARGA, J. Role of Aspergillus species in mycotoxin contamination of agricultural products in Central Europe. **International Symposium: Current Trends in Plant Protection Proceedings**, v. 123, p. 211–215, 2012.

TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I.; IAMANAKA, B.T.; SARTORI, D.; COPETTI, M.V.; BALAJEE, A.; FUNGARO, M.H.P.; FRISVAD, J.C. *Aspergillus bertholletius sp. nov.* from Brazil nuts. **Plos One**, v. 7, e42480, 2012.

TANIWAKI, M.H.; TEIXEIRA, A.A.; TEIXEIRA, A.R.R.; COPETTI, M.V.; IAMANAKA, B.T. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. **Food Research International**, v. 61, p. 161–166, 2014.

TURNER, G. Genomics and secondary metabolism in *Aspergillus*. In: MACHIDA, M., GOMI, K. (Eds.), ***Aspergillus*: Molecular Biology and Genomics**. Caister Academic Press, Norfolk, 2010, pp. 139-155.

VAN DER MERWE, K.J.; STEYN, P.S.; FOURIE, L.; SCOTT, B.; THERON, J.J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, p. 1112-1113, 1965.

VARGA, J.; BARANYI, N.; CHANDRASEKARAN, M.; VÁGVÖLGYI, C.; KOCSUBÉ, S. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus : an update. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 59, p. 151–167, 2015.

VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; KOCSUBÉ, S.; BRANKOVICS, B.; TÓTH, B.; SZIGETI, G.; SAMSON, R.A. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 1–17, 2011a.

VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 57–80, 2011b.

VARGA, J.; KEVEI, E.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4461-4464, 1996.

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SURI, K.; SZIGETI, G.; SZEKERES, A.; VARGA, M.; TÓTH, B.; BARTÓK, T. Fumonisin contamination and fumonisin producing black Aspergilli in dried vine fruits of different origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 143-149, 2010.

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; MAN, V.; TÓTH, B.; VÁGVOLGYI, C.; BARTÓK, T. Black aspergilli and fumonisin contamination in onions purchased in Hungary. **Acta Alimentaria**, v. 41, p. 414–423, 2012.

VERHEECKE, C.; LIBOZ, T.; ANSON, P.; DIAZ, R.; MATHIEU, F. Reduction of aflatoxin production by *Aspergillus flavu*s and *Aspergillus parasiticus* in interaction with *Streptomyces*. **Microbiology**, v. 161, p. 967-972, 2015.

VIARO, H.P.; SILVA, J.J.; FERRANTI, L.S.; BORDINI, J.G.; MASSI, F.P.; FUNGARO, M.H. The first report of *A. novoparasiticus*, *A. arachidicola* and *A. pseudocaelatus* in Brazilian corn kernels. **International Journalof Food Microbiology**, v. 243, p. 46-51, 2017.

VISAGIE, C.M.; HIROOKA, Y.; TANNEY, J.B.; WHITFIELD, E.; MWANGE, K.; MEIJER, M.; AMEND, A.S.; SEIFERT, K.A.; SAMSON, R.A. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 63–139, 2014a.

VISAGIE, C.M.; VARGA, J.; HOUBRAKEN, J.; MEIJER, M.; KOCSUBÉ, S.; YILMAZ, N.; FOTEDAR, R.; SEIFERT, K.A.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). **Studies in Mycology**, v. 78, p. 1–61, 2014b.

YU, J.; BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K.C. Aflatoxin biosynthesis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 19, p. 191–200, 2002.
YU, J. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. **Toxins**, v. 4, p. 1024-1057, 2012.

ZHANG, C.; SELVARAJ, J.N.; YANG, Q.; LIU, Y. A survey of aflatoxin-producing *Aspergillus* sp. from peanut field soils in four agroecological zones of China. **Toxins**, v. 9, p. 1-14, 2017.

ZHIHONG, L.; KUNLUN, H.; YUNBO, L. Ochratoxin A and ochratoxin-producing fungi on cereal grain in China: a review. **Food Additives & Contaminants**, v. 32, p. 461–470, 2015.

WALSH, T.J.; WISSEL, M.C.; GRANTHAM, K.J.; PETRAITIENE, R.; PETRAITIS, V.; KASAI, M.; FRANCESCONI, A.; COTTON, M.P.; HUGHES, J.E.; GREENE, L.; BACHER, J.D.; MANNA, P.; SALOMONI, M.; KLEIBOEKER, S.B.; REDDY, S.R. Molecular detection and species-specific identification of medically important *Aspergillus* species by Real-time PCR in experimental invasive pulmonary aspergillosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 4150-4157, 2011.

White, T. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR-Protocols: A guide to methods and applications, 1990.