



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CARLA BEATRIZ FIER

**DISCRIMINAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE  
*Aspergillus niger* SENSU STRICTO PRODUTORAS E NÃO  
PRODUTORAS DE OCRATOXINA A**

---

Londrina  
2009

**CARLA BEATRIZ FIER**

**DISCRIMINAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE  
*Aspergillus niger* SENSU STRICTO PRODUTORAS E NÃO  
PRODUTORAS DE OCRATOXINA A**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Londrina  
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela divisão de processos técnicos da  
biblioteca central da universidade estadual de londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

F465d Fier, Carla Beatriz.  
Discriminação molecular de linhagens de *Aspergillus niger* sensu stricto produtoras e não produtoras de ocratoxina A / Carla Beatriz Fier. – Londrina, 2009.  
64 f. : il.

Orientador: Maria Helena Pelegrinelli Fungaro.  
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Micro-biologia, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia molecular – Teses. 2. Microbiologia – Sínteses – Teses. 3. Ocratoxinas – Teses. 3. *Aspergillus niger* – Teses. I. Fungaro, Maria Helena Pelegrinelli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.25

**CARLA BEATRIZ FIER**

**DISCRIMINAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE  
*Aspergillus niger* SENSU STRICTO PRODUTORAS E NÃO  
PRODUTORAS DE OCRATOXINA A**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Maria Helena Pelegrinelli Fungaro – Orientadora

---

Sueli Fumie Yamada Ogata

---

Marta Hiromi Taniwaki

Londrina, 16 de fevereiro de 2009.

Aos meus pais **Sandra e Vanildo** por todo  
incentivo, apoio, exemplo e amor.

## AGRADECIMENTOS

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

À Deus.

À Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade.

À professora Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro pela orientação e valioso conhecimento concedido durante esses anos.

Às professoras participantes da banca examinadora Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta e Dra. Marta Hiromi Taniwaki por aceitarem colaborar com este trabalho e por todas as notáveis contribuições.

Às professoras Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe e Dra. Márcia Cristina Furlaneto pela disponibilidade de equipamentos e materiais de laboratório.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Lígia Uno Lunardi pela colaboração, apoio, companheirismo e amizade dispensados não apenas durante os experimentos, mas também em todos os momentos bons e ruins.

Aos amigos de laboratório: Roberta, Francine, Yuldi, Lucas, Daniel, Lara, Dani e Milla pelos ótimos momentos de convívio e por todo apoio para a realização deste trabalho.

Aos amigos de laboratórios vizinhos pelos bons momentos de convivência e pela colaboração em alguma etapa deste trabalho.

À Flávia pela amizade e incentivo.

À minha avó Matilde e ao Fernando pela força e carinho dispensados durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais Sandra e Vanildo e ao meu irmão Kaio pelo apoio, incentivo, paciência e educação, pois esses fatores foram essenciais em todos os momentos.

E a todos os professores e funcionários do Centro de Ciências Biológicas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho..

Muito obrigada!

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

FIER, Carla Beatriz. **Discriminação molecular de linhagens de *Aspergillus niger* sensu stricto produtoras e não produtoras de ocratoxina A.** 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## RESUMO

A ocratoxina A (OTA), uma micotoxina com propriedades nefrotóxica e genotóxica, tem recebido destaque devido à freqüente contaminação de produtos destinados à alimentação. A OTA é sintetizada por espécies pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, entre elas, *Aspergillus niger*, uma das espécies fúngicas de maior importância econômica devido a sua utilização industrial na produção de enzimas e ácidos orgânicos. A via de biossíntese da OTA ainda não foi completamente esclarecida para nenhuma espécie fúngica. Entretanto, o modelo proposto sugere que a enzima policetídeo sintase (PKS) está envolvida na formação de um dos precursores dessa micotoxina. Recentemente, o genoma de *A. niger* CBS 513.88 foi completamente seqüenciado e 34 *open reading frames* (ORF) para PKSs distintas foram descritas. Com o objetivo de identificar entre essas ORFs, um gene que pudesse discriminar linhagens de *A. niger* produtoras e não produtoras de OTA, investigamos no genoma dessa espécie, seqüências similares a genes que expressam enzimas PKS relacionadas com a biossíntese de OTA. A partir do gene *pks* previamente caracterizado em *A. ochraceus*, foi identificado no genoma de *A. niger*, com cerca de 80% de identidade com o gene *pks*, a ORF An15g07920 que codifica para uma suposta enzima PKS. Um par de *primers* construído a partir do gene An15g07920 foi utilizado para amplificá-lo em linhagens de *A. niger* produtoras e não produtoras de OTA, através da técnica de PCR. O *amplicon* foi verificado apenas em linhagens produtoras da toxina, indicando que esse gene não está presente em linhagens não produtoras de OTA. A técnica de Southern blot, utilizando como sonda um fragmento de 556pb da seqüência An15g07920, repetiu os resultados obtidos na PCR. O sinal de hibridação da sonda foi observado apenas em isolados ocratoxigênicos e confirmou a ausência do gene em linhagens de *A. niger* incapazes de sintetizar a micotoxina. A análise comparativa *in silico* entre o genoma de duas linhagens de *A. niger* (CBS 513.88 e ATCC 1015) revelou que a ORF An15g07920 está ausente na linhagem ATCC 1015, confirmando que este gene é específico para algumas linhagens. Através da análise por RT-PCR em tempo real foi possível verificar uma correlação positiva entre os transcritos do gene An15g07920 e a quantidade de OTA produzida por *A. niger*.

**Palavras-chave:** Ocratoxina A. Policetídeo sintase. *Aspergillus niger*.

FIER, Carla Beatriz. **Discriminação molecular de linhagens de *Aspergillus niger* sensu stricto produtoras e não produtoras de ocratoxina A.** 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

### ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA), a mycotoxin with nephrotoxic and genotoxic properties, has received prominence due to frequent contamination of products destined to feeding. OTA is synthesized by species belonging to *Penicillium* and *Aspergillus* genus, among them, *Aspergillus niger*, one of the fungal species of great economic importance due to its industrial utilization in the production of enzymes and organic acids. The OTA biosynthetic pathway has not been completely elucidated yet for any fungal species. However, the proposed model suggests that the enzyme polyketide synthase (PKS) is involved in the formation of one of the precursors of this mycotoxin. Recently, the genome of *A. niger* CBS 513.88 has been completely sequenced and it was described 34 open reading frames (ORF) to distinct PKSs. With the aim to identify among these ORFs, a gene that could discriminate OTA producer and non producer *A. niger* strains, we investigated this specie genome for sequences that are similar to genes that express enzymes PKS related to OTA biosynthesis. From the *pks* gene previously characterized in *Aspergillus ochraceus*, was identified in *A. niger* genome, with 80% of identity with the *pks* gene, the ORF An15g07920 that codifies for a supposed PKS. A pair of primers constructed from the An15g07920 gene was used to amplify it in OTA producer and non-producer *A. niger* strains, through the PCR technique. Amplicon was verified only in mycotoxin producers' strains, indicating that this gene is not present in OTA non producers' strains. The technique of Southern blot, using as a probe a fragment of 556pb from the sequence An15g07920, repeated the results obtained in PCR. The probe hybridization signal was observed only in ochratoxigenic isolated and confirmed the absence of the gene in *A. niger* strains incapable of synthesizing the mycotoxin. The *in silico* comparative analysis between the genome of two *A. niger* strains (CBS 513.88 and ATCC 1015) showed that the An15g07920 ORF is absent in the ATCC 1015 strain, confirming that this gene is specific for some strains. Through the real time RT-PCR analysis it was possible to verify a positive correlation between the transcripts of the An15g07920 gene and the amount of OTA produced by *A. niger*.

**Keywords:** Ochratoxin A. Polyketide synthase. *Aspergillus niger*.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificação das PKSs fúngicas estabelecida por Kroken e colaboradores (2003).....	16
---	----

### ARTIGO

<b>TABLE 1</b> – List of strains, sources, origin, and ability to produce ochratoxin A .....	56
--	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura química da OTA; (A) policetídeo dihidroisocumarina; (B) grupamento carbonila; (C) cloro; (D) aminoácido fenilalanina ..... 20
- Figura 2** – Modelo bioquímico proposto para a biossíntese de OTA ..... 22
- ARTIGO**
- Figure 1** – (a) Tree of *Aspergillus* from section *Nigri* based on sequences of *β-tubulin* gene. Numbers above branches correspond to bootstrap values generated by CLUSTAL X 1.6 (b) Eletrophoretic pattern of amplified polymorphic DNA from 39 *Aspergillus niger* strains using the random primer OPX-7. 1Kb Ladder-plus (Invitrogen Life Technologies) was used as molecular weight standard ..... 59
- Figure 2** – General architecture of (a) PKS and (b) NRPS determined to the ORFs An15g07920 and An15g07910, respectively. In (a) KAS –  $\beta$ -ketoacylsynthase, AT – acyl transferase, MT – methyl transferase, ADH-Zinc – alcohol dehydrogenase dependent of Zn, KR – ketoreductase. In (b) AMP – Adenosinemonophosphate-binding site, PP – Phosphopantetheine attachment site, Condensation – condensation domain ..... 60
- Figure 3** – (a) Amplification products obtained by using the primer pair named PKS15MT. (b) Amplification products obtained by using the primer pair denoted PKS15KS ..... 61
- Figure 4** – Southern blot of 12 random selected *A. niger* strains (1-7 ochratoxin producer strains and 8-12 non-ochratoxin producer strains). Genomic DNA was digested with *Hind* III and electrophoresed on a 0.8% agarose gel. For hybridization a fragment of *pks* gene labelled with P<sup>32</sup> was used. Lane 13 is a positive control, plasmid with a *pks* fragment; M – Molecular marker (Kb) ..... 62
- Figure 5** – Alignment of the contig An15c0250 from *A. niger* CBS 513.88 (y) versus the genome of *A. niger* ATCC 1015 (x). The gap region is pointed out, the scales are the nucleotides positions in each sequence ..... 63
- Figure 6** – Quantitative real time RT-PCR analysis to confirm that the *pks* gene is associate to OTA biosynthesis..... 64

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA</b> .....	13
2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS .....	13
2.2 POLICETÍDEOS FÚNGICOS .....	14
2.3 MICOTOXINAS .....	16
2.4 OCRATOXINA A .....	17
2.5 BIOSÍNTESE DE OTA .....	20
2.6 <i>Aspergillus niger</i> .....	24
2.7 EXPRESSÃO GÊNICA .....	25
<b>3 OBJETIVO</b> .....	28
3.1 OBJETIVO GERAL .....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b> .....	29
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO “Molecular discrimination of ochratoxigenic and non-ochratoxigenic strains of <i>Aspergillus niger sensu stricto</i>”</b> .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

A Ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário tóxico classificado pela *International Agency for Research on Cancer* como um possível carcinógeno humano (grupo 2B). Esse metabólito vem despertando crescente interesse mundial devido a freqüente contaminação de produtos agrícolas. Sua presença já foi avaliada em alimentos de origem vegetal (café, cevada, frutas secas, uvas), em alimentos processados a partir de matéria-prima contaminada (pães, vinho, cerveja) e em produtos de origem animal (carne de porco e de aves domésticas). Nos últimos anos, tem se tornado cada vez mais freqüente a descrição de novos alimentos contaminados com OTA. Por isso, vários países estão estabelecendo limites rigorosos para essa toxina em mercadorias importadas destinadas à alimentação.

A OTA foi isolada pela primeira vez, em 1965, de uma cultura de *Aspergillus ochraceus*. Subseqüentemente sua presença foi detectada em outras espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Em regiões de clima temperado, as espécies do gênero *Penicillium* predominam na produção de OTA, já em climas mais quentes, as espécies de *Aspergillus* são as principais responsáveis pela ocorrência dessa micotoxina em alimentos.

Nos últimos anos, algumas espécies pertencentes à seção *Nigri* têm sido descritas como importantes produtoras de OTA. Dentre elas, destaca-se *Aspergillus niger* sensu stricto incluída no agregado *A. niger* (*A. niger* sensu stricto, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. brasiliensis*). *A. niger* é comumente detectado como contaminante de produtos agrícolas, principalmente grãos de café, cereais, frutas secas, vegetais e uvas.

A descrição da capacidade de isolados de *A. niger* em produzir OTA tem causado grande preocupação devido à utilização dessa espécie pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, na produção de várias enzimas e ácidos orgânicos considerados *Generally Regarded as Safe* (GRAS) pelo *Food and Drug Administration* (FDA).

*A. niger* produz quantidades limitadas de OTA em relação às principais espécies produtoras. Além disso, apenas 3-10% das linhagens são capazes de sintetizar esse metabólito. Sendo assim, a presença dessa espécie como contaminante não confirma a existência da toxina. Entretanto, o fato de ser amplamente difundida na natureza e freqüentemente utilizada em processos industriais, agrava o problema da produção de OTA por *A. niger* e torna necessária a identificação das linhagens capazes de sintetizar esse metabólito.

Estruturalmente a OTA é composta por um policetídeo clorado dihidroisocumarina ligado a um aminoácido fenilalanina através de uma ligação amida. A via

de biossíntese da OTA ainda não foi completamente esclarecida, entretanto, a partir do modelo bioquímico proposto, é possível supor a participação de algumas enzimas, entre elas: uma policetídeo sintase (PKS), requerida na formação do policetídeo dihidroisocumarina; uma metilase, que atua na formação do grupamento carboxila do policetídeo; e uma enzima peptídeo sintase, responsável pela ligação do aminoácido fenilalanina ao policetídeo. Já foram identificados dois genes distintos que expressam diferentes enzimas PKS envolvidas com a síntese de OTA, o gene *pks* em *A. ochraceus* e o gene *otapksPN* em *Penicillium nordicum*.

Embora outros genes envolvidos com a biossíntese de OTA tenham sido caracterizados, não foi encontrada nenhuma divergência molecular que pudesse ser utilizada para discriminar de forma rápida e precisa, linhagens produtoras e não produtoras de OTA.

Recentemente, o genoma de *A. niger* CBS 513.88 foi completamente seqüenciado e 34 *open reading frames* (ORF) para PKSs distintas foram identificadas. A partir da seqüência nucleotídica dessas ORFs, foi levantada a hipótese da possível relação de uma delas, a seqüência An15g07920, com a via de biossíntese de OTA em *A. niger*, devido a sua alta identidade (80%) com a seqüência do gene *pks* envolvido na síntese de OTA em *A. ochraceus*. Entretanto, nenhuma evidência experimental foi obtida.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS

O Reino Fungi inclui espécies capazes de sintetizar importantes produtos, denominados metabólitos secundários, através de vias secundárias de biossíntese (metabolismo secundário). Diferentemente dos metabólitos primários que são comuns e de vital importância para todos os organismos vivos, os metabólitos secundários são dispensáveis na sobrevivência e diferenciação celular e sua síntese é muitas vezes limitada a uma família, gênero, espécie ou até mesmo linhagem (BENNETT; CIEGLER, 1983).

Os metabólitos secundários despertam interesse mundial por apresentarem relevância médica, industrial e/ou agrícola, pois incluem importantes fármacos como ciclosporinas, estatinas e penicilina (PELÁEZ, 2006); toxinas tais como aflatoxinas, ocratoxinas e fumonisinas (MOSS, 1998; KELLER; TURNER; BENNETT, 2005); e pigmentos como a melanina.

A biossíntese de metabólitos secundários envolve várias reações enzimáticas e está freqüentemente associada ao início da fase estacionária de crescimento do fungo, ou seja, quando o crescimento ativo já está bastante reduzido (BENNETT, 1995; CALVO et al., 2002). A síntese desses metabólitos geralmente coincide com processos de diferenciação, como a esporulação (BENNETT; CIEGLER, 1983). Entretanto, as circunstâncias de sua produção e os benefícios que os metabólitos secundários fúngicos conferem ao organismo produtor ainda são desconhecidos. Uma função proposta para esses metabólitos é a de que eles seriam degradados, quando necessário, para fornecer compostos bioativos ao organismo produtor (FIRN; JONES, 2000; CHALLIS; HOPWOOD, 2003).

Os genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários apresentam-se freqüentemente agrupados em adjacência, ou seja, em *clusters* (ZHANG et al., 2004). Os metabólitos secundários que apresentam a estrutura gênica clusterizada já caracterizada incluem: aflatoxinas (YU; BHATNAGAR; CLEVELAND, 2004), cefalosporinas (GUTIERREZ et al., 1992), penicilina (BRAKHAAGE, 1998), fumonisina (PROCTOR et al., 2003), alcalóides de ergot (TUDZYNSKI et al., 1999), compactina (ABE et al., 2002), lovastatina (KENNEDY et al., 1999) e melanina (KIMURA; TSUGE, 1993; TSAI et al., 1999). A regulação desses *clusters* é, na maioria das vezes, dependente de fatores de transcrição

(PROCTOR et al., 1995; FERNANDES; KELLER; ADAMS, 1998), reguladores globais (BOK et al., 2005) e de sinais de transdução que conectam o metabolismo secundário ao metabolismo primário (CALVO et al., 2002). As conexões entre as vias de metabolismo primário e secundário são muito complexas e não foram identificadas para grande parte dos metabólitos secundários (BENNETT; CIEGLER, 1983).

Keller e colaboradores (2005) incluíram os metabólitos secundários fúngicos em quatro classes: peptídeo não-ribossomal, terpenos, alcalóides indólicos e policetídeos. Os peptídeos não-ribossomais são sintetizados a partir de aminoácidos proteínogênicos e aminoácidos não proteínogênicos, sendo essa reação catalisada por uma enzima denominada peptídeo sintase não ribossomal (NRPS). Os terpenos, como são classificados os carotenóides e tricotecenos, são formados por unidades de isopreno através da enzima terpeno ciclase. Os alcalóides indólicos são freqüentemente derivados do triptofano e dimetilalil pirofosfato, embora outros aminoácidos possam ser utilizados como precursores, e sua síntese envolve a catálise pela enzima dimetilalil triptofano sintase (DMATS). O principal exemplo de metabólito secundário classificado como alcalóide indólico é a ergotamina de *Claviceps purpúrea*. Os policetídeos são o tipo mais abundante de metabólitos secundários fúngicos, sendo o composto carcinogênico aflatoxina e o redutor de colesterol lovastatina exemplos de policetídeos.

## 2.2 POLICETÍDEOS FÚNGICOS

Os policetideos fúngicos são sintetizados pelas policetídeo sintases (PKS), enzimas responsáveis pela condensação de ácidos carboxílicos tioesterificados à coenzima A (CoA), geralmente acetil-CoA e malonil-CoA, formando cadeias de carbono de diferentes tamanhos (KROKEN et al., 2003). As enzimas policetideo sintases são classificadas de acordo com o número de subunidades estruturais (uma ou várias) e com o modo de síntese dos policetídeos (linear ou iterativa). As PKSs fúngicas são classificadas como PKS tipo I iterativas, são denominadas iterativas por conterem apenas uma cópia dos domínios (função catalítica) que as constituem e utilizá-los repetidamente para sintetizar o policetídeo final (COX, 2007). Essas enzimas apresentam uma única subunidade estrutural contendo multidomínios.

Onze diferentes domínios são freqüentemente identificados nas PKSs

fúngicas. Esses sítios catalíticos podem ser classificados como: domínios de condensação, de redução e de modificação. Os domínios cetoacilsintase (KS), aciltransferase (AT) e carregador acil (ACP) são denominados domínios de condensação. Eles são essenciais para a síntese dos policetídeos fúngicos, e por isso constituem todas as PKSs de fungos. Os domínios cetoreductase (KR), desidratase (DH) e enoil redutase (ER), são classificados como domínios de redução. Já os domínios metiltransferase (MT), de condensação (CON), de adenilação (AMP) e Claisen ciclase (CYC), são denominados domínios de modificação. Os domínios de redução e modificação não são constituintes obrigatórios das PKSs fúngicas (FUJII et al., 2001; KROKEN et al., 2003). Algumas PKSs podem conter um domínio de condensação tioesterase (TE) que, quando presente, participa na liberação do policetídeo recém sintetizado da enzima.

A síntese de um policetídeo é iniciada quando a unidade inicial, geralmente o acetil-CoA, é transferido do seu carregador CoA para o domínio AT da PKS. O domínio AT é freqüentemente utilizado pela PKS para transferir o grupamento acetil do CoA para os domínios KS e ACP (COX, 2007). Durante essa reação, a ligação tioéster entre o acetil e o CoA é quebrada, e uma nova é formada entre o acetil e o domínio AT (NELSON; COX, 2005). O grupamento acetil é então transferido para o domínio KS da PKS. Essa reação envolve novamente quebra e formação de ligação tioéster entre a unidade acetil e a proteína. O domínio ACP da enzima liga-se a unidade extensora, geralmente o malonil-CoA, para estender a cadeia de acetil crescente (COX, 2007). O grupamento acetil presente no domínio KS liga-se covalentemente à unidade extensora malonil. O policetídeo em formação pode ser submetido à redução por um domínio cetoreductase (KR), que reduz a cetona ( $-C(=O)-C$ ) do policetídeo a um grupamento hidroxil ( $-C(-OH)-C$ ). Esse grupamento pode adicionalmente ser reduzido por um domínio desidratase (DH) resultando na formação de um grupamento enoil ( $-C=C-$ ). A possível redução final do grupamento enoil para um grupamento alquil ( $-C-C-$ ) é catalisada pelo domínio enoil redutase (ER) (KROKEN et al., 2003). Nesse ponto, o policetídeo em crescimento também pode ser submetido a metilação pelo domínio metiltransferase (MT). Após a conclusão das modificações, uma nova unidade extensora pode ser adicionada ao policetídeo em formação através do domínio ACP, esse processo é repetido por um determinado número de vezes (estabelecido pela PKS).

Após a síntese, o policetídeo pode ser submetido à ciclização pelo domínio CYC (FUJII et al., 2001), à condensação com outros policetídeos através do domínio COM, ou simplesmente ser liberado da enzima PKS (HENDRICKSON, et al., 1999). Dessa maneira, a diversidade de estrutura dos policetídeos fúngicos pode resultar do número de ácidos carboxílicos incorporados, do número de reações de redução e de modificação.

A PKS controla o comprimento da cadeia em formação, a seleção das unidades inicial e extensora, e a extensão da redução e da metilação durante cada ciclo de condensação. Por isso, alguns autores acreditam que a programação da PKS é a chave para entender e explorar essas enzimas (COX, 2007).

Baseado no alinhamento de sequências de PKSs, Bingle e colaboradores (1999) dividiram as PKSs do tipo I iterativas em duas subclasses designadas WA e MSAS onde foram incluídas as PKSs caracterizadas por conterem apenas os domínios essenciais (AT, KS, ACP) e PKSs que adicionalmente apresentam o domínio cetoreductase (KR), respectivamente. Kroken e colaboradores (2003) propuseram uma classificação mais detalhada, baseada em análise filogenética, onde as PKSs fúngicas foram subdivididas em sete clados como mostrado na Tabela 1:

**Tabela 1** – Classificação das PKSs fúngicas estabelecida por Kroken e colaboradores (2003).

<b>Nome</b>	<b>Estrutura dos domínios</b>
Clado I PKS redutora	KS-AT-DH-(ME)-ER-KR-ACP
Clado II PKS redutora	KS-AT-DH-(ME)-ACP-(CON)-(AMP-ACP)
Clado III PKS redutora	KS-AT-DH-ER-KR-ACP-(ACP)
Clado IV PKS redutora	KS-AT-DH-(ME)-ER-KR-ACP
Clado I PKS não redutora	KS-AT-ACP-(ACP)-CYC
Clado II PKS não redutora	KS-AT-ACP-(ACP)-CYC
Clado III PKS não redutora	KS-AT-ACP-(ACP)-ME-CYC

Um isolado fúngico apresenta vários genes que codificam para diferentes PKSs. Kroken e colaboradores (2003) verificaram uma variedade de 7 a 25 genes para PKSs distintas em diferentes espécies fúngicas. Pel e colaboradores (2007) identificaram 34 *open reading frame* (ORF) para PKSs no genoma seqüenciado de *A. niger*.

### 2.3 MICOTOXINAS

Micotoxina é um termo designado a um grupo de metabólitos secundários tóxicos sintetizados por alguns fungos. São moléculas que apresentam baixo peso molecular e grande diversidade em estrutura química e atividade biológica.

Micotoxinas são nocivas para animais e humanos. Os efeitos que essas

toxinas promovem aos seres vivos variam de acordo com a dose, rotina de exposição e sensibilidade. Entretanto, em casos extremos, a contaminação por micotoxinas pode acarretar quadros de intoxicação aguda ou crônica (SHARMA; SALUMKHE, 1991), sendo que os principais efeitos registrados em seres humanos são indução de tumores malignos, lesão renal e supressão do sistema imune.

A ingestão de produtos contaminados e a inalação de esporos são possíveis meios de contaminação por micotoxinas (OGA, 1996). A principal fonte de contato de animais e humanos com esses metabólitos tóxicos são os alimentos de origem vegetal, que podem ser contaminados no campo, na colheita, no transporte e/ou armazenamento (SMITH; HENDERSON, 1991). A concentração de micotoxinas presente nos alimentos varia de acordo com as condições ambientais, que podem favorecer a contaminação por determinados isolados fúngicos.

Diversas micotoxinas podem ser sintetizadas por uma única espécie fúngica, mas nem todos os fungos apresentam essa capacidade. O tipo, a variedade e a quantidade da toxina estão relacionados à linhagem fúngica. Além disso, a biossíntese de micotoxinas é influenciada por diversos fatores ambientais como temperatura, tipo de substrato, quantidade de água e pH (BELLÍ et al., 2004; MÜHLENCOERT et al., 2004; ESTEBAN et al., 2004; 2006; SCHMIDT-HEYDT; MAGAN; GEISEN, 2008).

Entre as inúmeras micotoxinas descritas, algumas se destacam por sua importância agrícola devido à crescente contaminação de produtos destinados à alimentação, e por sua alta toxicidade para animais e humanos, entre elas: aflatoxina, ocratoxina A, fumonisina, patulina e tricotecenos (MILLER, 1995; PITT, 2000; TANAKA et al., 2000; THUVANDER et al., 2001; VARGA et al., 2003; GALVANO et al., 2005; LEBLANC et al., 2005).

## **2.4 OCRATOXINA A**

Algumas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Petromyces*, *Neopetromyces* e *Penicillium* têm a capacidade de sintetizar metabólitos secundários tóxicos denominados ocratoxinas (OTs) A, B ou C (FRISVAD et al., 2006). A ocratoxina A é a mais prevalente e tóxica, já as ocratoxinas B e C apresentam menor toxicidade e são pouco frequentes (BAYMAN; BAKER, 2006).

A Ocratoxina A (OTA) é uma importante micotoxina produzida por espécies pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Ela foi primeiramente isolada de uma cultura de *Aspergillus ochraceus*, no sul da África (VAN DER MERWE et al., 1965), e desde então tem sido relatada em várias outras espécies do gênero *Aspergillus*, entre elas: *A. westerdijkiae*, *A. steynii*, *A. melleus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, *A. cretensis*, *A. pseudoelegans*, *A. auricomus*, *A. niger*, *A. carbonarius* e *A. sulphureus* (HESSELTINE et al., 1972; ABARCA et al., 1994; HORIE, 1995; VARGA et al., 1996; FRISVAD et al., 2004). O gênero *Penicillium* apresenta duas importantes espécies produtoras de OTA: *P. verrucosum* e *P. nordicum* (CASTELLA et al., 2002). Em regiões de clima temperado, as espécies do gênero *Penicillium* predominam na produção de OTA, já em climas mais quentes, as espécies de *Aspergillus* são as principais responsáveis pela ocorrência dessa micotoxina em alimentos.

A OTA é uma toxina que apresenta propriedades nefrotóxica, genotóxica (possivelmente devido à indução de danos oxidativos ao DNA), imunossupressiva, hepatotóxica e foi classificada como um possível carcinógeno humano pela *International Agency for Research on Cancer* (categoria 2B) (IARC, 1993; RINGOT et al., 2006). Além disso, existem evidências de que a OTA inibe a respiração mitocondrial, interfere na peroxidação de lipídeos e no metabolismo da fenilalanina (WALKER, 1999; O'BRIEN; DIETRICH, 2005). Por ser absorvida ativamente pelo sistema renal, a OTA apresenta toxicidade mais aguda nos rins, onde ocorre em altas concentrações (SIMON, 1996; TSUDA et al., 1999).

A OTA é associada a várias doenças renais como a nefropatia endêmica dos Balcãs (BEN), uma doença humana fatal caracterizada por disfunção renal degenerativa. Desde que essa micotoxina foi sugerida como um possível determinante da BEN, vários estudos têm sido realizados para correlacionar a exposição humana a essa toxina e a incidência da doença. As mudanças na estrutura e função renal, encontradas na nefropatia endêmica humana e na nefropatia de porcos induzida pela OTA, apresentam impressionante similaridade, sugerindo que essa toxina seja realmente o agente causal da BEN. A OTA já foi associada a várias outras doenças em humanos, como nefropatia crônica (norte da África), tumor urotelial e câncer testicular (SCHWARTZ, 2002; O'BRIEN; DIETRICH, 2005).

A OTA é uma das principais micotoxinas associadas à contaminação de alimentos (MOSS, 1998; GONÇALVEZ; PINTO; FELICIO, 2001), e pode ser encontrada em produtos de origem vegetal como cevada, trigo, aveia, centeio, figos, azeitonas, nozes, uvas, café, cacau, passas, frutas secas, ervas para chá além de ervas medicamentosas (BAUER; GAREIS, 1987; HALT, 1998; SCUDAMORE; MACDONALD, 1998; THIRUMALA-DEVI

et al., 2001; BUCHELI; TANIWAKI, 2002; ABARCA et al., 2003; LASRAM et al., 2007). O risco de contaminação por OTA não está apenas na ingestão de alimentos de origem vegetal, mas também na ingestão de alimentos de origem animal, já que essa micotoxina foi reportada em carne de porco, carne de aves domésticas, em salsichas contendo sangue de porco e mais raramente em leite de vaca (HOHLER, 1998; JORGENSEN, 1998; PETZINGER; WEIDENBACH, 2002; ALTOMARE; RINALDI; GUGLIELMI, 2007). Esses animais provavelmente entraram em contato com a micotoxina através de alimentação contaminada. Além disso, por ser uma toxina termoestável, a OTA pode sobreviver ao processamento de alimentos e foi detectada em pães (SCUDAMORE; BANKS; MCDONALD, 2003), cerveja (JORGENSEN, 1998), vinho, suco de uva (ZIMMERLI; DICK, 1995; OTTENEDER; MAJERUS, 2000; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006) e vinagre (MAJERUS; BRESCH; OTTENEDER, 2000; MARKAKI et al., 2001), produzidos a partir de matéria-prima contaminada.

A contaminação de uma crescente quantidade de alimentos por OTA pode afetar, além da saúde humana, a economia mundial. No início de 2006, o proprietário do maior moinho de grãos da Itália foi apreendido com um carregamento de 58.000 toneladas de trigo contaminado com 15 µg de OTA/kg. O trigo havia sido importado do Canadá, moído e vendido a processadores de alimento (HOOPER, 2006). O limite de OTA em alimentos importados estabelecido pela União Européia inclui um máximo de 5 µg/kg em grãos de cereal, 3 µg/kg em alimentos processados a base de cereais, 10 µg/kg para frutas secas, 2 µg/Kg para vinho e suco de uva, 5 µg/Kg para café torrado e 10 µg/Kg para café instantâneo (FAO, 2003; 2005). A imposição de limites para OTA na importação de produtos alimentícios é estabelecida principalmente de acordo com o nível de consumo de cada mercadoria no país, e levanta a questão: até que ponto esses limites podem afetar a economia de muitos países em desenvolvimento? (BAYMAN; BAKER, 2006).

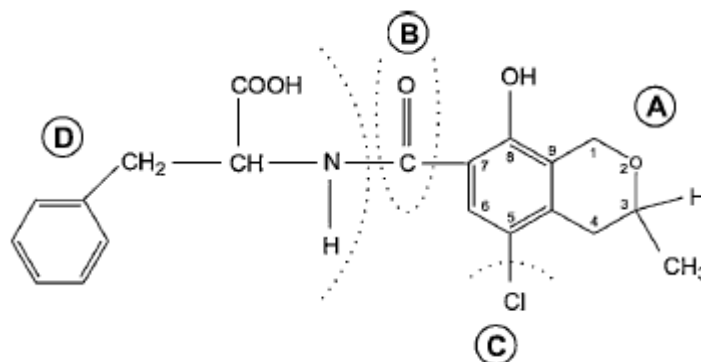
A crescente imposição de limites de OTA na importação de alimentos e a freqüente descoberta de produtos contaminados com essa toxina geraram uma preocupação com a quantidade de OTA presente em produtos destinados à alimentação, com especial atenção aos alimentos já processados e prontos para o consumo. Em um estudo realizado em amostras de vinho de diferentes regiões da Europa foram detectados níveis de OTA de até 4,48 µg/L (VALERO et al., 2008). A análise de vinhos comercializados em São Paulo (Brasil), revelou que 31% das amostras produzidas no Brasil apresentaram níveis máximos de contaminação de cerca de 0,0013 µg/L (SHUNDO et al., 2006). Em suco de uva, a presença de OTA torna-se crítica devido ao seu potencial de consumo por crianças. Na Alemanha a

quantidade de OTA encontrada nos sucos foi acima de 5,26  $\mu\text{g/L}$  (MIRAGLIA; BRERA, 2002). Em vinagre foram encontrados níveis de OTA de até 6,4  $\mu\text{g/L}$  (ENGELHARDT; SPARRER, 2005). Em pães, Zinedine e colaboradores (2007) detectaram cerca de 0,14 a 1,5  $\mu\text{g OTA/kg}$  em 48% das amostras analisadas na África. Em amostras de pães oriundos do Brasil, França, Alemanha, Itália e EUA a média de contaminação por OTA foi de 0,25  $\mu\text{g/kg}$ , 0,35  $\mu\text{g/kg}$ , 0,36  $\mu\text{g/kg}$ , 0,07  $\mu\text{g/kg}$  e 0,35  $\mu\text{g/kg}$ , respectivamente (LEGARDA; BURDASPAL, 2001).

Os níveis de OTA em fluido corpóreo humano têm se tornado alarmantes. Na região central da Eslováquia 30,2% das amostras de leite materno provenientes tanto de mulheres que residem em áreas urbanas quanto em áreas rurais apresentaram níveis de OTA que variaram entre 0,0023 a 0,0603  $\mu\text{g/L}$  (DOSTAL et al., 2008). Uma análise do leite materno no Brasil encontrou 0,02  $\mu\text{g}$  de OTA/L (NAVAS; SABINO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005). Esses dados são extremamente preocupantes porque sugerem que crianças estão sendo expostas a níveis de OTA acima da máxima dose diária recomendada pela *EU Scientific Committee on Food* (1998) de 0,005  $\mu\text{g/Kg}$  (5 ng/kg) de peso corporal por dia.

## 2.5 BIOSÍNTESE DE OTA

Quimicamente, a OTA é formada por um policetídeo dihidroisocumarina clorado ligado à fenilalanina por uma ligação amida. (Figura 1).

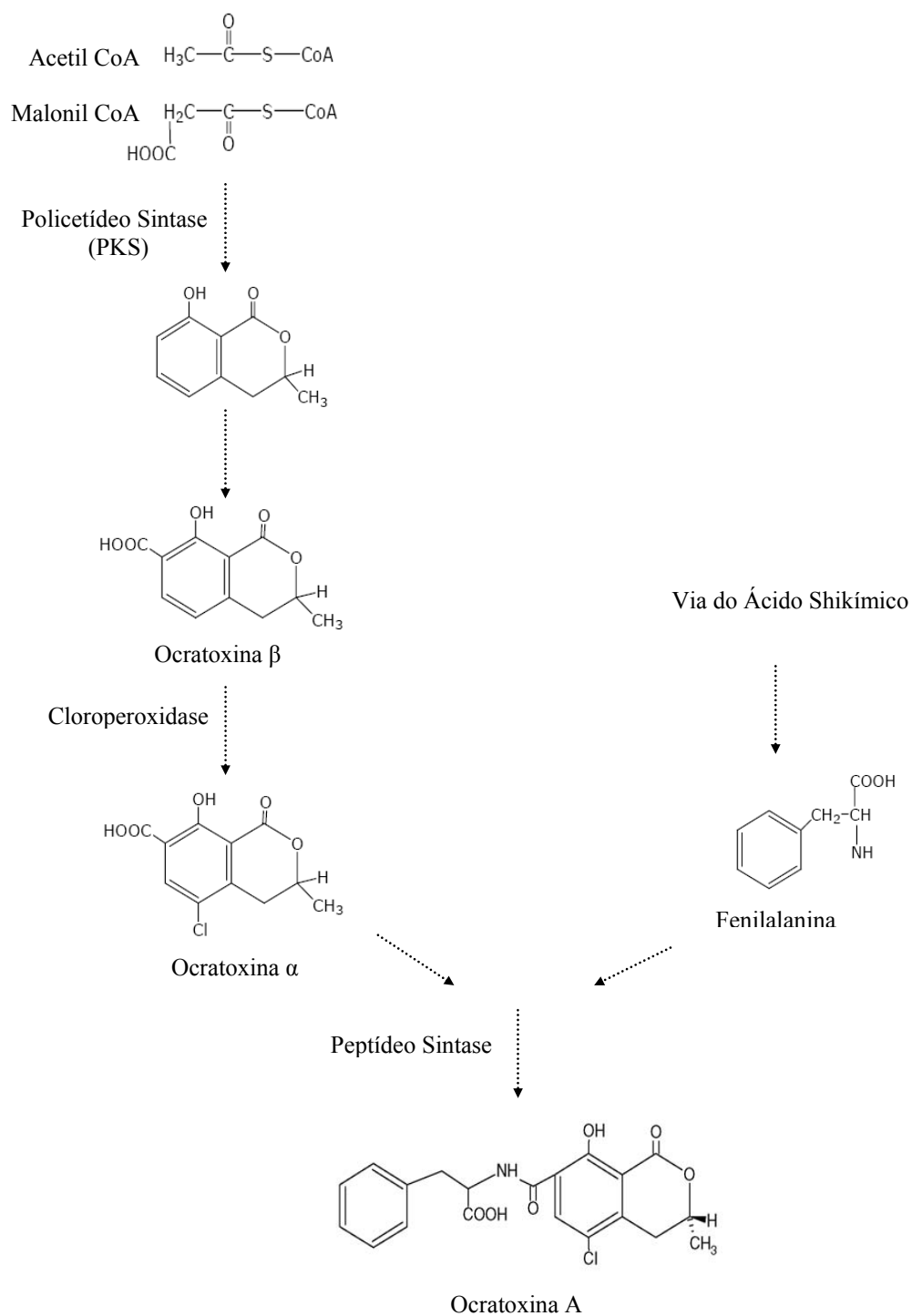


**Figura 1** – Estrutura química da OTA; (A) policetídeo dihidroisocumarina; (B) grupamento carbonila; (C) cloro; (D) aminoácido fenilalanina.

**Fonte:** Färber e Geisen (2004)

Muito pouco é conhecido sobre os genes e os mecanismos moleculares envolvidos na biossíntese da OTA. Em 1979, Huff e Hamilton propuseram um modelo bioquímico para a biossíntese de OTA baseado na estrutura da molécula. Segundo esses autores, três passos distintos ocorrem durante a biossíntese da OTA. O primeiro passo é a síntese do policetídeo dihidroisocumarina através do composto meleína, envolvendo uma enzima policetídeo sintase (PKS): a meleína é metilada e oxidada a OT $\beta$ , a cloração por uma cloroperoxidase dá origem à OT $\alpha$ . O segundo precursor, a fenilalanina, é sintetizado através da via do ácido shikímico. No terceiro passo, ocorre a ligação entre esses precursores dando origem a ocratoxina C (OTC), um etiléster da OTA, e a de-esterificação por uma esterase dá origem a OTA.

Em 2001, Harris e Mantle, trabalhando com precursores marcados da via de biossíntese da OTA, não encontraram nenhuma evidência do papel intermediário da meleína na síntese de OTA, como proposto por Huff e Hamilton (1979). Sugeriram então que o policetídeo dihidroisocumarina é formado a partir da condensação de unidades de acetato e malonato por uma enzima PKS. Esse policetídeo é metilado e oxidado dando origem à OT $\beta$ , que é clorada por uma cloroperoxidase formando assim a OT $\alpha$ . No passo final, a ligação do grupo carboxila do policetídeo ao aminoácido fenilalanina é catalisada por uma enzima peptídeo sintase (Figura 2).



**Figura 2** – Modelo bioquímico proposto para a biossíntese de OTA.

De acordo com o modelo bioquímico proposto, o mínimo requerido a nível genético para a biossíntese da OTA são genes que codificam para as enzimas: policetídeo sintase (PKS), requerida na síntese do policetídeo dihidroisocumarina; metilase, para a

formação do grupo carboxila; peptídeo sintase, que atua na ligação do aminoácido fenilalanina ao policetídeo; e finalmente, uma halogenase ou cloroperoxidase, para a introdução do átomo de cloro (FÄRBER; GEISEN, 2004).

Já foram identificados dois genes distintos que expressam diferentes enzimas PKS envolvidas com a síntese de OTA, o gene *otapksPN* em *P. nordicum* (GEISEN et al., 2004) e o gene *pks* em *A. ochraceus*, cujo nocaute levou à diminuição da capacidade de produção de OTA pelo isolado fúngico (O'CALLAGHAN; CADDICK; DOBSON, 2003).

Genes que expressam outras enzimas participantes da biossíntese da OTA já foram identificados. Karolewicz e Geisen (2005) identificaram uma *open reading frame* (ORF), denominada *npsPN*, localizada adjacente ao gene *otapksPN*, que codifica para uma enzima peptídeo sintase não ribossomal possivelmente envolvida com a síntese de OTA em *P. nordicum*. Em *A. ochraceus* foram identificados dois genes distintos (*p450-H11* e *p450-B03*) que expressam monoxigenases p450 supostamente relacionadas com a biossíntese de OTA nessa espécie (O'CALLAGHAN; STAPLETON; DOBSON, 2006). Botton e colaboradores (2008) utilizando a técnica de *cDNA-AFLP diferencial display screening* em duas linhagens de *A. carbonarius* antagonistas para a produção de OTA, identificaram alguns genes diferencialmente expressos, supostamente envolvidos na biossíntese de OTA e em sua regulação.

Os genes envolvidos na síntese de várias micotoxinas são organizados em *clusters*, como por exemplo, os genes da via de biossíntese da aflatoxina (YU; BHATNAGAR; CLEVELAND, 2004) e tricotecenos (TRAPP et al., 1998). Recentemente, Karolewicz e Geisen (2005) caracterizaram parte de um possível *cluster* gênico responsável pela biossíntese de OTA em *P. nordicum*. De acordo com esses resultados, é esperado que os genes relacionados com a biossíntese da OTA também apresentem uma organização clusterizada.

A inibição da síntese de OTA por alguns compostos naturais está sendo analisada. Entretanto, um mesmo composto apresentou efeitos diferentes em três espécies de *Aspergillus* produtores de OTA, sugerindo que a via de biossíntese dessa toxina não é idêntica para todas as espécies (BAYMAN; BAKER, 2006).

## 2.6 *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* é um fungo filamentosos de distribuição cosmopolita, freqüentemente encontrado em alimentos como cereais, frutas secas, grãos de café, vegetais e uvas. Essa espécie pertence ao agregado *A. niger* (*A. niger* sensu stricto, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. brasiliensis*) da seção *Nigri*. Essa seção inclui representantes com conídios de coloração marrom a negro (3,5 – 5,0 µm de diâmetro), conidióforos biseriados e uniseriados, e hifas septadas e pouco pigmentadas (KLICH; PITT, 1988).

*A. niger* é uma das espécies fúngicas de maior importância econômica devido a sua utilização industrial na produção de várias enzimas e ácidos orgânicos (SCHUSTER et al., 2002). Essa espécie adquiriu importância industrial a partir de 1919, quando foi observada a produção de ácido cítrico por fermentação. O ácido cítrico é utilizado pelas indústrias de alimentos e bebidas em produtos como: suco de frutas, geléias, doces e vinhos, atuando como acidulante, tampão e/ou antioxidante (SCHUSTER et al., 2002). A produção de ácido cítrico para uso industrial é quase que exclusivamente realizada por *A. niger* devido ao alto rendimento e mínima formação de produtos indesejados. *A. niger* também sintetiza uma variedade de enzimas que apresentam importância industrial como: amiglicosidase, utilizada principalmente por indústrias de álcool na hidrólise de carboidratos; pectinase, utilizada para redução da viscosidade e melhor clarificação de vinhos e sucos de frutas (GRASSIN; FAUGUENBERGUE, 1999); celulase e hemicelulase, utilizadas na confecção de pães e massas (SCHUSTER et al., 2002).

O ácido cítrico e uma vasta gama de enzimas produzidas pela espécie *A. niger* foram considerados *Generally Regarded as Safe* (GRAS) pelo FDA (Food and Drug Administration) (Código 21 da Regulação Federal 173.120). O título GRAS e a longa trajetória de uso seguro pela indústria fizeram de *A. niger* um favorável hospedeiro para expressão de proteínas heterólogas. Inúmeros genes de importância comercial foram clonados e expressos em *A. niger* (SCHUSTER et al., 2002).

Nos últimos anos, algumas espécies da seção *Nigri* têm sido descritas como importantes produtoras de OTA: *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. laticoffeatus* e *A. sclerotium* (SAMSON, 1994; SAMSON et al., 2004). O primeiro relato de produção de OTA por *A. niger* foi realizado por Abarca e colaboradores (1994), desde então, várias linhagens de *A. niger* foram descritas como produtoras dessa micotoxina (TÉREN et al., 1996; NAKAJIMA et al., 1997; TÉREN; PALÁGYI; VARGA, 1997; HEENAN; SHAW; PITT, 1998; TANIWAKI et

al., 1999). Essa espécie produz quantidades limitadas de OTA em relação às principais espécies produtoras, *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, entretanto, o fato de ser amplamente difundido na natureza e frequentemente utilizado pela indústria biotecnológica, agrava o problema da produção de OTA por *A. niger*. Como seria de se esperar, é de extrema importância que espécies utilizadas em processos biotecnológicos não produzam nenhuma substância nociva a animais e humanos. Por isso, é necessário que as linhagens de *A. niger* sejam avaliadas quanto à capacidade de produzir OTA antes de serem empregadas na indústria.

O seqüenciamento de genomas tem disponibilizado novas oportunidades para a investigação de genes relacionados com a biossíntese de OTA. Recentemente, o genoma de *A. niger* CBS 513.88 foi completamente seqüenciado (PEL et al., 2007). A análise do genoma revelou que o gene An15g07920, que expressa uma suposta enzima PKS, apresenta alto grau de identidade com a sequência do gene *pks* envolvido com a biossíntese de OTA em *A. ochraceus* (O'CALLAGHAN; CADDICK; DOBSON, 2003). Em vista disso, o gene An15g07920 foi hipoteticamente relacionado com a biossíntese de OTA em *A. niger*, entretanto, nenhuma evidência experimental foi obtida até o momento.

## 2.7 EXPRESSÃO GÊNICA

Técnicas que permitem avaliar a expressão gênica têm possibilitado a análise da expressão diferencial de determinados genes em diferentes condições. O termo expressão gênica refere-se ao processo em que a informação codificada por um determinado gene é traduzida em uma molécula funcional, geralmente uma proteína. Durante esse processo, o gene pode ser submetido a vários fatores de regulação, o que pode acarretar em uma expressão gênica diferencial. Uma célula pode regular a síntese de suas moléculas funcionais controlando quando e como um determinado gene será transcrito. Vários mecanismos podem estar envolvidos nesse processo, tais como: regulação do processamento do mRNA, seleção de quais mRNAs serão traduzidos e, ainda, ativação ou inativação das moléculas funcionais depois da sua síntese. Assim, nem todos os genes de um organismo são expressos ao mesmo tempo e as células especializam-se em função do repertório de proteínas e moléculas funcionais requeridas para o seu metabolismo, ou seja, nem todos os genes de um organismo são transcritos numa mesma célula.

A análise da expressão gênica pode ser realizada empregando as técnicas: Northern-Blot, hibridação subtrativa, *representational difference analysis* (RDA), *diferencial display* PCR (DD-PCR), entre outras. Dentre essas técnicas, uma que vem recebendo destaque é a técnica de transcrição reversa (RT) associada a técnica de PCR em tempo real.

A RT-PCR em tempo real baseia-se na síntese de DNA complementar (cDNA) através de uma reação de transcrição reversa catalizada pela enzima transcriptase reversa, seguida por uma reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*). A técnica de PCR permite a síntese de uma seqüência complementar de DNA a partir de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) anelados à fita molde. Os *primers* definem a seqüência nucleotídica a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de bilhões de cópias dessa seqüência (MULLIS, 1990).

A PCR em tempo real é uma metodologia que permite quantificar os produtos amplificados em todas as fases de uma reação de PCR. Por isso, essa técnica permite a quantificação de DNA e RNA de maneira altamente precisa e com grande reprodutibilidade. Durante a PCR em tempo real, o acúmulo de *amplicons* é analisado em "tempo real" para cada ciclo da reação por meio da detecção de moléculas denominadas fluoróforos. Essas moléculas são capazes de absorver e emitir luz em um comprimento de onda específico (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Um exemplo de fluoróforo é o SYBRGreen®, que se liga de maneira específica a todo DNA dupla fita e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador emite fluorescência de coloração verde proporcional à quantidade de DNA dupla fita contida na amostra. Durante a reação de amplificação, as moléculas de SYBRGreen® ligam-se às moléculas recém sintetizadas pela DNA polimerase, e, dessa forma, a reação pode ser monitorada continuamente através do aumento crescente da fluorescência. A fluorescência é detectada pelo equipamento acoplado ao termociclador no momento da reação de PCR, e ao final de cada ciclo é possível avaliar a quantidade de DNA amplificado (VITZTHUM et al., 1999). Ao final da reação, os valores de cada ciclo geram uma curva de fluorescência que está diretamente associada à quantidade de produto amplificado. O primeiro ponto que permite a quantificação exata do material amplificado é denominado *Cycle Threshold* ( $C_T$ ), que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Dois diferentes métodos de quantificação são passíveis de serem utilizados na PCR em tempo real: quantificação relativa e absoluta. A quantificação relativa permite analisar a variação da expressão de um gene alvo em diferentes condições, em relação a expressão de um gene de referência, como por exemplo, um gene constitutivo, que é expresso de maneira contínua em todas as células do organismo (KENNETH; SCHMITTGEN, 2001). A

quantificação absoluta determina o número de cópias do transcrito de interesse, geralmente interpolando os dados da PCR em tempo real em uma curva padrão. A quantificação relativa demonstra as mudanças relativas na expressão do gene de interesse em determinadas condições, já a absoluta é realizada em situações onde é necessário determinar o número absoluto de transcritos.

A RT-PCR em tempo real tem sido empregada para caracterizar ou confirmar a expressão de um gene, comparar níveis de RNAm em diferentes amostras (ORLANDO; PINZANI; PAZZAGLI, 1998), quantificar raros transcritos e pequenas alterações na expressão de genes (PFAFFL, 2001).

A análise da expressão de genes supostamente envolvidos com a biossíntese da OTA vem sendo o enfoque de muitas pesquisas atuais. Estudos têm sido realizados com o objetivo de analisar o comportamento de determinados genes tanto em meios permissivos e restritivos para a produção de OTA, quanto em organismos produtores e não produtores dessa toxina (O'CALLAGHAN; CADDICK; DOBSON, 2003; GEISEN et al., 2004; KAROLEWIEZ; GEISEN; 2005; O'CALLAGHAN; STAPLETON; DOBSON; 2006; BOTTON et al., 2008; GALLO et al., 2009).

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Esclarecer a relação da sequência An15g09720, que codifica uma suposta enzima policetídeo sintase (PKS) em *A. niger*, com a biossíntese de ocratoxina A (OTA) nessa espécie, e avaliar a presença desse gene em linhagens de *A. niger* produtoras e não produtoras da micotoxina, a fim de discriminar, a nível molecular, linhagens positivas e negativas para a toxina.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir *primers* específicos para o gene An15g07920, a partir da sequência de nucleotídeos depositada no banco de dados do NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>);
- Analisar a presença dos domínios metiltransferase (MT) e cetosintase (KS) do gene An15g07920 em linhagens de *A. niger* produtoras e não produtoras de ocratoxina A através das técnicas de PCR e Southern blot, objetivando discriminar linhagens positivas e negativas para a toxina;
- Avaliar a expressão do gene An15g07920 em meios permissivo e restritivo para produção de ocratoxina A através da técnica de RT-PCR em tempo real, a fim de verificar uma possível correlação entre expressão do gene e produção da toxina.

## REFERÊNCIAS

- ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLA, G.; CABAÑES, F.J. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection* 66 (3): 504-506; 2003.
- ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLA, G.; CABAÑES, F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied Environmental Microbiology* 60: 2650-2652; 1994.
- ABE, Y.; SUZUKI, T.; MIZUNO, T.; ONO, C.; IWAMOTO, K.; HOSOBUCHI, M.; YOSHIKAWA, H. Effect of increased dosage of the ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster on ML-236B production in *Penicillium citrinum*. *Molecular and General Genetics* 268: 130-137; 2002.
- ALTOMARE, D.F.; RINALDI, M.; GUGLIELMI, A. The role of food contamination by mycotoxins in human diseases: a review. *Nutritional Therapy & Metabolism* 25 (1): 8-11; 2007.
- BAUER, J.; GAREIS, M. Ochratoxin A in the food chain. *Zentralblatt des Veterinärmedizinischen Bundes* 34 (8): 613-627; 1987.
- BAYMAN, P.; BAKER, J.L. Ochratoxins: A global perspective. *Mycopathologia* 162: 215-223; 2006.
- BELLÍ, N.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters and Applied Microbiology* 38: 72-77; 2004.
- BENNETT, J.W. From molecular genetics and secondary metabolism to molecular metabolites and secondary genetics. *Canadian Journal of Botany* 73: S917-S924; 1995.
- BENNETT, J.W.; CIEGLER, A. Secondary metabolism and differentiation in fungi. *Marcel Dekker Inc*; 1983.
- BINGLE, L.E.; SIMPSON, T.J.; LAZARUS, C.M. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genetics and Biology* 26 (3): 209-223; 1999.

BOK, J.W.; BALAJEE, S.A.; MARR, K.A.; ANDES, D.; NIELSEN, K.F.; FRISVAD, J.C.; KELLER, N.P. LaeA, a Regulator of Morphogenetic Fungal Virulence Factors. *Eukaryotic Cell* 4: 1574-1582; 2005.

BOTTON, A.; FERRIGO, D.; SCOPEL, C.; CAUSIN, R.; BONGHI, C.; RAMINA, A.A. cDNA-AFLP approach to study ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology* 127: 105-115; 2008.

BRAKHAAGE, A.A. Molecular regulation of  $\beta$ -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiology and Molecular Biology Review* 62: 547-585; 1998.

BUCHELI, P.; TANIWAKI, M.H. Research in the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. *Food Additives and Contaminants* 19 (7): 655-665; 2002.

CALVO, A.M.; WILSON, R.A.; BOK, J.W.; KELLER, N.P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 447-459; 2002.

CASTELLA, G.; LARSEN, T.O.; CABAÑES, J.; SCHMIDT, H.; ALBORESI, A.; NIESSEN, L.; FÄRBER, P.; GEISEN, R. Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Systematic and Applied Microbiology* 25: 74-83; 2002.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 100: 14555-14561; 2003.

COX, R.J. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. *Organic & Biomolecular Chemistry* 5: 2010-2026; 2007.

DOSTAL, A.; JAKUSOVA, L.; CAJDOVA, J.; HUDECKOVA, H. Results of the first studies occurrence of ochratoxin A in human milk in Slovakia. *Bratisl Lek Listy* 109 (6): 276-278; 2008.

ENGELHARDT, G.; SPARRER, D. Ochratoxin A in getränken.  
[http://www.lgl.bayern.de/de/left/fachinformationen/lebensmittel/ochratoxin\\_getraenke.htm](http://www.lgl.bayern.de/de/left/fachinformationen/lebensmittel/ochratoxin_getraenke.htm);  
2005.

ESTEBAN, A.; ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CABAÑES, F.J. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. *Research in Microbiology* 155: 861-866; 2004.

ESTEBAN, A.; ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CABAÑES, F.J. Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *International Journal of Food Microbiology* 108: 188-195; 2006.

FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. [http://www.fao.org/documents/show\\_cdr.asp?url\\_file=/docrep/007/y5499e/y5499e0f.htm](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/007/y5499e/y5499e0f.htm); 2003.

FAO. Reducing ochratoxin A in coffee. [http://www.coffee-ota.org/proj\\_background.asp](http://www.coffee-ota.org/proj_background.asp); 2005.

FÄRBER, P.; GEISEN, R. Analysis of differentially-expressed ochratoxin A biosynthesis genes of *Penicillium nordicum*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 661-669; 2004.

FERNANDES, M.; KELLER, N.P.; ADAMS, T.H. Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AfIR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Molecular Microbiology* 28: 1355-1365; 1998.

FIRN, R.D.; JONES C.G. The evolution of secondary metabolism - a unifying model. *Molecular Microbiology* 37: 989-994; 2000.

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* 50: 23-43; 2004.

FRISVAD, J.C.; THRANE, U.; SAMSON, R.A.; PITT, J.I. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In: *Advances in Food Mycology*. Springer US, pp. 3-31; 2006.

FUJII, I.; WATANABE, A.; SANKAWA, U.; EBIZUKA, Y. Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. *Chemistry & Biology* 8: 189-197; 2001.

GALLO, A.; PERRONE, G.; SOLFRIZZO, M.; EPIFANI, F.; ABBAS, A.; DOBSON, A.D.W.; MULE', G. Characterization of a *pks* gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology* 129: 8-15; 2009.

GALVANO, F.; RITIENI, A.; PIVA, G.; PIETRI, A. Mycotoxins in the human food chain. In: *The mycotoxin blue book*. Diaz, D.E. (ed.). Nottingham University Press, Calabria, Italy; 2005.

GEISEN, R.; MAYER, Z.; KAROLEWIEZ, A.; FÄRBER, P. Development of a real time PCR system for detection of *P. nordicum* and for monitoring ochratoxin A production in foods based on the ochratoxin polyketide synthase gene. *System Applied Microbiology* 27: 501-507; 2004.

GONÇALVEZ, E.; PINTO, M.M.; FELICIO, J.D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. *Biológico*, São Paulo, 63: 15-19; 2001.

GRASSIN, C.; FAUGUENBERGUE, P. Enzymes, fruit juice processing. In: *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. Flickinger, M.C.; Drew, S.W. (eds). Wiley & Sons, Inc, New York; 1999.

GUTIERREZ, S.; VELASCO, J.; FERNANDEZ, F.J.; MARTIN, J.F. The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase. *Journal of Bacteriology* 174: 3056-3064; 1992.

HALT, M. Moulds and mycotoxins in herb tea and medicinal plants. *European Journal of Epidemiology* 14 (3): 269-274; 1998.

HARRIS, J.P.; MANTLE, P.G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* 58: 709-716; 2001.

HEENAN, C.N.; SHAW, K.J.; PITT, J.I. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology* 1: 67-72; 1998.

HENDRICKSON, L.; DAVIS, C.R.; ROACH, C.; NGUYEN, D.K.; ALDRICH, T.; MCADA, P.C.; REEVES, C.D. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chemical Biology* 6 (7): 429-439; 1999.

HESELDTINE, C.W.; VANDEGRAFT, E.E.; FENNELL, D.I.; SMITH, M.L.; SHOTWELL, O.L. *Aspergilli* as ochratoxin producers. *Mycologia* 64 (3): 539-550; 1972.

HOHLER, D. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 37 (1): 2-12; 1998.

HOOPER, J. Polluted pasta causes toxin alarm in Italy. Guardian Unlimited. <http://www.guardian.co.uk/food/Story/0,1684524,00.html>; 2006.

HORIE, Y. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakukai Kaiho* 36: 73-76; 1995.

HUFF, W.E.; HAMILTON, P.B. Mycotoxins - their biosynthesis in fungi: ochratoxins - metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection* 42: 815-820; 1979.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Ochratoxin A. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 56: 489-521; 1993.

JORGENSEN, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 15 (5): 550-554; 1998.

KAROLEWIEZ, A.; GEISEN, R. Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 588-595; 2005.

KELLER, N.; TURNER, G.; BENNETT, J. Fungal secondary metabolism – From biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* 3: 937-947; 2005.

KENNEDY, J.; AUCLAIR, K.; KENDREW, S.G.; PARK, C.; VEDERAS, J.C.; HUTCHINSON, C.R. Modulation of polyketide synthase gene activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science* 284: 1368-1372; 1999.

KENNETH, J.L.; SCHMITTGEN T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . *Methods* 25: 402-408; 2001.

KIMURA, N.; TSUGE, T. Gene cluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *Journal of Bacteriology* 175: 4427-4435; 1993.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food Science and Technology, North Ryde, Australia; 1988.

KROKEN, S.; GLASS, N.L.; TAYLOR, J.W.; YODER, O.C.; TURGEON, B.G. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 100 (26): 15670-15675; 2003.

LASRAM, S.; BELLÍ, N.; CHEBIL, S.; NAHLA, Z.; AHMED, M.; SANCHIS, V.; GHORBEL, A. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology* 114: 376-379; 2007.

LEBLANC, J.C.; TARD, A.; VOLATIER, J.L.; VERGER, P. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. *Food Additives and Contaminants* 22: 652-672; 2005.

LEGARDA, T.M.; BURDASPAL, P.A. Occurrence of ochratoxin A in samples of bread marketed in Spain and twelve other countries. *Alimentaria* 321: 89-96; 2001.

MAJERUS, P.; BRESCH, H.; OTTENEDER, H. Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. *Archives für Lebensmittelhygiene* 51: 95-97; 2000.

MARKAKI, P.; DELPONT-BINET, C.; GROSSO, F.; DRAGACCI, S. Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Protection* 64: 533-537; 2001.

MILLER, D.J. Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product. *Journal of Stored Products Research* 31: 1-16; 1995.

MIRAGLIA, M.; BRERA, C. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. Reports on tasks for scientific cooperation - Reports of experts participating in SCOOP Task 3.2.7. Directorate-General Health and Consumer Protection, Rome, Italy; 2002.

MOSS, M.O. Recent studies of Mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 84: 62S-76S; 1998.

MÜHLENCOERT, E.; MAYER, I. ZAPF, M.W.; VOGEL, R.F.; NIESSEN, L. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 651-659; 2004.

MULLIS, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique* 48 (8): 579-82; 1990.

NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M.; UENO, Y. Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and Agricultural Immunology* 9: 77-83; 1997.

NAVAS, S.A.; SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Aflatoxin M1 and ochratoxin A in a human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants* 22: 457-462; 2005.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger Principles of biochemistry, fourth edition, USA; 2005.

NOVAIS, C.B.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 33: 10-13; 2004.

O'BRIEN, E.; DIETRICH, D.R. Ochratoxin A: The continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology* 35 (1): 33-60; 2005.

O'CALLAGHAN, J.; CADDICK, M.X.; DOBSON, A.D.W. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology* 149: 3485-3491; 2003.

O'CALLAGHAN, J.; STAPLETON, P.C.; DOBSON, A.D.W. Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics and Biology* 43: 213-221; 2006.

OGA, S. Fundamentos de toxicologia, second edition, Atheneu, São Paulo; 1996.

ORLANDO, C.; PINZANI, P.; PAZZAGLI, M. Developments in quantitative PCR. *Clinical Chemistry Laboratory Medicine* 36: 255-269; 1998.

OTTENEDER, H.; MAJERUS, P. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants* 17 (9): 793-798; 2000.

PEL, H.A.; 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.; 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, 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.M.; 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.J.; 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.; VAN OoyEN, A.J.J.; VISSER, J.; STAM, H. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology* 25: 221-231; 2007.
- PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? *Biochemical Pharmacology* 71 (7): 981-990; 2006.
- PETZINGER, E.; WEIDENBACH, A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science* 76: 245-250; 2002.
- PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007; 2001.
- PITT, J.I. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin* 56: 184-192; 2000.
- PROCTOR, R.H.; BROWN, D.W.; PLATTNER, R.D.; DESJARDINS, A.E. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics and Biology* 38: 237-249; 2003.
- PROCTOR, R.H.; HOHN, T.M.; MCCORMICK, S.P.; DESJARDINS, A.E. Tri6 encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Applied Environmental Microbiology* 61: 1923-1930; 1995.
- RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions* 159: 18-46; 2006.
- SAMSON, R.A. Current systematics of the genus *Aspergillus*. In: *The genus Aspergillus: from taxonomy and genetics to industrial application*. Powell, K.A.; Renwick, A.; Peberdy, J.F. (eds.). Plenum Press, New York, USA, pp. 261-276; 1994.
- SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.A.M.P.; KUIJPERS, A.F.A.; FRANK, J.M.; FRISVAD, J.C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 50: 45-6; 2004.
- SCHMIDT-HEYDT, M.; MAGAN, N.; GEISEN, R. Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters* 284: 142-149; 2008.

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

SCHWARTZ, G.G. Hypothesis: Does ochratoxin A cause testicular cancer? *Cancer Causes Control* 13: 91-100; 2002.

SCUDAMORE, K.A.; BANKS, J.; MCDONALD, K.J. The fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. *Food additives and contaminants* 20: 1153-1163; 2003.

SCUDAMORE, K.A.; MACDONALD, S.J. A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. *Food Additives and Contaminations* 15 (4): 401-410; 1998.

SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. Introduction to mycotoxins. In: *Mycotoxins and Phytoalexins*. Sharma, R.P.; Salunkhe, D.K. (Eds.). CRC Press, London , pp. 3-11; 1991.

SHUNDO, L.; ALMEIDA, A.P.; ALABURDA, J.; RUVIERI, V.; NAVAS, S.A.; LAMARDO, L.C.A.; SABINO, M. Ochratoxin A in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37 (4): 533-537, 2006.

SIMON, P. Ochratoxin and kidney disease in the human. *Journal of Toxicology: Toxin Review*, 15: 239-249; 1996.

SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. Mycotoxins and animal foods. London: CRC Press, 816-841; 1991.

TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 882: 23-28; 2000.

TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I.; URBANO, G.R.; TEIXEIRA, A.A.; LEITAO, M.F.F. Fungi producing ochratoxin A in coffee. 18th International Scientific Colloquium on Coffee. ASIC, Helsinki, pp. 239-247; 1999.

TÉREN, J.; PALÁGYI, A.; VARGA, J. Isolation of ochratoxin producing aspergilli from green coffee beans of different origin. *Cereal Research Communications* 25: 303-304; 1997.

TÉREN, J.; VARGA, J.; HAMARI, Z.; RINYU, E.; KEVEI, F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 134: 171-176; 1996.

THIRUMALA-DEVI, K.; MAYO, M.A.; REDDY, G.; EMMANUEL, K.E.; LARONDELLE, Y.; REDDY, D.V.R. Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriande, ginger and turmeric in India. *Food Additives and Contaminants* 18 (9): 830-835; 2001.

THUVANDER, A.; MÖELLER, T.; BARBIERI, H.E.; JANSSON, A.; SALOMONSSON, A.C.; OLSEN, M. Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. *Food Additives and Contaminants* 18: 696-706; 2001.

TRAPP, S.C.; HOHN, T.M.; McCORMICK, S.P.; JARVIS, B.B. Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecenes in *Myrothecium roridum*. *Molecular and General Genetics* 257: 421-432; 1998.

TSAI, H.; WHEELER, M.; CHANG, Y.; KWON-CHUNG, K. A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Bacteriology* 181: 6469-6477; 1999.

TSUDA, M.; SEKINE, T.; TAKEDA, M.; CHA, S.H.; KANAI, Y.; KIMURA, M.; ENDOU, H. Transport of ochratoxin A by renal multispecific organic anion transporter. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289: 1301-1305; 1999.

TUDZYNSKI, P.; HÖLTER, K.; CORREIA, T.; ARNTZ, C.; GRAMMEL, N.; KELLER, U. Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Molecular and General Genetics* 261: 133-141; 1999.

VALERO, A.; MARÍN, S.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Survey: Ochratoxin A in European special wines. *Food Chemistry* 108: 593-599; 2008.

VAN DER MERWE, K.J., STEYN, P.S., FOURIE, L., SCOTT, D.B., THERON, J.J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205 (976): 1112-1113; 1965.

VARGA, J.; KEVEI, E.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (12): 4461-4464; 1996.

VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin A in grapes and grape derived products. *Trends in Food Science & Technology* 17: 72-81; 2006.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÓTH, B.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology* 41 (1): 29-36; 2003.

VITZTHUM, F.; GEIGER, G.; BISSWANGER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Analytical Biochemistry*; 276 (1): 59-64; 1999.

WALKER R. Mycotoxins of growing interest. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins, Tunis. [http://www.fao.org/es/ESN/food/pdf/mycotoxins\\_report\\_en.pdf](http://www.fao.org/es/ESN/food/pdf/mycotoxins_report_en.pdf); 1999.

YU, J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.D. Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *FEBS Letters* 564: 126-130; 2004.

ZHANG Y-Q.; KELLER, N.P.; WILKINSON, H.; TSITSIGIANNIS, D. Secondary metabolite gene clusters. In: *Handbook of Industrial Microbiology*. An, Z. (ed.). Marcel Dekker, New York, pp. 355-386; 2004.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by HPLC with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: Methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications* 666: 85-99; 1995.

ZINEDINE, A.; JUAN, C.; IDRISSE, L.; MAÑES, J. Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco. *Microchemical Journal* 87: 154-158; 2007.

#### **4. ARTIGO CIENTÍFICO**

### **Molecular discrimination of ochratoxigenic and non-ochratoxigenic strains of *Aspergillus niger sensu stricto***

Carla Beatriz Fier

Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

Artigo submetido às normas do periódico “Applied and Environmental Microbiology”

1 **Molecular discrimination of ochratoxigenic and non-ochratoxigenic strains of *Aspergillus***  
2 ***niger sensu stricto*.**

3  
4 **Abstract**

5  
6 *A. niger sensu stricto* is sufficiently proved as a producer species of ochratoxin A.  
7 Although the ability of ochratoxin A production is restricted to only 3–10% of the strains within  
8 the species, the preoccupation with this point make sense since *A. niger* occurs very frequently  
9 in several agricultural products worldwide. Based on the nucleotide sequence of a polyketide  
10 synthase gene (*pks*) from *A. niger* CBS 513.88 deposited in the NCBI database (An15g07920)  
11 two primer pairs were designed in order to amplify two PKS domains (methyltransferase and  
12 ketosynthase). DNA from several ochratoxigenic and non-ochratoxigenic strains of *A. niger*  
13 was submitted to PCR and Southern blot analysis. A perfect association was found between  
14 molecular data and mycotoxin-producing abilities of the strains. A comparative genomic  
15 analysis of the strains ATCC 1015 and CBS 513.88 showed that no ortholog for *pks*  
16 An15g07920 gene was found in the ATCC 1015 genome, providing that it is a ochratoxigenic  
17 strain-specific gene. In addition, the investigation of one ochratoxigenic strain by using  
18 quantitative real time RT-PCR approach detected a positive correlation between the amount of  
19 OTA and the transcription levels of *pks* An15g07920. The genome of *A. niger* CBS513.88  
20 contains 34 PKS-encoding genes, as observed by the genome annotation; however our results  
21 show clearly that the presence of the *pks* gene annotated as An15g07920 is indispensable for the  
22 biosynthesis of OTA.

23  
24 **Keywords:** *Aspergillus niger*, ochratoxin A, molecular profile, polyketide synthase.

## 1 INTRODUCTION

2  
3 Ochratoxin A (OTA) is a secondary metabolite that is receiving increasing attention  
4 worldwide because of its severe nephrotoxicity. Moreover, the International Agency for  
5 Research on Cancer has classified OTA as a Group B2, i.e. the metabolite is a probable human  
6 carcinogen. As reviewed by Petzinger & Weidenbach (38), OTA-contaminated foods are  
7 abundantly found in Europe. About 57% of approximately 6500 food samples that were  
8 examined by Wolff and coauthors were contaminated with OTA above the detection limit of  
9  $0.01 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (57). The most important examples are grains, coffee beans, spices, nuts, grapes  
10 and figs (7, 8, 23, 26, 52). OTA is not totally decomposed during most food processing stages  
11 such as cooking, washing and fermenting, therefore it has been detected in manufactured food  
12 products, such as bread, beer, wine, coffee, and chocolate (20, 21, 25, 31, 54). Based on its  
13 possible effects on animal and human health, most countries have imposed statutory limits for  
14 OTA in some foods.

15 A few years ago, OTA was believed to be produced by *Penicillium verrucosum* and  
16 *Aspergillus ochraceus*. However, more recently, some species of the section *Nigri* were  
17 reported as important OTA producers (1, 2). Several authors indicated that this group of fungi is  
18 an important source of OTA in foods from tropical and subtropical regions (10, 22, 24, 32, 40,  
19 52).

20 Sixteen species are recognized in *Aspergillus* section *Nigri*. Interestingly, four of them  
21 (*A. niger* sensu stricto, *A. tubingensis*, *A. foetidus* and *A. brasiliensis*) are morphologically  
22 identical and form one entity called *A. niger* aggregate (45, 55). Although taxa included in the  
23 *A. niger* aggregate are morphologically indistinguishable, they differ on the ability to produce  
24 OTA and other metabolites. The production of OTA by *A. niger* sensu stricto was  
25 demonstrated, for the first time, by Abarca et al. (3) and confirmed by Taniwaki et al. (52) along

1 with other authors (14, 37). Until now, within the *A. niger* aggregate, only *A. niger* sensu stricto  
2 is sufficiently proved as an OTA producer species. Although the ability of OTA production is  
3 restricted to only 3–10% of the strains, the situation is a contemporary preoccupation because  
4 *A. niger* sensu stricto was reported to occur very frequently in several agricultural products  
5 worldwide. With reference to fungi with potential for colonizing coffee beans and producing  
6 OTA, recent studies have shown that *A. niger* is one of the most important species (29, 52).  
7 Similarly, *A. niger* is the most common species found in dried vine fruits (23, 30, 43).

8 In contradiction, *A. niger* is one of the most important microorganisms used for  
9 biotechnological purposes. For many decades, it has been used to produce citric acid, as a  
10 source of extracellular enzymes, and in the traditional process of oriental food manufacture.  
11 Products obtained from *A. niger* strains are considered GRAS (Generally Recognized as Safe)  
12 by United States Food and Drug Administration (49). After the discovery of *A. niger* is able to  
13 produce OTA, there is consensus that new and unknown isolates should be carefully checked  
14 for OTA production before their use for industrial purposes.

15 Some molecular methods for the detection of ochratoxigenic species in food samples  
16 were described, including *A. niger* (47). However, the presence of *A. niger* strains in food  
17 samples does not definitively indicate a toxicological risk because, as already stated, only few  
18 isolates have the capability for OTA production. Based on this fact, the development of a quick  
19 and easy strategy for specific identification of ochratoxigenic *A. niger* strains remains as a  
20 major toxicological challenge.

21 Although some researcher teams have already identified some genes related to OTA  
22 biosynthesis (5, 9, 28, 33, 35) no molecular markers are available to discriminate  
23 ochratoxigenic from non-ochratoxigenic strains. Therefore, our group has been engaged in an  
24 effort to find genome differences that could be useful for distinguishing toxigenic from  
25 non-toxigenic strains and fortunately, in this paper we described that a *pks* gene located on

1 chromosome III of *A. niger* is specific to OTA-producer strains.

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

## 1 MATERIAL AND METHODS

### 3 Strains

5 Thirty-nine strains, previously morphologically identified as *A. niger* aggregate  
6 obtained from dried fruits or coffee beans were analyzed (Table 1). Dried fruit samples from  
7 worldwide origin (Argentina, Chile, Iran, Turkey, Spain, Tunisia, USA, and Mexico) were  
8 purchased from different Brazilian markets, as described by Iamanaka et al. (23); coffee bean  
9 samples were obtained from different Brazilian States, as reported by Taniwaki et al. (52).

### 11 Ochratoxin A production

13 The ochratoxin production by each isolate was assessed as described by Taniwaki et al.  
14 (52). Briefly, isolates were three-point inoculated into Yeast Extract Sucrose Agar (YES Agar)  
15 and incubated at 25 °C for 7 days. Three agar plugs were removed from the central area of the  
16 colony, weighted, and introduced into a small vial. A 0.5 ml volume of methanol was added to  
17 the vial. After 60 min, extracts were filtered (Millex-Millipore) and injected into the HPLC  
18 (high performance liquid chromatography) system (Shimadzu 10VP). The system has a  
19 fluorescence detector operated at an excitation wavelength of 333 nm and an emission  
20 wavelength of 477 nm. The HPLC was fitted with a Shimadzu CLC G-ODS (4 x 10 mm) guard  
21 column and Shimadzu Shimpack CLC-ODS (4.6 x 250 mm) column. The mobile phase was  
22 methanol: acetonitrile: water: acetic acid (35:35:29:10) and the flow rate was 0.8 ml min<sup>-1</sup>. An  
23 ochratoxin A standard (Sigma) was used for the construction of the five-point calibration curve,  
24 peak areas versus mass (ng). The OTA concentration in the sample extract was determined by  
25 interpolation of resulting peak areas from the calibration graph.

## 1 **DNA extraction and RAPD analysis**

2  
3 Conidia of each isolated were inoculated in liquid medium (41) and incubated at 28 °C  
4 for 24 h at 180 rpm. Genomic DNA was extracted according to Azevedo et al. (6) and  
5 quantified using a fluorimetric method (Dyna Quant, Phamarcia). RAPD analysis was  
6 performed as described by Fungaro et al. (16). Briefly, fungal DNA sequences were amplified  
7 with the primer OPX-7 (Qiagen Operon). For a total reaction volume of 25 µL, the PCR  
8 conditions were 0.25 µM primer, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 U of  
9 native Taq DNA polymerase (Gibco-BRL), 0.25 mM of each dNTP and 25 ng of DNA.  
10 Amplifications were carried out in a Techne thermal cycler as follows: 3 min at 92 °C, then 40  
11 cycles of 40 s at 92 °C, 1 min 30 s at 40 °C and 2 min at 72 °C, and ending with 5 min at 72 °C.  
12 Amplification products were resolved by electrophoresis in 1.4% agarose gels, and viewed  
13 under an ultraviolet light source after ethidium bromide staining.

## 14 15 **Sequencing the β-tubulin gene**

16  
17 Amplification of the Bt2 region of the β-tubulin gene was carried out using the  
18 primer-pair described by Glass & Donaldson (19). The PCR products were directly sequenced  
19 as established by Sanger et al. (46) in a MegaBACE™ 1000 sequencer (Amersham  
20 Biosciences). The quality of the sequences was examined using the Phred/Phrap/Consed  
21 package (University of Washington).

22  
23  
24  
25

## 1 **PCR of the polyketide synthase gene**

2

3           Based on the nucleotide sequence (An15g07920) deposited in the NCBI database  
4 (www.ncbi.nlm.nih.gov/) of the polyketide synthase gene (*pkS*) from *A. niger* CBS 513.88 (36),  
5 two primer pairs were designed. The first one, denoted PKS15MT  
6 (5'GCTTTCATGGACTGGATG and 5'CATTTCGTTGATCCCATCG) was used in attempt  
7 to amplify a portion of the methyltransferase (MT) domain. The second pair, named PKS15KS  
8 (5'CAATGCCGTCCAACCGTATG and 5'CCTTCGCCTCGCCCGTAG), was used to  
9 amplify a portion of an additional PKS domain, the ketosynthase domain (KS). Amplifications  
10 were performed on a PTC 100 thermal cycler (MJ Research) using a 25 µL reaction volume  
11 containing 5 ng DNA template, 1 X PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM each dNTP, 0.4 µM  
12 each PCR primer and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies). Reactions  
13 were incubated for 4 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 45 s at 94 °C, 50 s at 60 °C and 1  
14 min at 72 °C. Amplification cycles finished with 5 min incubation at 72 °C. To confirm the  
15 presence of PCR-compatible DNA, positive controls were prepared by replacing the specific *A.*  
16 *niger* primer pairs for ITS1 and ITS4 primers (56) that amplify fungal rDNA ITS region.

17

## 18 **Cloning and sequencing the PCR products**

19

20           The PCR product was extracted from the gel and purified using the CONCERT Rapid  
21 Gel Extraction System (GibcoBRL). The resulting DNA was cloned using the TOPO TA  
22 Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen Life Technologies). The recombinant plasmid was  
23 purified using the CONCERT Rapid Plasmid Miniprep System (GibcoBRL). The insert was  
24 sequenced using the DYEnamic ET dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham  
25 Pharmacia Biotech) on MegaBACE 1000.

## 1 Southern blot analysis

2

3 Standard procedures described in Sambrook & Russell (44) were used for DNA  
4 digestion (*Hind* III), agarose-electrophoresis, and blotting onto nylon membranes.  
5 Approximately 4 µg of digested genomic DNA were submitted to electrophoresis in each track.  
6 A fragment of the MT domain of the *pks* gene (556 pb) was used as a probe, which was obtained  
7 by PCR using the sequences 5'TCCTACGACTTCACCGACAT and  
8 5'CATTTCGTTGATCCCATCG as forward and reverse primers, respectively.

9

## 10 Bioinformatic analyses

11

12 The following bioinformatics tools were used to analyze the ORFs An15g07910 and  
13 An15g07920. Multiple sequence alignment was performed with the ClustalW algorithm (53).  
14 The predicted amino acid sequences were compared with the non-redundant sequence  
15 databases using the BLAST algorithm (4). Primary structure analysis was performed using the  
16 ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>), and the molecular weight of the proteins  
17 was calculated with the ProtParam tool (18). The pFAM database was used to identify the  
18 conserved domains in the proteins (15). A blast interface on the site containing the genome  
19 sequence of *A. niger* ATCC 1015 strain (<http://genome.jgi-psf.org/Aspni5/Aspni5.home.html>)  
20 was used to investigate a possible genomic gap upstream and downstream of the *pks* gene. The  
21 sequences of the contig An15c0250 from CBS 513.88 strain, which contains the *pks* gene, were  
22 checked against the ATCC 1015 strain genome. As a gap was confirmed, the function and the  
23 substrate preference of a predicted non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) encoded by a  
24 *pks*-neighbor gene (An15g07910) was studied by NRPS Predictor using the SVM (Support  
25 Vector Machine) implementation (42).

## 1 **Kinetic studies of ochratoxin A production**

2  
3 Conidia obtained from one OTA-positive strain were inoculated at a density of  $10^6$  ml<sup>-1</sup>  
4 into 500-mL flasks containing 100 mL of permissive medium (CZ) ( $1.0$  g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  $5.0$  g L<sup>-1</sup>  
5 yeast extract,  $30$  g L<sup>-1</sup> sucrose,  $10$  mL Czapek). The flasks were incubated in the dark at  $25$  °C  
6 for 1, 3, 5, 7, 9 and 11 days. After each time, the OTA content in culture broths was measured  
7 by high performance liquid chromatography. For OTA extraction, the kit  
8 OCHRAPREP®-Quantitative Detection of Ochratoxin A (R-Biopharm) was used. A Shimadzu  
9 LC-10VP HPLC System (Shimadzu, Japan) was used with fluorescence detection set at  $333$  nm  
10 excitation and  $443$  nm emission. An ACQUITY UPLC HSS C18 column ( $1.8$  μm,  $1.0$  x  $150$   
11 mm) (Waters) was employed. The mobile phase was an acetonitrile: water: acetic acid  
12 ( $51:47:2$ ) mixture and the flow rate was  $1$  mL min<sup>-1</sup>. An OTA standard (Sigma) was used for the  
13 construction of a calibration curve, peak area versus concentration (μg<sup>-1</sup>). The OTA  
14 concentration in sample extracts was determined by the interpolation of peak area results from  
15 the calibration graph.

## 16 17 **RT-real time PCR**

18  
19 For verifying possible association between *pks* gene expression and OTA production,  
20 the strain ITAL 1242 were grown under restrictive and permissive conditions for the toxin  
21 production. Conidia (approximately  $10^8$  mL<sup>-1</sup>) were inoculated into 100 mL of two media: CZ  
22 ( $1.0$  g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  $5.0$  g L<sup>-1</sup> yeast extract,  $30$  g L<sup>-1</sup> sucrose,  $10$  mL Czapek) and EM ( $20$  g L<sup>-1</sup>  
23 malt extract;  $20$  g L<sup>-1</sup> glucose;  $1$  g L<sup>-1</sup> pepton). The pH of both media was adjusted to  $5.0$ . After  
24 grown in the dark for five days, RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen).  
25 First-strand cDNA synthesis was performed with reverse transcriptase (RT M-MLV,

1 Invitrogen) according to the manufacturer's protocol from 1  $\mu$ g of total RNA. PCR was  
2 performed in a PTC 200 DNA engine cycler using a Chromo4 Detection System (MJ  
3 Research). The Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen Life  
4 Technologies) was used as reaction mixture, adding 0.4  $\mu$ M of each primer  
5 (5'GACCGAGGCACAAGATGGC and 5'ACAGTTTGGGACGCAGGATA) and 2  $\mu$ L of  
6 template cDNA, in a final volume of 25  $\mu$ L. The cycling conditions were: an initial step at 95 °C  
7 for 5 min, and 40 cycles at 95 °C for 20 s, 62 °C for 15 s and 72 °C for 20 s, followed by 95 °C for  
8 10 s and 40 °C for 1 min. A melting curve analysis was persistently performed at the end of each  
9 reaction to check for primer-dimer artifacts and contamination. In addition, in all experiments,  
10 appropriate negative controls containing no template DNA were submitted to the same  
11 procedure to exclude or detect any possible contamination. The values were normalized against  
12 the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (*g3pdh*) that was amplified  
13 using the primers 5'TCGTCAACGGCAAGAAGATT and  
14 5'TAGCAAGGGGAGCAAGGCAGT. The software REST-MCS<sup>®</sup>  
15 ([www.gene-quantification.info](http://www.gene-quantification.info)) (39) was used for analyzing the relative expression results.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

## 1 RESULTS AND DISCUSSION

2  
3 The taxonomic status of the strains used in the present study was confirmed by  
4 molecular and morphological data. These two types of data are complementary and indicated  
5 that the all strains (39) are in fact *A. niger* sensu stricto. As shown in Fig. 1, *A. niger* sensu  
6 stricto and *A. lacticoffeatus* cannot be separated based on the  $\beta$ -*tub2* sequences; however, there  
7 are evident differences in their colony color. *A. lacticoffeatus* has sulphur yellow mycelium on  
8 YES agar (45) differently from our strains. As expected for a unique species, the strains share a  
9 significant number of RAPD bands and some variability was found supporting that they are not  
10 clones (Fig. 1). Along with other reports (17, 47), we found no association between the RAPD  
11 data and the ability of the strains to produce OTA.

12 Differently from *A. ochraceus* which the polyketide synthase gene (*pks*) was  
13 sufficiently proved to be involved in OTA biosynthesis (13, 33, 35), there is not such evidence  
14 in *A. niger*. Then, we searched *in silico* for a similar *pks* gene in *A. niger* CBS 513.88 genome  
15 (36). The BLAST-based analysis allowed the identification of a *pks* gene (An15g07920)  
16 located on chromosome III of *A. niger* with high level of identity (80%) with the *pks* partial cds  
17 sequence (gi 50983020) of *A. ochraceus*.

18 As reviewed by Cox (12), the principal domains that occur within fungi PKS were found  
19 in the hypothetical protein encoded by An15g07920 (Fig. 2). The predicted domains KAS  
20 ( $\beta$ -ketoacylsynthase), AT (acyl transferase), KR (ketoreductase), ADH-Zn (alcohol  
21 dehydrogenase dependent of Zinc), and MT (methyltransferase) suggests that this PKS  
22 probably produces partially reduced (PR) compounds. Surprisingly, acyl carrier protein domain  
23 (ACP) were not found.

24 As the ability of OTA production is restricted to only 3–10% of the *A. niger* strains, it  
25 made sense to investigate the presence of the *pks* locus as well as its expression in the

1 ochratoxigenic and non-ochratoxigenic strains. The sequence An15g07920 was used to design  
2 a primer-pair (PKS15MT) to amplify a portion of the methyltransferase (MT) PKS domain. As  
3 shown in Fig. 3, a perfect association was found between PCR profiles and mycotoxin  
4 producing properties of the strains. A single 998-bp band was detected in all OTA producers  
5 (24 strains), which was not detected in all non-producers (15 strains). The presence of an  
6 additional PKS domain, the ketosynthase domain (KS) was also investigated. A consistent  
7 result was obtained using the primer-pair (PKS15KS) that was able to amplify a single 766-bp  
8 band in the OTA producers only. Sequencing analysis of both amplicons did confirm their *pks*  
9 identity.

10 Before concluding, an additional precaution was taken to prove the *pks* locus is specific  
11 to OTA-producer strains. A segment of the methyltransferase domain (556-bp) was used as a  
12 probe in a Southern blot analysis. Both PCR and Southern blot data were in total agreement as  
13 all OTA producer strains showed a DNA hybridization signal that was not detected in all  
14 non-producer strains (Fig. 4).

15 The complete genome of a wild type strain of *A. niger* (ATCC 1015) was recently  
16 released (<http://genome.jgi-psf.org/Aspni1/Aspni1.home.html>). This strain was the one that has  
17 the first patent to citric acid production. We search for the An15g07920 locus into the ATCC  
18 1015 by using BLASTn and BLASTx algorithms, and interestingly no orthologs were found.

19 Sun et al. (51) did a comparative genomic analysis of two *A. niger* strains (ATCC 9029  
20 and CBS 513.88) showing that around 600 CDSs of CBS 513.88 do not have orthologs in  
21 ATCC 9029. Among these CBS 513.88 unique genes, some encodes for enzymes of secondary  
22 metabolism, such as cephalosporin acylase. In addition, 52 genes of a large cluster spanning  
23 over 90 genes (from An08g11200 to An08g12140) were reported to be unique to CBS 513.88.

24 As mycotoxin genes are usually organized in clusters, we compared the genome  
25 sequences of the strains ATCC 1015 and CBS 513.88 regarding the upstream and downstream

1 regions of the *pks* An15g07920 gene. Interestingly, a gap of 22 kb was detected: the region  
2 between the ORFs An15g07880 and An15g07920 of CBS 513.38 strain was not found into the  
3 ATCC 1015 genome (Fig. 5). The rest of the contig was detected. Out of the five missing ORFs  
4 in ATCC 1015, two are annotated as hypothetical proteins, one is a putative cytochrome P450  
5 (An15g077900), one is a putative NRPS (An15g077910) and the other, obviously, is the PKS  
6 under study (An15g077920). Our experimental data and bioinformatics analyses are in  
7 accordance with O'Callaghan & Dobson (34) suggestion about the role of those enzymes in the  
8 ochratoxin biosynthesis. This stimulate us to analyze the substrate preference of the NRPS  
9 (An15g07910) using the NRPS predictor (42).

10 Similarly to PKS, NRPS are multi-domain enzymes but they participate in reactions of  
11 peptide bond formation and they are key enzymes in bioactive metabolites biosynthesis in  
12 bacteria and fungi (50). NRPS are composed of the following domains: adenylation (A),  
13 thiolation (T) (or peptidyl carrier protein, PCP), and condensation (C) that should be grouped  
14 together in a single module (50). The predicted NRPS from *A. niger* CBS 513.38 has 1880  
15 amino acids, approximately 205 kDa that seems to have just one module with the following  
16 conserved domains: AMP-binding (A), thiolation (T) and condensation (C) (Fig. 2). This NRPS  
17 has higher specificity for small hydrophobic amino acids (gly, val, ala, leu, ile), although a  
18 BLASTp analysis of its AMP-binding site has shown 26% of identity to the phenylalanine  
19 activating domain of gramicidin synthase from the bacterium *Brevibacillus brevis* (11). Then, it  
20 is probable that this NRPS, which gene is flanked downstream by the *pks* gene in the *A. niger*  
21 CBS 513.38, is also involved in the ochratoxin biosynthesis. In *Penicillium nordicum*, an OTA  
22 producer ascomycete, a cluster with PKS and NRPS genes was identified and the expression of  
23 both enzymes were reported to be associated with ochratoxin biosynthesis (27, 48).

24 Finally, we used the quantitative real time RT-PCR approach to confirm that the amount  
25 of OTA and the transcription levels of *pks* An15g07920 are associated. Based on the kinetics of

1 OTA production (data not show), the point for extracting total RNA and OTA quantification  
2 was chosen and one OTA-positive strain (ITAL 1242) were grown in both restrictive (EM) and  
3 permissive (CZ) media. As expected, OTA was detected in CZ medium ( $5.2 \text{ ng mL}^{-1}$ ) but no  
4 production of OTA was detected under restrictive condition. Relative expression of the *pks*  
5 An15g07920 gene in permissive medium was on average more than two times in comparison to  
6 that obtained in restrictive medium. The positive association between the amount of OTA and  
7 the transcript levels is shown in Fig. 6.

8 In this contribution, we announce that the presence of a PKS-encoding gene is essential  
9 for the biosynthesis of OTA in *A. niger*. As this species is frequently applied for several  
10 industrial purposes and it is often found in a number of agricultural products, we recommend  
11 using this *pks* gene as a molecular marker for discriminating *A. niger* strains concerning their  
12 ability to produce OTA. This approach will guarantee that products of fungal fermentation or  
13 maturation are ochratoxin-free.

## 14

## 15 **ACKNOWLEDGMENTS**

16

17 Authors thank to the following Brazilian institutions: Conselho Nacional de Pesquisa  
18 (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES),  
19 Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), and Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado  
20 do Paraná (SETI).

## 21

## 22 **REFERENCES**

- 23
- 24 1. Abarca, M. L., F. Accensi, M. R. Bragulat, and F. J. Cabañes. 2001. Current importance  
25 of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *J. Food Protect.* **64**:903–906.

- 1       2. Abarca, M. L., M. R. Bragulat, G. Castellá, F. Accensi, and F. J. Cabañes. 1997. New  
2       ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. *J. Food Protect.* **60**:1580–1582.  
3
- 4       3. Abarca, M. L., M. R. Bragulat, G. Castellá, and F. J. Cabañes. 1994. Ochratoxin A  
5       production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*  
6       **60**:2650–2652.  
7
- 8       4. Altschul, S. F., J. C. Wootton, E. M. Gertz, R. Agarwala, A. Morgulis, A. A. Schaffer,  
9       and Y. K. Yu. 2005. Protein database searches using compositionally adjusted  
10      substitution matrices. *FEBS J.* **272**:5101–5109.  
11
- 12      5. Atoui, A., H. P. Dao, F. Mathieu, and A. Lebrihi. 2006. Amplification and diversity  
13      analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus*  
14      *ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. *Mol. Nutr. Food*  
15      *Res.* **50**:488–493.  
16
- 17      6. Azevedo, A. C. S., M. C. Furlaneto, D. R. Souza-Gomes, and M. H. P. Fungaro. 2000.  
18      Molecular characterization of *Paecilomyces fumoroseus* (*Deuteromycotina*  
19      *Hyphomycetes*) isolates. *Sci. Agric.* **57**:729–732.  
20
- 21      7. Battilani, P., A. Pietri, T. Bertuzzi, L. Languasco, P. Giorni, and Z. Kozakiewicz. 2003.  
22      Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *J. Food Protect.*  
23      **66**:633–636.  
24

- 1 8. Bayman, P., J. L. Baker, M. A. Doster, T. J. Michailides, and N. E. Mahoney. 2002.  
2 Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*.  
3 Appl. Environ. Microbiol. **68**:2326–2329.  
4
- 5 9. Bogs, C., P. Battilani, and R. Geisen. 2006. Development of a molecular detection and  
6 differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its  
7 application to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. Int. J.  
8 Food Microbiol. **107**:39–47.  
9
- 10 10. Cabañes, F. J., F. Accensi, M. R. Bragulat, M. L. Abarca, G. Castellá, S. Minguez, and  
11 A. Pons. 2002. What is the source of ochratoxin A in vine? Int. J. Food Microbiol.  
12 **79**:213–215.  
13
- 14 11. Conti, E., T. Stachelhaus, M. A. Marahiel, and P. Brick. 1997. Structural basis for the  
15 activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. EMBO  
16 J. **16**:4174–4183.  
17
- 18 12. Cox, R. J. 2007. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines  
19 begin to reveal their secrets. Org. Biomol. Chem. **5**:2010–2026.  
20
- 21 13. Dao, H. P., F. Mathieu, and A. Lebrihi. 2005. Two primer pairs to detect OTA  
22 producers by PCR method. Int. J. Food Microbiol. **104**:61–67.  
23

- 1 14. Esteban, A., M. L. Abarca, M. R. Bragulat, and F. J. Cabañes. 2004. Effects of  
2 temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. *Res.*  
3 *Microbiol.* **155**:861–866.
- 4
- 5 15. Finn, R. D., J. Tate, J. Mistry, P. C. Coggill, J. S. Sammut, H. R. Hotz, G. Ceric, K.  
6 Forslund, S. R. Eddy, E. L. Sonnhammer, and A. Bateman. 2008. The *pfam* protein  
7 families database. *Nucl. Acids Res.* **36**:D281-D288.
- 8
- 9 16. Fungaro, M. H. P., M. L. C. Vieira, A. A. Pizzirani-Kleiner, and J. L. Azevedo. 1996.  
10 Diversity among soil and insect isolates *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*  
11 detected by RAPD. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**:389–392.
- 12
- 13 17. Fungaro, M. H. P., P. C. Vissotto, D. Sartori, L. A. Vilas-Boas, M. C. Furlaneto, and M.  
14 H. Taniwaki. 2004. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in  
15 Coffee Beans. *Curr. Microbiol.* **49**:123–127.
- 16
- 17 18. Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, and A.  
18 Bairoch. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server, p.  
19 571-607. In: J.M. Walker (ed.), *The proteomics protocols handbook*, Humana Press,  
20 Switzerland.
- 21
- 22 19. Glass, N. L., and G. C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use  
23 with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl.*  
24 *Environ. Microbiol.* **61**:1323–1330.
- 25

- 1 20. González-Osnaya, L., J. M. Soriano, J. C. Moltó, and J. Mañes. 2007. Dietary intake of  
2 ochratoxin A from conventional and organic bread. *Int. J. Food Microbiol.* **118**:87–91.  
3
- 4 21. Gumus, T., M. Arici, and M. Demirci. 2004. A survey of barley, malt and beer  
5 contamination with ochratoxin A in Turkey. *J. Inst. Brew.* **110**:146–149.  
6
- 7 22. Heenan, C. N., K. J. Shaw, and J. I. Pitt. 1998. Ochratoxin A production by *Aspergillus*  
8 *carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *J. Food*  
9 *Mycol.* **1**:67–72.  
10
- 11 23. Iamanaka, B. T., M. H. Taniwaki, H. C. Menezes, E. Vicente, and M. H. P. Fungaro.  
12 2005. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. *Food.*  
13 *Addit. Contam.* **22**:1258–1263.  
14
- 15 24. Joosten, H. M. L. J., J. Goetz, A. Pittet, M. Schellenberg, and P. Bucheli. 2001.  
16 Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *Int. J. Food*  
17 *Microbiol.* **65**:39–44.  
18
- 19 25. Jorgensen, K. 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A.  
20 *Food Addit. Contam.* **15**:550–554.
- 21 26. Jorgensen, K., and J. S. Jacobsen. 2002. Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat  
22 and rye, 1992–1999. *Food Addit. Contam.* **19**:1184–1189.  
23
- 24 27. Karolewicz, A., and R. Geisen. 2005. Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic  
25 gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide

- 1 synthase gene. Syst. Appl. Microbiol. **28**:588–595.
- 2
- 3 28. Lebrihi, A., F. Mathieu, L. P. Borgida, and A. M. Guyonvarch. 2003. Method for the  
4 detection of ochratoxin A- or citrinin-producing fungi. European patent EP1329521.
- 5
- 6 29. Leong, S. L., L. T. Hien, T. V. An, N. T. Trang, A. D. Hocking, and E. S. Scott. 2007.  
7 Ochratoxin A-producing aspergilli in Vietnamese green coffee beans. Lett. Appl.  
8 Microbiol. **45**:301–306.
- 9
- 10 30. Magnoli, C., A. Astoreca, L. Ponsone, M. Combina, G. Palácio, C. A. R. Rosa, and A.  
11 M. Dalcero. 2004. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from  
12 Argentina markets. Lett. Appl. Microbiol. **39**:326–331.
- 13
- 14 31. Markaki, P., C. Delpont-Binet, F. Grosso, and S. Dragacci. 2001. Determination of  
15 ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid  
16 chromatography. J. Food Protect. **64**:533–537.
- 17
- 18 32. Nakajima, M., H. Tsubouchi, M. Miyabe, and Y. Ueno. 1997. Survey of aflatoxin B1  
19 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid  
20 chromatography linked with immunoaffinity chromatography. Food Agric. Immunol.  
21 **9**:77–83.
- 22
- 23 33. O’Callaghan, J., M. X. Caddick, and A. D. W. Dobson. 2003. A polyketide synthase  
24 gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. Microbiology  
25 **149**:3485–3491.

- 1 34. O'Callaghan, J., and A. D. W. Dobson. 2006. Molecular characterization of ochratoxin  
2 A biosynthesis and producing fungi. *Adv. Appl. Microbiol.* **58**:227–243.
- 3
- 4 35. O'Callaghan, J., P. C. Stapleton, and A. D. W. Dobson. 2006. Ochratoxin A  
5 biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and  
6 nutritional stimuli. *Fungal Genet. Biol.* **43**:213–221.
- 7
- 8 36. Pel, H. A., J. H. Winde, D. B. Archer, P. S. Dyer, G. Hofmann, P. J. Schaap, G. Turner,  
9 R. P. Vries, R. Albang, K. Albermann, M. R. Andersen, J. D. Bendtsen, J. A. E. Benen,  
10 M. Berg, S. Breesstraat, M. X. Caddick, R. Contreras, M. Cornell, P. M. Coutinho, E. G.  
11 J. Danchin, A. J. M. Debets, P. Dekker, P. W. M. Van Dijck, A. Van Dijk, L.  
12 Dijkhuizen, J. M. Driessen, C. D'Enfert, S. Geysens, C. Goosen, G. S. P. Groot, P. W. J.  
13 De Groot, T. Guillemette, B. Henrissat, M. Herweijer, J. P. T. W. Van den Hombergh,  
14 C. A. M. J. J. Van den Hondel, R. T. J. M. Van der Heijden, R. M. Van Der Kaaij, F. M.  
15 Klis, H. J. Kools, C. M. Kubicek, P. A. Van Kuyk, J. Lauber, X. Lu, M. J. E. C. Van Der  
16 Maarel, R. Meulenbergh, H. Menke, M. A. Mortimer, J. Nielsen, S. J. Oliver, M.  
17 Olsthoorn, K. Pal, N. N. M. E. Van Peij, A. F. J. Ram, U. Rinas, J. A. Roubos, C. M. J.  
18 Sagt, M. Schmoll, J. Sun, D. Ussery, J. Varga, W. Vervecken, P. J. J. Van de  
19 Vondervoort, H. Wedler, H. A. B. Wösten, A. Zeng, A. J. J. Van Ooyen, J. Visser, and  
20 H. Stam. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory  
21 *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.* **25**:221–231.
- 22
- 23 37. Perrone, G., G. Mulè, A. Susca, P. Battilani, A. Pietri, and A. Logrieco. 2006.  
24 Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of  
25 *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated

- 1 from grapes in Italy. *Environ. Microbiol.* **72**:680–685.
- 2
- 3 38. Petzinger, E., and A. Weidenbach. 2002. Mycotoxins in the food chain: the role of  
4 ochratoxins. *Livest. Prod. Sci.* **76**:245–250.
- 5
- 6 39. Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, and L. Dempfle. 2002. Relative expression software tool  
7 (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression  
8 results in real-time PCR. *Nucl. Acids Res.* **30**:1–10.
- 9
- 10 40. Pitt, J. I. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br. Med. Bull.* **56**:184–192.
- 11
- 12 41. Pontecorvo, G., J. A. Roper, L. M. Hemmons, K. D. Macdonald, and A. W. Bufton.  
13 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* **5**:141–238.
- 14
- 15 42. Rausch, C., T. Weber, O. Kohlbacher, W. Wohlleben, and D. H. Huson. 2005.  
16 Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases  
17 (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). *Nucl. Acids Res.*  
18 **33**:5799–5808.
- 19 43. Romero, S. M., R. M. Comerio, G. Larumbe, A. Ritieni, G. Vaamonde, and V. F. Pinto.  
20 2005. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *Int. J. Food*  
21 *Microbiol.* **104**:43–49.
- 22
- 23 44. Sambrook, J., and D. W. Russel. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold  
24 Spring Harbor, Laboratory Press, New York, USA.
- 25

- 1 45. Samson, R. A., J. A. M. P. Houbraken, A. F. A. Kuijpers, J. M. Frank, and J. C. Frisvad.  
2 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*.  
3 *Stud. Mycol.* **50**:45–61.  
4
- 5 46. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with  
6 chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463–5467.  
7
- 8 47. Sartori, D., M. C. Furlaneto, M. K. Martins, M. R. F. De Paula, A. A. Pizzirani-Kleiner,  
9 M. H. Taniwaki, and M. H. P. Fungaro. 2006. PCR method for the detection of  
10 potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Res. Microbiol.*  
11 **157**:350–354.  
12
- 13 48. Schmidt-Heydt, M., E. Baxter, R. Geisen, and N. Magan. 2007. Physiological  
14 relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and  
15 *otapksPV* gene expression by *Penicillium verrucosum*. *Int. J. Food Microbiol.*  
16 **119**:277–283.  
17
- 18 49. Schuster, E., N. Dunn-Coleman, J. C. Frisvad, and P. W. Van Dijck. 2002. On the  
19 safety of *Aspergillus niger* - a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**:426–435.  
20
- 21 50. Stack, D., C. Neville, and S. Doyle. 2007. Nonribosomal peptide synthesis in  
22 *Aspergillus fumigatus* and other fungi. *Microbiology* **153**:1297–1306.  
23
- 24 51. Sun, J., X. Lu, U. Rinas, and A. P. Zeng. 2007. Metabolic peculiarities of *Aspergillus*  
25 *niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biol.* **8**:R182.

- 1 52. Taniwaki, M. H., J. I. Pitt, A. A. Teixeira, and B. T. Iamanaka. 2003. The source of  
2 ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int.*  
3 *J. Food Microbiol.* **82**:173–179.
- 4
- 5 53. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. Clustal-W-Improving the  
6 sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,  
7 position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*  
8 **22**:4673–4680.
- 9
- 10 54. Visconti, A., M. Pascale, and G. Centonze. 2001. Determination of ochratoxin A in  
11 wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis  
12 with fluorometric detection: collaborative study. *J. AOAC Int.* **84**:1818–1827.
- 13
- 14 55. Vries, R. P., J. C. Frisvad, P. J. Van de Vondervoort, K. Burgers, A. F. Kuijpers, R. A.  
15 Samson, and J. Visser. 2005. *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black  
16 aspergilli. *Antonie Leeuwenhoek* **87**:195–203.
- 17
- 18 56. White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing  
19 of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322. In: M.A. Innis, D.H.  
20 Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (ed.), *PCR Protocols: A guide to methods and*  
21 *applications*, Academic Press, Inc., New York.
- 22
- 23 57. Wolff, J., H. Bresch, C. Cholmakov-Bodechtel, G. Engel, M. Gareis, P. Majerus, H.  
24 Rosner, and R. Scheuer. 2000. Ochratoxin A: Contamination of foods and consumer  
25 exposure final evaluation. *Arch. Lebensmittelhyg* **51**:115–117.

TABLE 1 – List of strains, sources, origin, and ability to produce ochratoxin A.

<b>Strain</b>	<b>Food source</b>	<b>Origin</b>	<b>OTA</b>
ITAL 150	black sultanas	Iran	+
ITAL 152	prunes	Chile	+
ITAL 176	black sultanas	Argentina	+
ITAL 178	black sultanas	Argentina	+
ITAL 180	black sultanas	Argentina	+
ITAL 249	dried figs	Turkey	+
ITAL 250	dried figs	Turkey	+
ITAL 318	dates	Spain	+
ITAL 331	dates	Spain	+
ITAL 426	prunes	Argentina	+
ITAL 428	prunes	Argentina	+
ITAL 429	prunes	Argentina	+
ITAL 430	prunes	Argentina	+
ITAL 431	prunes	Argentina	+
ITAL 490	dates	Tunisia	+
ITAL 493	dates	Tunisia	+
ITAL 494	dates	Tunisia	+
ITAL 498	dates	Tunisia	+
ITAL 499	dates	México	+
ITAL 501	dates	México	+
ITAL 437	prunes	Argentina	+
ITAL 327	dates	Spain	+
ITAL 177	black sultanas	Argentina	-
ITAL 402	black sultanas	USA	-
ITAL 403	black sultanas	USA	-
ITAL 404	black sultanas	USA	-
ITAL 405	black sultanas	USA	-
ITAL 406	black sultanas	USA	-
ITAL 424	prunes	Argentina	-
ITAL 425	prunes	Argentina	-
ITAL 438	prunes	Argentina	-
ITAL 439	prunes	Argentina	-
ITAL 496	dates	Tunisia	-
ITAL 500	dates	México	-
ITAL 528	dates	USA	-
ITAL 1240	coffee	Brazil	+
ITAL 1242	coffee	Brazil	+
ITAL 777	coffee	Brazil	-
ITAL 1248	coffee	Brazil	-

(+) OTA producer; (-) OTA non-producer

1 **FIGURE LEGEND**

2

3 FIG. 1. (a) Tree of *Aspergillus* from section *Nigri* based on sequences of  $\beta$ -*tubulin* gene.  
4 Numbers above branches correspond to bootstrap values generated by CLUSTAL X 1.6. (b)  
5 Electrophoretic pattern of amplified polymorphic DNA from 39 *Aspergillus niger* strains using  
6 the random primer OPX-7. 1Kb Ladder-plus (Invitrogen Life Technologies) was used as  
7 molecular weight standard.

8

9 FIG. 2. General architecture of (a) PKS and (b) NRPS determined to the ORFs An15g07920  
10 and An15g07910, respectively. In (a) KAS –  $\beta$ -ketoacylsynthase, AT – acyl transferase, MT –  
11 methyl transferase, ADH-Zinc – alcohol dehydrogenase dependent of Zn, KR – ketoreductase.  
12 In (b) AMP – Adenosinemonophosphate-binding site, PP – Phosphopantetheine attachment  
13 site, Condensation – condensation domain.

14

15 FIG. 3. (a) Amplification products obtained by using the primer pair named PKS15MT. (b)  
16 Amplification products obtained by using the primer pair denoted PKS15KS.

17

18 FIG. 4. Southern blot of 12 random selected *A. niger* strains (1-7 ochratoxin producer strains  
19 and 8-12 non-ochratoxin producer strains). Genomic DNA was digested with *Hind* III and  
20 electrophoresed on a 0.8% agarose gel. For hybridization a fragment of *pks* gene labelled with  
21  $P^{32}$  was used. Lane 13 is a positive control, plasmid with a *pks* fragment; M - molecular marker  
22 (Kb).

23

24 FIG. 5. Alignment of the contig An15c0250 from *A. niger* CBS 513.88 (y) versus the genome  
25 of *A. niger* ATCC 1015 (x). The gap region is pointed out, the scales are the nucleotides

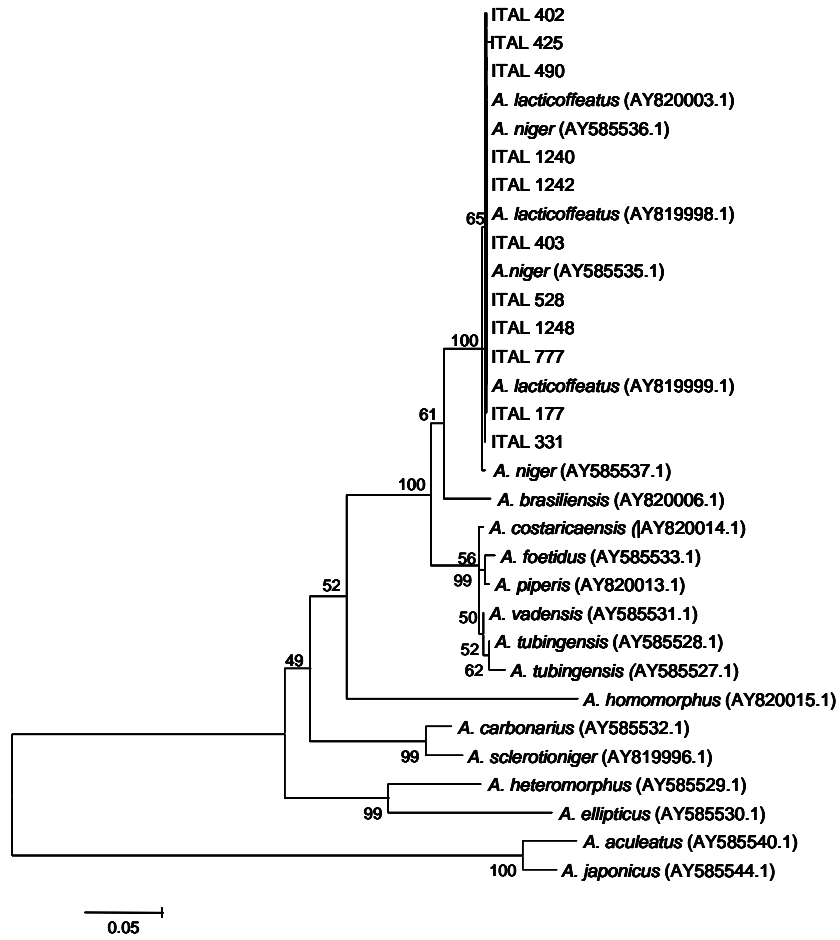
1 positions in each sequence.

2

3 FIG. 6. Quantitative real time RT-PCR analysis to confirm that the *pks* gene is associate to OTA

4 biosynthesis.

a)



b)

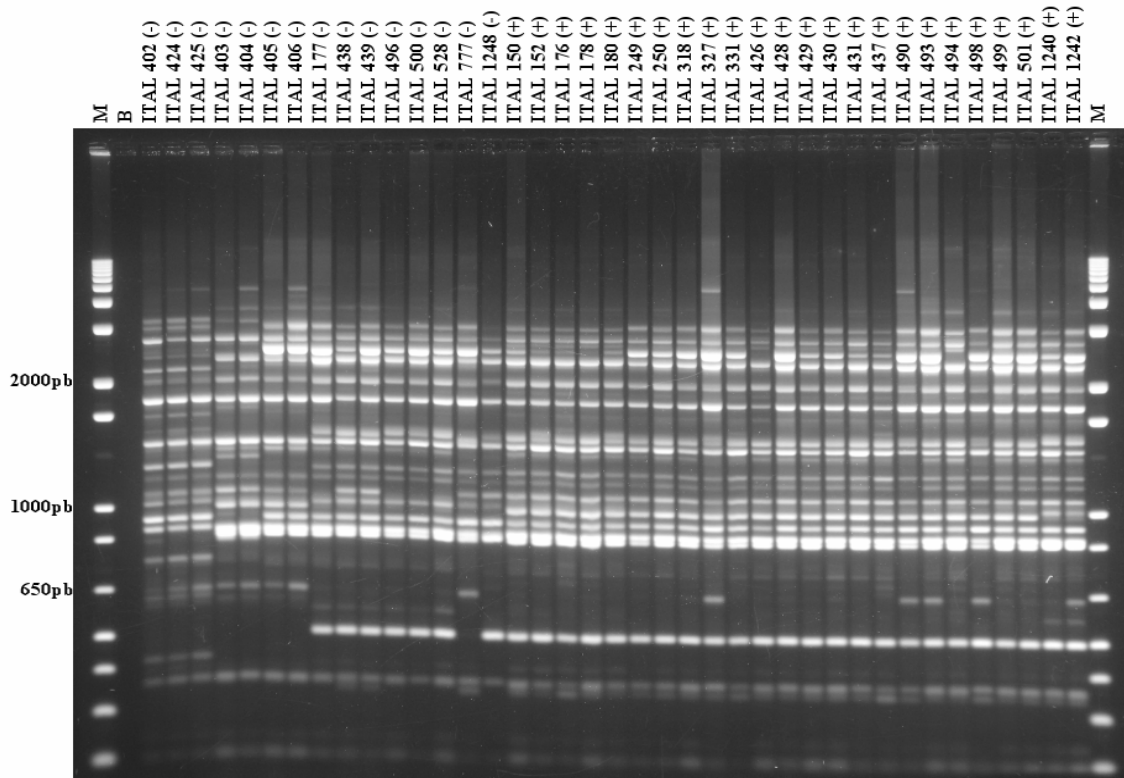


FIG. 1

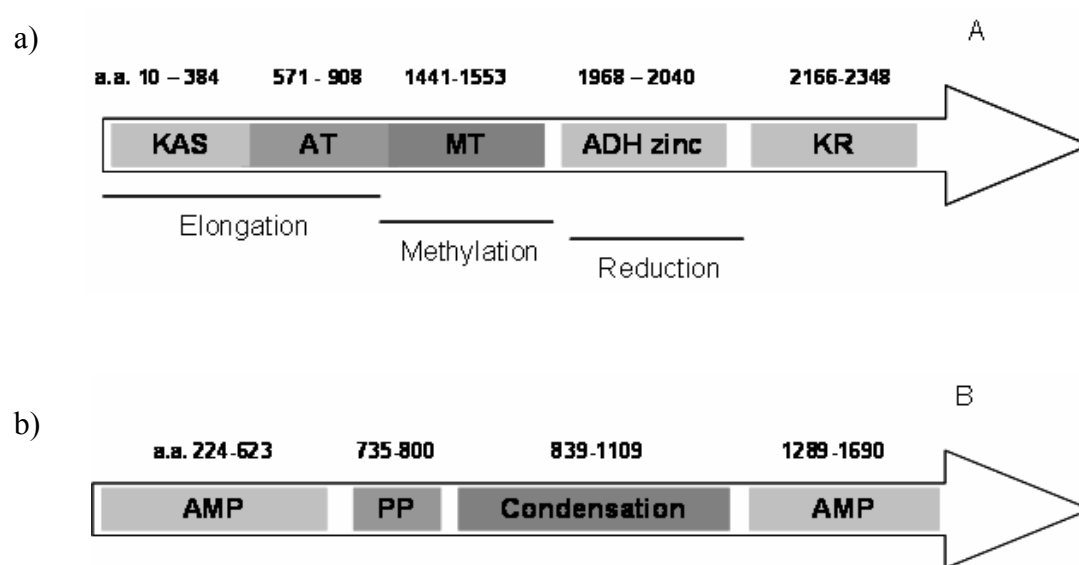
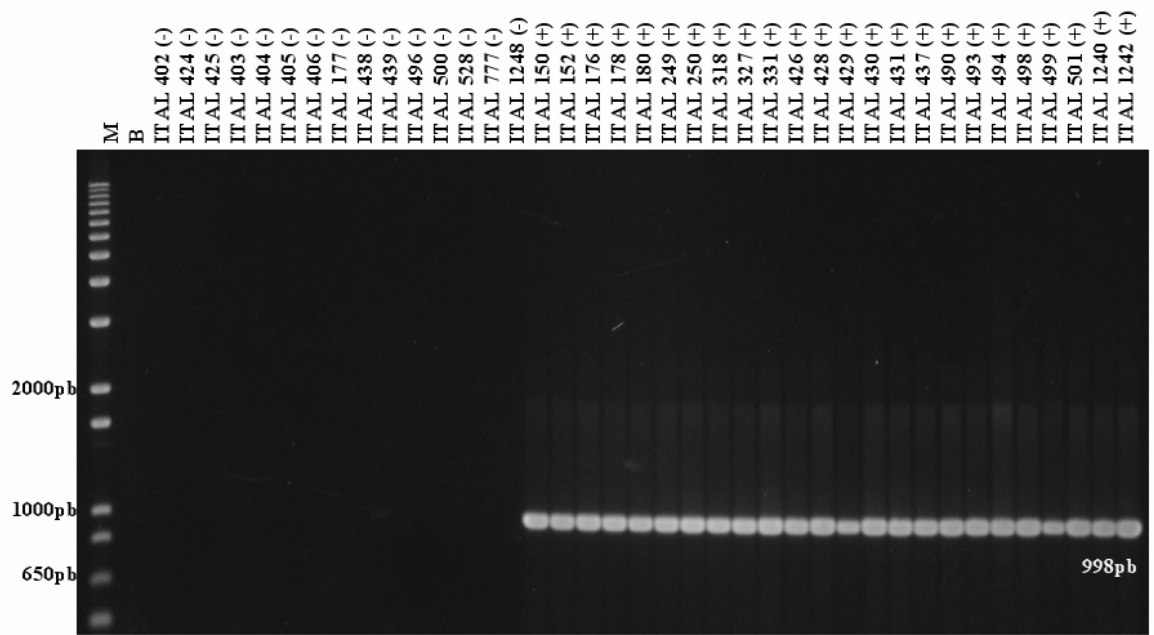


FIG. 2

a)



b)

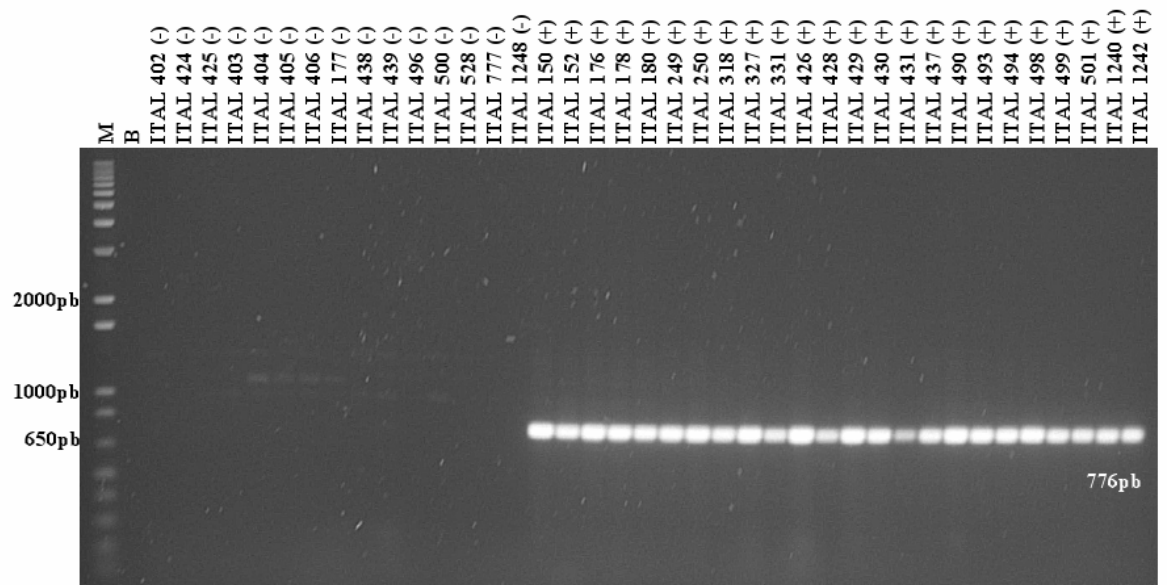


FIG. 3

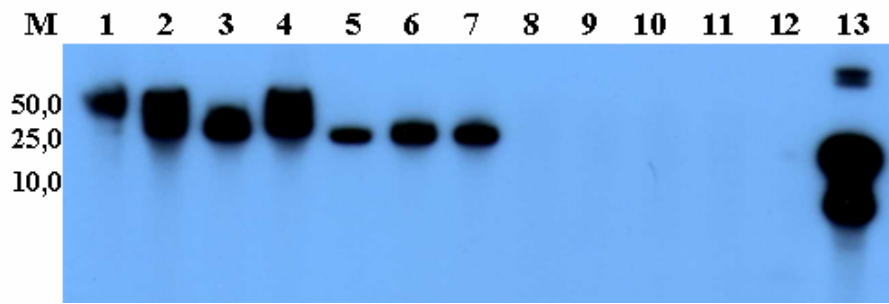


FIG. 4

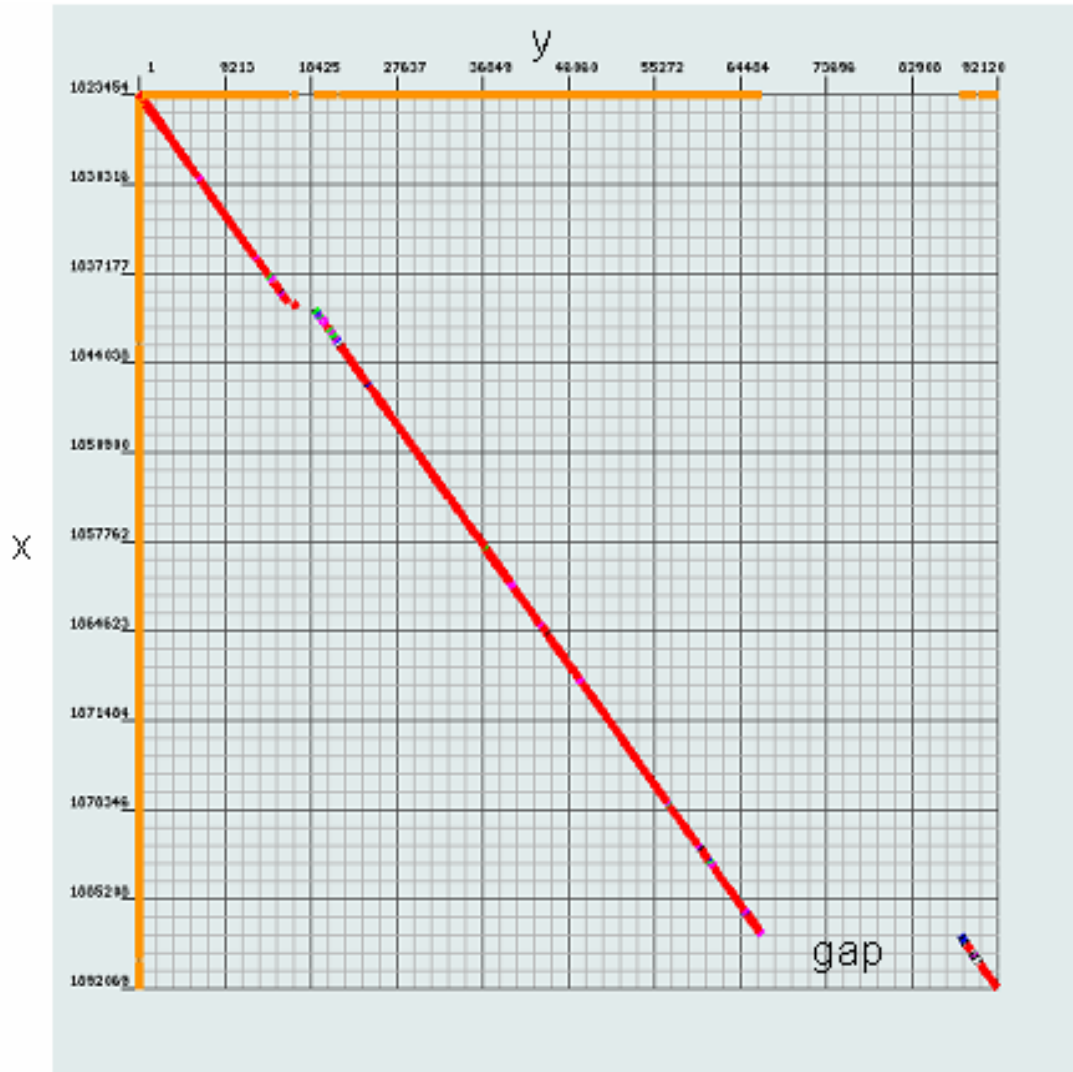


FIG. 5

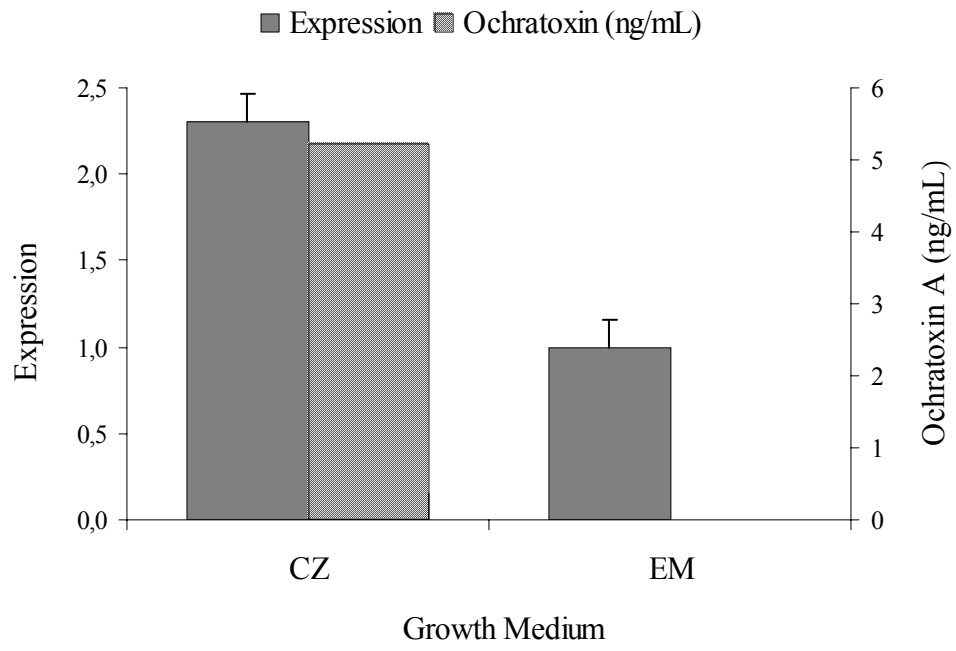


FIG. 6