



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JOSUÉ JOSÉ DA SILVA

**DIVERSIDADE E RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE  
*Aspergillus* SECTION *Nigri* ISOLADOS DE PRODUTOS  
AGRÍCOLAS**

---

Londrina  
2019



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agrônomo do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

JOSUÉ JOSÉ DA SILVA

**DIVERSIDADE E RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE  
*Aspergillus* SECTION *Nigri* ISOLADOS DE PRODUTOS  
AGRÍCOLAS**

Londrina  
2019

JOSUÉ JOSÉ DA SILVA

**DIVERSIDADE E RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE  
*Aspergillus* SECTION *Nigri* ISOLADOS DE PRODUTOS  
AGRÍCOLAS**

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

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

Londrina  
2019

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

da Silva, Josué José.

Diversidade e relações filogenéticas de *Aspergillus* section *Nigri* isolados de produtos agrícolas / Josué José da Silva. - Londrina, 2019.  
107 f. : il.

Orientador: Maria Helena Pelegrinelli Fungaro.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Diversidade genética - Tese. 2. *Aspergillus* - Tese. 3. Micotoxinas - Tese. 4. erva-mate - Tese. I. Pelegrinelli Fungaro, Maria Helena. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

JOSUÉ JOSÉ DA SILVA

**DIVERSIDADE E RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE *Aspergillus*  
SECTION *Nigri* ISOLADOS DE PRODUTOS AGRÍCOLAS**

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

**BANCA EXAMINADORA**



---

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

---

Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Carneiro Vieira  
Universidade de São Paulo – USP

---

Dr<sup>a</sup>. Chierlei Glienke  
Universidade Federal do Paraná – UFPR

---

Dr<sup>a</sup>. Elizabete Yurie Sataque Ono  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dr. Diego Gomes Ferreira  
Universidade Estadual do Norte do Paraná –  
UNEP

Londrina, 20 de fevereiro de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pelo acolhimento e oportunidade de crescimento profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À minha orientadora, professora Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro pelo oportuno apoio, pela orientação e aconselhamento, por sua amizade e pelo exemplo de caráter profissional, digno de toda a minha admiração.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da UEL e ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) de Campinas.

Aos doutores (as), Marta H. Taniwaki, Olivier Puel e Beatriz T. Iamanaka, pela cooperação científica, contribuições e auxílio nas análises laboratoriais.

Às minhas amigas do laboratório de Genética Molecular de Fungos, Fernanda Pelisson Massi, Rafaella Liviero e Luryan Fidelix Ortiz, pelo auxílio no trabalho, pelo convívio e amizade.

Aos meus familiares, em especial a minha mãe, Cida, por seu amor e compreensão de minhas decisões profissionais e pelo exemplo de honestidade, perseverança e resiliência. Às minhas irmãs, Kátia e Wuérica por me escutarem, aconselharem e por serem minhas companheiras por todo o caminho vida.

Aos meus amigos, Carine Nunes, Antônio Carlos, Thiago Prando, Gledson Faxina, Mateus Pasko e Carlos Henrique, por estarem sempre presentes, mesmo que distantes fisicamente, nos momentos alegres ou tristes, pela prova de que amizades verdadeiras não acabam com o tempo e nem com a distância.

A todos aquele que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

A Deus por tudo.

SILVA, Josué José. **Diversidade e relações filogenéticas de *Aspergillus* section *Nigri* isolados de produtos agrícolas**. 2019. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

*Aspergillus* section *Nigri* é um importante grupo de fungos que abriga espécies toxigênicas, fitopatogênicas, bem como, espécies de interesse biotecnológico. A presença de algumas espécies de *A. section Nigri* em alimentos é tida como sinal de alerta devido à possibilidade de contaminação com micotoxinas. Dessa forma, o conhecimento da diversidade de espécies de *A. section Nigri* em alimentos produzidos no Brasil é uma agenda estratégica nas esferas científica, econômica e sanitária. O objetivo deste estudo foi investigar a diversidade de *A. section Nigri* isolados de 5 produtos agrícolas produzidos no país (grãos de café, bagas de uvas, bulbos de cebola, erva-mate e castanha-do-brasil). Os resultados obtidos são apresentados na forma de dois artigos científicos. O primeiro artigo relata a diversidade de *Aspergillus* e a produção de ocratoxina A (OTA), fumonisina B<sub>2</sub> e aflatoxinas (séries B e G) de isolados de erva-mate (elaborada para chimarrão). A contaminação fúngica variou de 0,2 x 10<sup>3</sup> a 1,55 x 10<sup>4</sup> UFC/g, sendo que *A. section Nigri* foi o grupo taxonômico predominante constituindo cerca de 80% da incidência fúngica total. A análise molecular com base nos genes *CaM* ou *BenA* permitiu identificar 13 espécies de *Aspergillus*, sendo *A. luchuensis* a espécie predominante. Espécies potencialmente toxigênicas, tais como *A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. novoparasiticus* e *A. flavus* foram encontradas em baixa frequência, cerca de metade dos isolados analisados (47%) foram capazes de produzir alguma das micotoxinas (OTA, FB<sub>2</sub>, AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>), sendo as aflatoxinas do tipo B a classe de micotoxinas que apresentou o maior número de isolados produtores. A ocorrência de *A. pallidofulvus*, *A. europaeus* e *A. novoparasiticus* foi descrita pela primeira vez em ervas. O segundo artigo investigou a diversidade genética de linhagens do clado *A. niger*. Dois conjuntos de dados, um proveniente de isolados de produtos agrícolas (*n*= 403) e outro do *GenBank* (*n*= 292), foram analisados filogeneticamente com base no gene *CaM*. Os dois conjuntos de dados foram submetidos a análises de haplótipos, *Median-joining network*, máxima verossimilhança e de parâmetros descritivos tais como diversidade haplotípica e nucleotídica. Um total de 31 haplótipos foi identificado, 17 desses pertenciam indubitavelmente à espécie *A. welwitschiae*, 8 à espécie *A. niger* e os demais haplótipos não tiveram uma identificação conclusiva. Representantes dos haplótipos presentes no conjunto de dados brasileiro foram submetidos a análises morfológicas, fisiológicas, e filogenéticas com base em três *loci* (*BenA*, *CaM* e *RPB2*), conforme preconiza a taxonomia polifásica de *Aspergillus*. As análises filogenéticas foram fortalecidas pelo Reconhecimento de Espécie Filogenéticas por Concordância Genealógica (GCPSR) e pela análise de estruturação genética usando marcadores de RAPD. Com base no conceito de espécie pluralista, dentre 4 espécies filogenéticas reconhecidas, uma delas foi validada como uma nova espécie pertencente ao clado *A. niger*. Essa nova espécie será descrita como *Aspergillus paraniger*.

**Palavras-chave:** *Aspergillus niger*. *Aspergillus welwitschiae*. Diversidade genética. *Ilex paraguariensis*. Micotoxinas. Erva mate. Ocratoxina A. Fumonisinas. Aflatoxinas.

SILVA, Josué José. **Diversity and phylogenetic relationships of *Aspergillus* section *Nigri* isolated from agricultural products.** 2019. Thesis (Doctorate's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

*Aspergillus* section *Nigri* is an important group of fungi that includes toxigenic and phytopathogenic species as well as species of biotechnological interest. The presence of certain species of *A.* section *Nigri* in food indicates the possibility of contamination with mycotoxins. Thus, knowledge of the diversity of species of *A.* section *Nigri* found in foods produced in Brazil is of importance in the scientific, economic, and health sectors. This study aimed to investigate the diversity of *A.* section *Nigri* isolated from five agricultural products produced in Brazil. These included coffee beans, grapes, onion bulbs, yerba mate, and brazil nuts. The results obtained are presented in the form of two scientific papers. The first article reports the diversity of *Aspergillus* and the production of ochratoxin A (OTA), fumonisin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>), and aflatoxins (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) of yerba mate isolates (elaborated for *chimarrão*). Fungal contamination varied from  $0.2 \times 10^3$  to  $1.55 \times 10^4$  CFU/g, and *A.* section *Nigri* was the predominant taxonomic group, constituting approximately 80% of the total fungal load. Molecular analysis based on the *CaM* or *BenA* genes allowed the identification of 13 species of *Aspergillus*, with *A. luchuensis* being predominant. Potentially toxigenic species such as *A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. novoparasiticus*, and *A. flavus* were found at low concentrations. Approximately half (47%) of the isolates analyzed were able to produce a number of mycotoxins, including OTA, FB<sub>2</sub>, AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, and AFG<sub>2</sub>, with aflatoxins B being the class of mycotoxins that presented the largest number of producing isolates. The occurrence of *A. pallidofulvus*, *A. europaeus*, and *A. novoparasiticus* was described for the first time in herbs. The second article reports on the investigation of the genetic diversity of *A. niger* clade. Two datasets, one from agricultural isolates ( $n = 403$ ) and one from GenBank ( $n = 292$ ), were phylogenetically analyzed based on the *CaM* gene. The two datasets were subjected to haplotype analysis, median-joining network inference, maximum likelihood, and descriptive parameters such as haplotype and nucleotide diversity. A total of 31 haplotypes were identified, 17 of which undoubtedly belonged to the species *A. welwitschiae*, eight to *A. niger* species, and the remaining haplotypes did not have a conclusive identification. Representatives of the haplotypes present in the Brazilian dataset were subjected to morphological, physiological, and phylogenetic analyses based on three loci (*BenA*, *CaM*, and *RPB2*), as suggested by the polyphasic taxonomy of *Aspergillus*. Phylogenetic analyses were conducted by Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition and genetic structure analysis using RAPD markers. Based on the concept of pluralistic species, among the four recognized phylogenetic species, one was validated as being novel and belonging to the *A. niger* clade. This new species will be described as *Aspergillus paraniger*.

**Keywords:** *Aspergillus niger*. *Aspergillus welwitschiae*. Genetic diversity. *Ilex paraguariensis*. Mycotoxins. Yerba mate. Ochratoxin A. Fumonisin A. Aflatoxins.

## LISTA DE TABELAS

### Artigo Científico I

<b>Table 1.</b> - Mycotoxins produced by the <i>Aspergillus</i> strains isolated from yerba mate (number of positive strains/total number of tested strains). .....	53
--	----

### Artigo Científico II

<b>Table 1</b> - PCR conditions for <i>CaM</i> , <i>BenA</i> and <i>RPB2 loci</i> .....	66
<b>Table 2</b> - Morphological characteristics of the phylogenetic species (PS) found in the <i>A. niger</i> clade. ....	80
<b>Supplementary Table 1</b> - Listing of the strains and distribution of haplotypes found in this study. (Available in <a href="https://goo.gl/LPSzee">https://goo.gl/LPSzee</a> ).....	88

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão Bibliográfica

- Figura 1** – Árvore filogenética de máxima verossimilhança com base em sequências de nucleotídeos do gene *CaM* das 27 espécies de *Aspergillus* section *Nigri* reconhecidas pelo *International Commission of Penicillium and Aspergillus*. T sobrescrito=*type strain*. ..... 21
- Figura 2** – Compêndio gráfico dos alimentos contaminados com ocratoxina A (linhas azuis) e fumonisinas (linhas amarelas) em associação com a ocorrência de ao menos uma das quatro espécies toxigênicas de *Aspergillus* section *Nigri*: *A. sclerotium*, *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. welwitschiae* (representadas pela placa de Petri no centro). A ilustração reflete os resultados dos trabalhos listados em: <https://goo.gl/68V5mo>..... 25
- Figura 3** – Diagrama ilustrando os principais passos na filogenia com base no reconhecimento de espécies por concordância genealógica (GCPSR). ..... 39

### Artigo Científico I

- Fig. 1** - Fungal contamination in yerba mate samples. **A)** Colony forming units (CFU/g) per sample (IP1-A to IP15-B) and occurrence (in %) of *Aspergillus* and other fungal genera per sample. **B)** Distribution of *Aspergillus* section in the total of isolated fungi (in %). ..... 46
- Fig. 2** - Maximum Likelihood tree based on the *CaM* gene showing the relationships between *Aspergillus* section *Nigri* species and isolates of yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Aspergillus flavus* is the outgroup. T superscript = type strain. Isolates from this study are in bold type. .... 49
- Fig. 3** - Maximum Likelihood tree based on the *BenA* gene, showing the relationships between *A.* section *Flavi*, *A.* section *Circumdati* and *A.* section *Cremeri* species and isolates of yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Fusarium lateritium* is the outgroup. T superscript = type strain. Isolates from this study are in bold type. .... 51

## Artigo Científico II

- Fig. 1** - Alignment of partial *RPB2* gene sequences of *A. niger* aggregate. The boxes marked by arrows indicate the annealing site of the ANRP primer pair. \* ANRP1-F or ANRP2-R designed in this study. .... 68
- Fig. 2** - A) Maximum Likelihood tree of *A. section Nigri* biseriata species and *CaM* haplotypes of *A. niger* clade species, branches condensed at 70% bootstrap values. B) Median-joining network of *CaM* haplotypes of *A. niger* clade species, node size by taxa frequency. .... 73
- Fig. 3** - Maximum parsimony cladogram of *A. niger* clade species using three-*locus* (*CaM*, *BenA*, and *RPB2*) phylogenies. The branches in bold indicate that these clades were considered independent evolutionary lineages. The triangles at the nodes indicate phylogenetic species based on the ranking of groups (Dettman et al., 2003). Bootstrap values (BS) and/or posterior probabilities values (pp) higher than 70% and 0.70, respectively, are shown. *A. carbonarius* is the outgroup. .... 75
- Fig. 4** - Cluster analysis based on RAPD markers. PS 2= Phylogenetic species 2, PS3= Phylogenetic species 3. Each colour corresponds to a genetic group ( $K=4$ ). A) UPGMA dendrogram obtained using Dice similarity coefficient using *A. carbonarius* strains as the outgroup. B) Bayesian analysis (Structure barplot). C) RAPD profile representative, OPAM 07 primer. (D) Pairwise  $\phi_{st}$  index. .... 77
- Fig. 5** - Macro and micromorphological characteristics of strains representing the phylogenetic species recognized by GCPSR in *Aspergillus niger* clade. *A. welwitschiae* PS1 (H3, H8, H25, H27), Phylogenetic species 2 (H21), Phylogenetic species 3 (H30) and *A. niger* PS4 (H14 and H15). Scale bars conidia, 5  $\mu\text{m}$ ; Scale bars conidiophore, 50  $\mu\text{m}$ . .... 81

- Supplementary Fig. 1** - Maximum parsimony tree (MR 50%) of *A. niger* clade species using the loci *CaM*, *BenA*, and *RPB2*. Genealogical Concordance criterion: The lineages that occur in most of the single loci are highlighted in coloured boxes, and these lineages were identified as independent evolutionary lineages. Bootstrap values (BS) and/or posterior probabilities values (pp) higher than 70% and 0.70, respectively, are shown. *A. carbonarius* is the outgroup. .... 89
- Supplementary Fig. 2** - Maximum parsimony tree (semi-strict consensus) of *A. niger* clade species using three-locus (*CaM*, *BenA*, and *RPB2*) phylogenies. Genealogical non-discordance criterion: The lineages that were well supported by at least one locus but not contradicted by any other locus are identified as independent evolutionary lineages (coloured boxes). Bootstrap values (BS) and/or posterior probabilities values (pp) higher than 70% and 0.70, respectively, are shown. *A. carbonarius* is the outgroup. .... 90

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1 <i>Erva-mate: aspectos gerais</i> .....	16
2.2 <i>Aspergillus section Nigri: produção de micotoxinas e taxonomia</i> .....	18
2.3. <i>Aspergillus section Nigri em produtos agrícolas</i> .....	26
2.3.1 <i>Grãos de Café</i> .....	26
2.3.2 <i>Uvas</i> .....	29
2.3.3 <i>Castanha-do-brasil</i> .....	31
2.3.4 <i>Cebolas</i> .....	33
2.3.5 <i>Erva-mate</i> .....	34
2.4 <i>Fronteiras na delimitação de espécies fúngicas</i> .....	35
2.4.1 <i>Taxonomia polifásica e Reconhecimento de Espécies Filogenéticas por Concordância Genealógica (GCPSR)</i> .....	35
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	39
3.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	39
3.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	39
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
4.1 <i>Occurrence and diversity of Aspergillus in commercial yerba mate elaborated for the Brazilian beverage 'chimarrão'</i> .....	40
4.2 <i>Phylogenetic species delimitation unravels a new species in Aspergillus section Nigri: Aspergillus paraniger sp. nov.</i> .....	61
<b>5 CONCLUSÕES FINAIS</b> .....	89
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	90

## 1 INTRODUÇÃO

Os *Aspergillus* negros estão entre os grupos fúngicos mais importantes do gênero *Aspergillus*. Eles incluem espécies que causam doenças em plantas, deterioração de alimentos, produção de micotoxinas, e frequentemente estão associados a doenças humanas. Por outro lado, este grupo fúngico inclui algumas das espécies mais importantes industrialmente. A título de exemplo, *A. niger* é usado industrialmente para a produção de várias enzimas hidrolíticas e ácidos orgânicos, incluindo 99% do ácido cítrico produzido no mundo. Taxonomicamente, os *Aspergillus* negros são classificados como *Aspergillus* subgênero *Circumdati* seção *Nigri*. Atualmente, a realização de análises de sequências de DNA é obrigatória para o estabelecimento do status taxonômico desta seção, pois as abordagens morfológicas tradicionais não bastam para a identificação de todas as espécies da referida seção. As principais dificuldades estão relacionadas à identificação das espécies crípticas, ou seja, morfologicamente semelhantes ou idênticas.

A região ITS do DNA ribossomal, proposta como *barcode* oficial para fungos, é muito conservada e não discrimina todas as espécies de *A. section Nigri*, portanto, marcadores alternativos, tais como as sequências de nucleotídeos dos genes que codificam a calmodulina (*CaM*) ou beta-tubulina (*BenA*), têm sido recomendados para a identificação das espécies. Até o momento, sob a luz da taxonomia polifásica, 27 espécies são reconhecidas na seção *Nigri*, as quais se distribuem em sete clados: *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus* e *A. aculeatus*. As espécies *A. costaricensis*, *A. luchuensis*, *A. neoniger*, *A. piperis*, *A. tubingensis*, *A. eucalypticola* e *A. vadensis* (clado *A. tubingensis*), *A. niger* e *A. welwitschiae* (clado *A. niger*) e *A. brasiliensis* (clado *A. brasiliensis*) são morfologicamente muito similares, e em conjunto são denominadas de agregado *A. niger*. As espécies atribuídas ao agregado *A. niger* se sobrepõem em suas características morfológicas e fisiológicas, mas a filogenia baseada em dados de sequências de nucleotídeos do gene *CaM* permite, na maioria dos casos, a correta identificação.

Algumas espécies pertencentes a *A. section Nigri* são produtoras de fumonisina B<sub>2</sub> e ocratoxina A, ambas classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) como possivelmente carcinogênicas para humanos. A ocorrência destes fungos em alimentos de elevado consumo *per capita* traz riscos à saúde pública, além disso, a contaminação por micotoxinas frequentemente gera grandes prejuízos econômicos por conta dos embargos internacionais. Algumas espécies potencialmente toxigênicas de *Aspergillus* têm sido

reportadas como altamente incidente em produtos agrícolas, fato que suscita preocupação visto que o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de alimentos do mundo. Diante disso, por mais de uma década, o grupo de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (UEL) em parceria com o grupo de pesquisa do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), tem dedicado esforços em analisar a microbiota de diversos alimentos (grãos de café, castanha-do-brasil, uvas, cebolas, milho, amendoim, dentre outras), com ênfase aos grupos de *Aspergillus* produtores de micotoxinas. Dentro deste contexto, a microbiota de erva-mate produzida no Brasil ainda não foi estudada e perfaz um dos objetivos de pesquisa desta tese.

Dentre o grande número de isolados fúngicos acumulados na coleção do grupo de trabalho UEL/ITAL, no decorrer desses anos, as espécies pertencentes ao clado *A. niger* foram predominantes. A grande maioria dos isolados fúngicos foi identificada como *A. niger* ou *A. welwitschiae*, no entanto, a identidade de alguns isolados permaneceu ambígua, demonstrando a necessidade de realização de estudos adicionais, os quais se configuraram como o segundo objetivo desta pesquisa. A diversidade molecular e as relações filogenéticas de aproximadamente 700 acessos pertencentes ao clado *A. niger* foram investigadas para determinar se este clado abriga espécies ainda não descritas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Erva-mate: aspectos gerais

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é uma árvore perene, de pequeno porte, pertencente à família Aquifoleaceae, cuja área de ocorrência natural abrange Brasil, Paraguai e Argentina, sendo que o bioma brasileiro Mata Atlântica concentra mais de 80% do total desta árvore (ALEGRE; VILCAHUAMÁN; CORRÊA, 2007).

No Brasil, a erva-mate é o principal produto florestal não madeireiro, tendo sido produzidas, em 2016, cerca de 350 mil toneladas dessa erva (SNIF, 2018). A produção comercial dessa erva é proveniente de ervais cultivados ou nativos (extrativismo), sendo que o estado do Paraná responde por cerca de 70% da produção de erva nativa e 40% da produção nacional de erva cultivada. Os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina produzem, respectivamente, 6% e 20% da erva-mate nativa e 50% e 10% da erva-mate cultivada (SEAB, 2018).

A maior parte da produção nacional é destinada ao consumo na forma de uma bebida típica chamada “chimarrão” que resulta da infusão da erva-mate. Há também outras formas de

preparo como o “tereré” que é a mistura da erva macerada com água gelada, sendo esta a principal forma consumida na região centro-oeste do Brasil, ou ainda, na forma de chá-mate, produzida pela infusão da erva torrada (GUGLIUCCI, 1996). Em regiões onde o consumo do chimarrão está associado ao contexto sociocultural (e.g. os pampas) a média de consumo diário *per capita* é de 1,265 L, podendo chegar até a 6 L (BARROS et al., 2000).

O consumo de erva-mate tem sido apontado como benéfico para a saúde por vários autores (BOAVENTURA et al., 2012; GAMBERO; RIBEIRO, 2015; KLEIN et al., 2011; MORAIS et al., 2009). Na última década, uma série de trabalhos científicos tem explanado sobre as propriedades terapêuticas da erva-mate que incluem: atividade antioxidante (BIXBY et al., 2005; FERNANDES et al., 2012), antimutagênica (MIRANDA et al., 2008), anti-inflamatória (ARCARI et al., 2011; CARMO et al., 2013) e anorexígena (BORGES et al., 2013; PIMENTEL et al., 2013). Por outro lado, alguns estudos têm indicado a associação do consumo de erva-mate (na forma de chimarrão) ao câncer orofaríngeo e esofágico em humanos (DASANAYAKE; SILVERMAN; WARNAKULASURIYA, 2010). Em seu trabalho, Sewram et al. (2003) analisaram 334 casos clínicos de câncer esofágico em populações da Argentina, Brasil e Uruguai e verificaram que tanto o volume do chimarrão ingerido quanto a temperatura em que é servido podem aumentar o risco de câncer esofágico em até quatro vezes.

Outro aspecto que a literatura tem discutido é a contaminação da erva-mate com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP's) (PLAZA-BOLAÑOS; FRENICH; VIDAL, 2010; ZIEGENHALS; JIRA; SPEER, 2008). Estes compostos são considerados cancerígenos e resultam de processos de combustão incompleta da matéria orgânica, que pode ocorrer nas etapas de secagem e sapeco (GARCIA- LONDONO; REYNOSO; RESNIK, 2014).

O processamento da erva-mate envolve várias etapas, incluindo o emprego de altas temperaturas. Após as etapas de secagem, a erva passa por um estágio de maturação do sabor (estocagem para envelhecimento), que pode durar de dois meses a mais de um ano (HECK; MEIJA, 2007). Notoriamente, este estágio pode fornecer condições adequadas para a proliferação de fungos filamentosos, e a presença desses fungos pode alterar as características organolépticas da bebida, levando à desvalorização comercial. Ademais, algumas espécies de fungos são dotadas da capacidade de produzir toxinas via metabolismo secundário (MARIN et al., 2013).

Os *Aspergillus negros* (*Aspergillus* section *Nigri*) são fungos de armazenamento e deteriorantes de alimentos. Muitos trabalhos têm relatado a presença desse grupo fúngico como predominante em ervas e preparações para chás (FARDOS; MAGDA, 2013; KOSALEC; CVEK; TOMIC, 2009; MOGENSEN et al., 2009; REZACOVA; KUBATOVA, 2005),

contudo, a investigação da microbiota e a identificação de espécies toxigênicas em erva-mate comercial ainda é muito escassa (BUGNO et al., 2006; CASTRILLO et al., 2013; VIEIRA et al., 2010).

A presença de *Aspergillus negros* em produtos destinados à alimentação humana denota preocupação, uma vez que, algumas espécies desse grupo de fungos são produtoras de ocratoxinas e fumonisinas, que são classes de micotoxinas de relevância para a saúde pública (WU et al., 2014). Fumonisinás têm sido associadas ao câncer esofágico em humanos (QIU et al., 2001), e o consumo de erva-mate (na forma de chimarrão) também tem sido associado a este tipo de câncer (CASTELLSAGUÉ et al., 2000). Vários estudos têm investigado a presença de micotoxinas em ervas e preparações para chás (EL-ATY et al., 2014; HAAS et al., 2013; MONBALIU et al., 2010; TOMAN et al., 2017), porém, até o momento investigações sobre a presença dessas micotoxinas em erva-mate não foram realizadas. Em um estudo conduzido por Santos et al. (2009), foram analisadas 84 ervas medicinais e aromáticas quanto à presença de micotoxinas, os autores demonstraram que 13% das amostras estavam contaminadas com fumonisinas e 63% estavam contaminadas com ocratoxina A. O referido trabalho ainda revelou outro dado alarmante, quase 90% das amostras estavam contaminadas por quatro ou mais micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, fumonisinas, citrina e deoxinivalenol). Martins et al. (2001) analisaram 18 amostras de chá preto e 69 amostras de outras ervas medicinais coletadas em mercados de Lisboa, 65,5% das amostras mostraram-se contaminadas com fumonisinas (FB<sub>1</sub>).

Considerando o alto consumo *per capita* de erva-mate em algumas regiões do Brasil e o perigo inerente da presença de *Aspergillus negros* nesse alimento, investigações que venham suprir a escassez de informações sobre a presença de espécies toxigênicas na erva-mate são necessárias, a fim de garantir a qualidade desse produto.

## 2.2 *Aspergillus section Nigri: produção de micotoxinas e taxonomia*

As características morfológicas foram a base primária para o estabelecimento da taxonomia do gênero *Aspergillus*, *e.g.*, a coloração das colônias é tradicionalmente utilizada como característica para diferenciação dos estratos taxonômicos superiores de *Aspergillus*, podendo apresentar coloração em tons de verde, amarelo, marrom, preto e cinza, dependendo da seção (KLICH, 2002). Pautados nas formas, coloração, textura, exudatos e padrões de crescimento, os taxonomistas estabeleceram as bases do gênero, que mais tarde foram

melhoradas e ampliadas pela abordagem polifásica (GEISER et al., 2007; SAMSON et al., 2014).

O gênero *Aspergillus* foi inicialmente caracterizado como fungos com reprodução assexuada, entretanto, algumas espécies deste gênero, são capazes de se reproduzir sexuadamente através do desenvolvimento de cleistotécios contendo ascósporos meióticos agrupados dentro de ascos (KOZAKIEWICZ, 1989).

Embora possuam ampla distribuição mundial, os *Aspergillus* são mais comumente encontrados em ambientes de altas temperaturas e baixa atividade de água (aw). Os valores de temperatura e pH ótimos para o crescimento das diferentes espécies de *Aspergillus* podem variar amplamente, de 20 °C à 30 °C e pH de 4,0 a 7,0. Estas largas faixas de adaptabilidade permitem a estes fungos a colonização de inúmeros substratos (ALEXOPOULOS et al., 1996; PITT; HOCKING, 2009).

Até o ano de 2000 haviam sido descritas 182 espécies de *Aspergillus* (PITT et al., 2000). Desde então, centenas de novas espécies foram descritas, elevando o número total das espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* para aproximadamente 380 (<https://www.aspergilluspenicillium.org/>). As espécies de *Aspergillus* reconhecidas até o momento estão organizadas em quatro subgêneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes*), e em 26 seções (*Aenei*, *Aspergillus*, *Bispori*, *Candidi*, *Cavernicolous*, *Cervini*, *Circumdati*, *Clavati*, *Cremeri*, *Flavi*, *Flavipedes*, *Fumigati*, *Jani*, *Nidulantes*, *Nigri*, *Ochraceorosei*, *Petersonii*, *Polypaecillum*, *Raperi*, *Restricti*, *Robusti*, *Silvatici*, *Sparsi*, *Tanneri*, *Terrei* e *Usti*) (<https://www.aspergilluspenicillium.org/>).

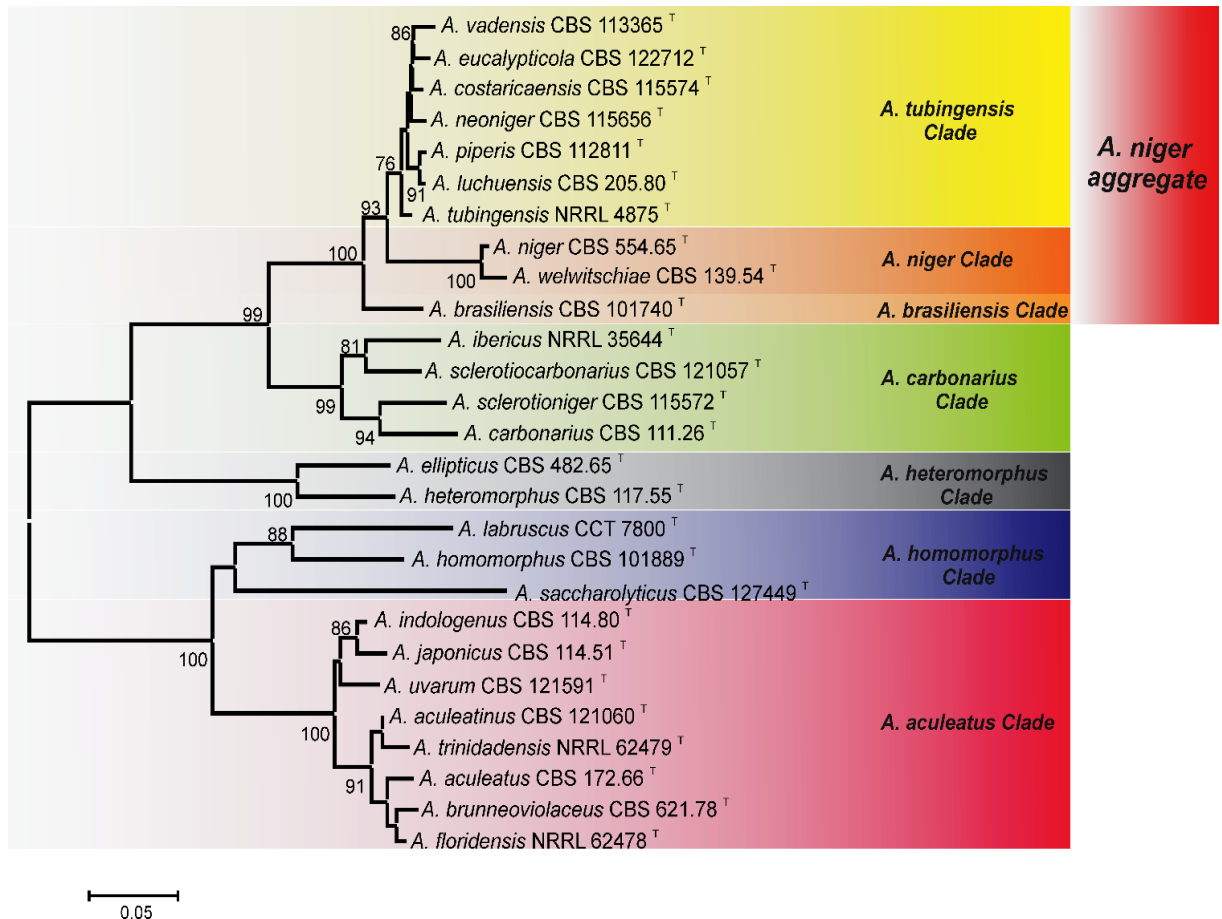
*Aspergillus* subgenus *Circumdati* section *Nigri*, também denominados de *Aspergillus* negros, são fungos amplamente distribuídos por todo o mundo, deteriorantes de alimentos, candidatos à exploração biotecnológica e, em alguns casos, fitopatógenos. Segundo Perrone et al. (2008), a principal fonte deste grupo fúngico é o solo, entretanto, eles infectam ou colonizam uma série de produtos destinados à alimentação: uvas (CHIOTTA et al., 2013; FERRANTI et al., 2018; PALUMBO et al., 2015); grãos de café (MOSLEM et al., 2010; REZENDE et al., 2013); cebolas (GHERBAWY et al., 2015); amendoins (BARBERIS et al., 2012; PALENCIA et al., 2014); trigo (JEDIDI et al., 2017); frutas secas (CHULZE et al., 2006); nozes (LAMBONI et al., 2016; MARIN et al., 2008; TANIWAKI et al., 2017); milho (LOGRIECO et al., 2014; SUSCA et al., 2014b); cevada (MATEO et al., 2011); cacau (SANCHEZ-HERVAS et al., 2008); quinoa (PAPPIER et al., 2008); suplementos dietéticos (TOURNAS et al., 2013); soja (HONG et al., 2015), ervas (CASTRILLO et al., 2013).

*Aspergillus* section *Nigri* apresentam colônias aveludadas e conídios com coloração variando de marrom-escura a negro (KLICH, 2002). Outras características, tais como ornamentação dos conídios, tamanho do conidióforo, produção de esclerócios, conidióforos uni ou bisseriados, forma da vesícula e textura da estipe podem variar de acordo com a espécie (ABARCA et al., 2004; VARGA et al., 2011). A taxonomia tradicional que identifica as espécies utilizando apenas características morfológicas, micro e macroscópicas, se depara com muitas restrições em função do pequeno número de informações para caracterizar as semelhanças e diferenças. Nas últimas décadas, a taxonomia de *A. section Nigri* tem sofrido modificações constantes em função de novas informações geradas por análises filogenéticas (SAMSON et al., 2014; VARGA et al., 2011).

Dentre os vários procedimentos que permitem as análises genéticas, o “*DNA barcode*” é, um dos mais usados na identificação taxonômica. O “*DNA barcode*” consiste em pequenas sequências de DNA que se caracterizam por serem suficientemente variáveis entre espécies e conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie (SCHOCH et al., 2012). Os espaçadores internos transcritos (ITS-1 e ITS-2) da região do DNA ribossomal foram escolhidos como *barcode* primário de fungos filamentosos (SCHOCH et al., 2012). No entanto, dada à alta complexidade taxonômica de *A. section Nigri*, o uso do *barcode* (regiões ITS) não tem sido suficiente para discriminar as espécies dessa seção, logo, uma porção do gene que codifica a calmodulina (gene *CaM*) foi proposta como o marcador mais eficiente para a identificação das espécies da referida seção (SAMSON et al., 2014).

Atualmente, *A. section Nigri* compreende 27 espécies, as quais, com base em sequências do gene *CaM*, são distribuídas em 7 clados (Fig. 1).

**Figura 1** – Árvore filogenética de máxima verossimilhança com base em seqüências de nucleotídeos do gene *CaM* das 27 espécies de *Aspergillus* section *Nigri* reconhecidas pelo International Commission of *Penicillium* and *Aspergillus*. T sobrescrito=type strain.



Fonte: próprio autor.

No decorrer de um estudo de caracterização molecular de isolados do agregado *A. niger* coletados de uvas na Europa, Perrone et al. (2011) identificaram taxóons, via marcadores de AFLP, que formavam um cluster separado de *A. niger*. Este cluster incluía a linhagem neótipo de uma espécie antigamente denominada *A. awamori* (ITEM 4509 = CBS 557.65) que, a partir de 2004, passou a ser considerada sinônima de *A. niger* (SAMSON et al., 2004). Pautados em uma análise multilocus e no reconhecimento de espécies filogenéticas por concordância genealógica, Perrone et al. (2011) propuseram esse grupo como uma nova espécie filogenética dentro do clado *A. niger*, e esse grupo passou a ser chamado de *A. awamori sensu* Perrone. Mais tarde, Hong et al. (2013) analisaram as linhagens utilizadas para fermentação na indústria de bebidas no Leste Asiático, e com base na taxonomia polifásica, evidenciaram que as linhagens utilizadas na indústria não pertenciam a *A. awamori sensu* Perrone, mas sim a *A. luchuensis* e

*A. niger sensu stricto*, e que por sua vez as linhagens de *A. awamori sensu Perrone* eram idênticas à linhagem epitipo de *A. welwitschiae*, coletada de *Welwitschia mirabilis*, uma planta altamente resistente à seca, encontrada no Deserto da Namíbia. Sendo assim, *A. awamori sensu Perrone* foi renomeada para *A. welwitschiae* e passou a ser reconhecida como uma espécie plena em *A. section Nigri* (SAMSON et al., 2014).

Conforme historiado em Duarte et al. (2018), *A. welwitschiae* foi coletado pela primeira vez no final do século XIX por F. Moller, identificado por Bresadola, e teve a descrição original publicada como *Ustilago welwitschiae* Bres., n. sp. por Saccardo (1883). Após as recomendações de Hong et al. (2013) de como diferenciar *A. welwitschiae* de *A. niger* pautados em sequências de nucleotídeos, a ocorrência desta espécie passou a ser reportada em vários substratos e regiões do mundo (DUARTE et al., 2018; GHERBAWY et al., 2015; HANIF et al., 2016; LAMBONI et al., 2016; MASSI et al., 2016; SUSCA et al., 2016). Em função do desmembramento dessas espécies, o agente causal de algumas doenças de plantas tem sido revisado de *A. niger* para *A. welwitschiae*. A título de exemplo, Duarte et al. (2018) fazendo uso de análises de sequências de nucleotídeos, inequivocamente demonstraram que *A. welwitschiae* (e não *A. niger*) é o agente causal da podridão-do-tronco-do-sisal.

Ainda na última década, também se destacam como mudanças na taxonomia dessa seção os eventos de sinonimização: *A. luchuensis* (*syn. A. acidus*, *A. kawachii* e *A. coreanus*) (HONG et al., 2013); *A. brunneoviolaceus* (*syn. A. finjiensis*) (JURJEVIC et al., 2012); e a introdução de novas espécies: *A. uvarum* (PERRONE et al., 2008), *A. aculeatinus* e *A. sclerotiocarbonarius* (NOONIM et al., 2008), *A. eucalypticola* e *A. neoniger* (VARGA et al., 2011), *A. sacharolitycus* (SORENSEN et al., 2011), *A. trinidadensis* e *A. floridensis* (JURJEVIC et al., 2012) e *A. labruscus* (FUNGARO et al., 2017).

Conforme se apresenta na Figura 1, o agregado *A. niger* representa um subgrupo taxonômico informal constituído de 10 taxóns (*A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. tubingensis*, *A. luchuensis*, *A. piperis*, *A. costaricaensis*, *A. neoniger*, *A. eucaliptycola*, *A. vadensis* e *A. brasiliensis*). São espécies bisseriadas da seção *Nigri*, morfologicamente muito semelhantes, ou em alguns casos indistinguíveis, das quais *A. luchuensis* e *A. niger* se destacam pela importância biotecnológica.

*A. luchuensis* (*syn. A. acidus*, *A. coreanus* e *A. kawachii*) é largamente utilizado na fermentação de bebidas alcólicas no oriente (*awamori*, *shochu* e *makgeolli*); esta espécie é utilizada na produção do *koji*, um tipo de fermento natural que fornece as enzimas e as condições de pH ideais para fermentação e inibição de micro-organismos selvagens. Até o

momento não há relatos de produção de toxinas nocivas à saúde humana por esse fungo (HONG et al., 2013).

A espécie *A. niger* é de longe a de maior importância econômica entre todos os *Aspergillus* negros, é amplamente utilizada na produção de enzimas e ácidos orgânicos (ác. cítrico e ác. glucônico) (ABARCA et al., 2004), os quais são utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e química. Em condições controladas a utilização de *A. niger* para produção de ácido cítrico, celulasas e carboidrases obteve o *status* GRAS (*Generally Recognized as safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) (FDA, 2018).

Paradoxalmente, *A. niger* também é reconhecidamente uma espécie produtora de ocratoxina A e/ou fumonisinas B<sub>2</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>6</sub> (ABARCA et al., 1994; FRISVAD et al., 2007; FRISVAD et al., 2011; MANSSON et al., 2010), contudo, a capacidade de produção dessas toxinas é variável dentro da espécie, isto é, alguns isolados são produtores e outros não.

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina que foi isolada pela primeira vez em 1965 a partir do metabolismo de *Aspergillus ochraceus* (VAN DE MERWE et al., 1965). Durante esses 50 anos subsequentes, a habilidade de produção dessa toxina foi relatada para várias outras espécies de *Aspergillus*. Dentre os fungos da seção *Nigri*, *A. carbonarius*, *A. sclerotium*, *A. welwitschiae* e *A. niger* (ABARCA et al., 1994; ABARCA et al., 2003; PERRONE et al., 2007) são as espécies consideradas capazes de produzirem essa toxina. Na seção *Flavi*, as espécies *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus lanosus*, *A. neoalliaceus* e *A. vandermerwei* são reportadas como produtoras de OTA (FRISVAD et al., 2019; VARGA et al., 2011; VARGA et al., 2015). Entre as 27 espécies pertencentes a *A. section Circumdati*, 12 produzem grandes quantidades de OTA: *A. affinis*, *A. cretensis*, *A. fresenii*, *A. muricatus*, *A. occultus*, *A. ochraceopetaliformis*, *A. ochraceus*, *A. pseudoelegans*, *A. pulvericola*, *A. roseoglobulosus*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae*, estas espécies já foram relatadas em amostras de solo e ar, folhas em decomposição, frutas cítricas, feijões, pimentas, uvas, cacau, insetos, grãos de café, algodão, sorgo, sementes de trigo e poeira domiciliar (COPETTI et al., 2010; DAVOLOS et al., 2012; GARCIA et al., 2018; PETERSON et al., 2008; REVERBERI et al., 2010; SANTOS-CISCON et al., 2019; SCHMIDT et al., 2004; VISAGIE et al., 2014). Outras oito espécies produzem OTA de modo inconsistente e/ou em quantidades vestigiais: *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. persii*, *A. salwaensis*, *A. sclerotiorum*, *A. sesamicola*, *A. subramanianii* e *A. westlandensis*, estas espécies têm sido reportadas em amostras de solo e ar, amendoim, ervilhas, gergelim, grãos de café e fontes clínicas (FÁTIMA REZENDE et al., 2013; NOONIM et al., 2008; PETERSON et al., 2008; VISAGIE et al., 2014; ZOTTI et al., 2015).

As ocratoxinas são pentacetídeos cíclicos derivados das di-hidrocoumarinas ligados a  $\beta$ -fenilalanina. Há três tipos de ocratoxinas – A, B e C – mas a ocratoxina A (OTA) é a mais toxigênica e a mais comumente encontrada em alimentos. Como revisto por Taniwaki et al. (2015), cerca de 60%, dentre 6.500 amostras de alimentos examinados na Europa continham quantidades de OTA acima do limite de detecção 0,01  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

A OTA possui atividade nefrotóxica, teratogênica, imunossupressora e hepatotóxica (MARROQUIN-CARDONA et al., 2014). Essa micotoxina foi associada à nefropatia dos Balcãs, à nefropatia crônica intersticial da Tunísia e à nefropatia porcina (VARGA et al., 2015; MARIN et al., 2013). A agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) classificou a OTA no grupo 2B, ou seja, como possível carcinógeno humano (IARC, 1993) pautada em ensaios com animais.

Fumonisinias foram originalmente descritas como produtos do metabolismo secundário de *Fusarium verticillioides* (GELDERBLUM et al., 1988), posteriormente, outras espécies de *Fusarium* foram descritas como produtoras dessa classe de micotoxinas (LESLIE et al., 2007). Foram caracterizados 28 análogos químicos que são separados em quatro séries: A, B, C e P, dentre essas, as toxinas da série B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub> e B<sub>6</sub>) são as mais estudadas, já que se caracterizam como as mais importantes toxicologicamente (MARIN et al., 2013; PROCTOR et al., 2006).

Conforme a revisão de Marroquín-Cardona et al. (2014), as fumonisinias possuem comprovada capacidade de ocasionar leucoencefalomalácia (LEME) e hepatotoxicidade em equinos, edema pulmonar e perda de peso em suínos, problemas cardíacos, hepatomegalia e imunodepressão em aves e, mais recentemente, têm sido apontadas como possível fator de risco para danos no túbulo neural (DTN) em ratos e humanos. Além disso, é importante ressaltar que RHEEDER et al. (1992) estabeleceram associação da ingestão de alimentos contaminados com fumonisinias e o aumento da taxa de câncer esofágico em um povoado da África do Sul. Desde então, outros estudos têm corroborado estes achados (ALIZADEH et al., 2012; PERSSON et al., 2012; SOLFRIZZO et al., 2004). A IARC (IARC, 2002) classificou as fumonisinias B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> como possivelmente carcinogênicas para humanos (grupo 2B).

Dentro do gênero *Aspergillus* somente *A. niger* e *A. welwitschiae* são capazes de produzir fumonisinias e apenas algumas isoformas (FB<sub>2</sub>, FB<sub>4</sub> e FB<sub>6</sub>), além disso; a capacidade de produção é altamente variável dentro destas espécies, fato que tem sido imputado, parcialmente, a deleções no cluster gênico envolvido na biossíntese dessa toxina (MASSI et al., 2016; SUSCA et al., 2014).

A alta incidência de espécies toxigênicas de *A. section Nigri* em alimentos é preocupante, contudo, nem sempre a ocorrência dessas espécies está associada à contaminação com micotoxinas. A Fig. 2 sumariza a ocorrência de espécies toxigênicas de *Aspergillus* negros em alimentos em concomitância à contaminação com OTA e/ou fumonisinas, isto é, trata-se de uma compilação gráfica dos estudos que encontraram associação entre a ocorrência de espécies toxigênicas de *A. section Nigri* em alimentos e a contaminação com as referidas micotoxinas.

**Fig. 2-** Compêndio gráfico dos alimentos contaminados como ocratoxina A (linhas azuis) e fumonisinas (linhas amarelas) em associação com a ocorrência de ao menos uma das quatro espécies toxigênicas de *Aspergillus section Nigri*: *A. sclerotioniger*, *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. welwitschiae* (representadas pela placa de Petri no centro). A ilustração reflete os resultados dos trabalhos listados em: <https://goo.gl/68V5mo>.



Fonte: Construção do autor feita com imagens da internet -(Copyleft).

### 2.3. *Aspergillus section Nigri* em produtos agrícolas

Após a descoberta de que algumas espécies pertencentes à seção *Nigri* possuem habilidade para a produção de OTA, a ocorrência desses fungos em produtos destinados à alimentação humana passou a ser objeto de estudo de vários grupos de pesquisa de Instituições brasileiras. Inicialmente a tentativa de identificar os isolados fúngicos era feita usando apenas análises morfológicas, mas posteriormente, com o estabelecimento das técnicas moleculares a identificação se tornou mais acurada e permitiu a discriminação de espécies até então indistinguíveis, possibilitando assim um panorama mais fidedigno da diversidade de *A. section Nigri* no Brasil.

A seguir será revisado o histórico de publicações científicas realizadas com amostras brasileiras de grãos de café, uvas, castanha-do-brasil, cebolas e erva-mate, quanto à ocorrência de fungos toxigênicos, com foco em *A. section Nigri*.

#### 2.3.1 Grãos de Café

Os grãos de café (*Coffea arabica*) representam uma das principais *commodities* do Brasil, talvez por isso, esse tenha sido um dos produtos mais investigados quanto à ocorrência de fungos toxigênicos. Esse tipo de investigação no café brasileiro teve início com o trabalho de Silva et al. (2000) quando investigaram a biodiversidade microbiana de grãos de café oriundos da região de Lavras-MG. Segundo os autores, *Cladosporium* foi o gênero mais incidente (39,7%), e o gênero *Aspergillus* correspondeu a apenas 2,7% da incidência total, sendo representado unicamente pela espécie *A. niger* (seção *Nigri*), conforme identificação morfológica.

Em 2001, Urbano et al. (2001) investigaram um grande número de amostras de grãos de café (*C. arabica*), provenientes de propriedades localizadas em Mundo Novo (MG), em diferentes estágios de maturação ou processamento. *A. niger* e *A. ochraceus* foram as principais espécies identificadas. A ocorrência dessas espécies foi relatada como constante, independentemente do cultivar, do ano de colheita ou região produtora. Os autores também investigaram a capacidade de produção de OTA por essas duas espécies, e encontraram que cerca de 90% dos isolados de *A. ochraceus* eram produtores de OTA, enquanto que esse fenótipo só foi detectado em cerca de 10% dos isolados de *A. niger*. Nessa ocasião os autores

não detectaram a presença de *A. carbonarius*, uma importante espécie ocratoxigênica de *A. section Nigri*.

Posteriormente, Taniwaki et al. (2003) investigaram a ocorrência de *Aspergillus* em amostras de grãos de café (*C. arabica*) coletadas em São Paulo e Minas Gerais. *A. niger*, *A. carbonarius* (seção *Nigri*) e *A. ochraceus* (seção *Circumdati*) foram espécies encontradas em 13%, 1% e 5,8% das amostras, respectivamente. À época, os autores concluíram que *A. ochraceus* era o principal responsável pela contaminação do café brasileiro com OTA e que *A. niger*, embora tivesse sido a espécie mais incidente, possuía um papel minoritário na contaminação com a referida toxina, uma vez que, 75% dos isolados de *A. ochraceus* foram capazes de produzir OTA e somente 3% dos isolados de *A. niger* apresentaram essa capacidade.

Ainda no ano de 2003, Batista et al. reportaram resultados semelhantes ao analisarem a ocorrência de fungos toxigênicos em amostras de grãos de *C. arabica* de 11 municípios mineiros. O gênero *Aspergillus* foi o mais incidente estando presente em 96% das amostras, sendo que as principais espécies encontradas foram: *A. ochraceus*, *A. fresenii* (seção *Circumdati*), *A. niger*, *A. awamori* (seção *Nigri*), *A. tamarisii* e *A. flavus* (seção *Flavi*). Dentre os *Aspergillus*, a seção *Circumdati* foi prevalente, contudo, os *Aspergillus* negros também ocorreram frequentemente e foram representados apenas por espécies do clado *A. niger*. Igualmente a Taniwaki et al. (2003), esses autores concluíram que *A. ochraceus* é o principal responsável pela contaminação do café com OTA, uma vez que não encontraram isolados de *A. section Nigri* produtores de OTA.

Martins et al. (2003) investigaram 60 amostras de grãos de *C. arabica* coletadas no Brasil. *A. niger* foi a espécie mais freqüente, estando presente em 83,3% das amostras. *A. ochraceus* também foi relatado, porém em apenas 53,3% das amostras analisadas. Os autores também investigaram a contaminação com OTA nas amostras de grãos de café verde e relataram que 33,3% das amostras analisadas estavam contaminadas com a referida toxina (variando de 0,2 a 7,3 ug/kg).

O primeiro estudo que fez uso de dados de sequências de DNA para auxiliar na identificação de *A. section Nigri* isolados de amostras de grãos de café produzidos no Brasil foi publicado em 2005, Magnani et al. (2005) isolaram *Aspergillus* negros de amostras de grãos de café provenientes de 16 propriedades do norte do estado do Paraná. Um total de 108 isolados de *Aspergillus* foi identificado pelo sequenciamento dos espaçadores internos transcritos (ITS1-5,8S-ITS2) do DNA ribossomal (*nrDNA*). Cerca de 35% do total dos *Aspergillus* identificados pertenciam à seção *Nigri*. Dentre os fungos desta seção, 68,4% dos isolados foram identificados

como *A. niger*, 29% como *A. tubingensis* e apenas 2,6% como *A. carbonarius*, uma potente espécie produtora de OTA.

Em 2008, Silva et al. (2008) analisaram amostras de *C. arabica* coletadas em Lavras-MG, tendo detectado seis gêneros fúngicos, dentre os quais *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais frequentes. Na etapa de secagem/fermentação do café, *Aspergillus* representaram cerca de 40% do total de fungos isolados, e *A. niger* foi a espécie fúngica predominante. Na etapa de estocagem, a incidência de *Aspergillus* aumentou para cerca de 60% do total de fungos e *A. flavus* passou a ser a espécie mais frequente. Contudo, ressalta-se o fato de que os autores utilizaram apenas dados morfológicos para a identificação das espécies.

Vilela et al. (2010) analisaram a microbiota de amostras de café, do sul de Minas Gerais, em diversos estágios de processamento do método semi-seco. Os autores identificaram diferentes grupos microbiológicos: bactérias, leveduras e bolores, dentre os fungos filamentosos *Aspergillus* foi o gênero mais frequente. A identificação dos fungos foi realizada com base em morfologia e pelo sequenciamento do *barcode* para fungos (*nrDNA*), *A. section Nigri* esteve representada por *A. tubingensis* e *A. niger*, destaca-se o fato de *A. ochraceus* ter ocorrido em baixa frequência nas amostras analisadas por esses autores.

Em 2013, Rezende et al. investigaram a ocorrência de fungos ocratoxigênicos em 30 amostras de grãos de *C. arabica* coletadas no estado de Minas Gerais, em sistemas de cultivo orgânico e convencional. Como reportado pelos autores, *A. section Nigri* correspondeu a 29,2% da contaminação fúngica total. Os sistemas de cultivo influenciaram significativamente na microbiota encontrada. No café obtido pelo método convencional *Aspergillus* corresponderam a 35% da incidência total, sendo que *A. tubingensis* foi a espécie mais encontrada, já para o café obtido pelo cultivo orgânico a incidência de *Aspergillus* foi de 27% e a espécie mais frequentemente encontrada foi *A. niger* (*syn. A. foetidus*). *A. ochraceus* esteve presente em alta frequência em ambos os sistemas de cultivo e também foi reportado como a principal espécie responsável pela contaminação do café com OTA, sendo 65% dos isolados dessa espécie positivos para produção dessa toxina. A produção de OTA pelos isolados de *A. section Nigri* também foi avaliada pelos autores, mas apenas 3,9% dos isolados foram ocratoxigênicos.

Recentemente, Viegas et al. (2017) investigaram amostras de café de vários países, incluindo amostras de café brasileiro. Os investigadores portugueses encontraram *A. section Nigri* como predominante, seguida de *A. section Circumdati*. A identificação, fazendo uso de PCR em tempo real, demonstrou *A. niger* como a única espécie dentre os *Aspergillus* negros. Notoriamente os autores também encontraram *Aspergillus fumigatus* (seção *Fumigati*), um

patógeno humano envolvido em vários casos de aspergiloses (CHABI et al., 2015; LATGÉ et al., 1999; WARRI, 2014).

Concluiu-se a este ponto da revisão de literatura que trata da ocorrência de *A. section Nigri* em amostras de grãos de café produzidos no Brasil, que dentre essas as espécies do clado *A. niger* são as mais frequentes, e que a maioria dos isolados de *Aspergillus* negros presentes no café brasileiro não são capazes de produzir OTA, o oposto ocorre para *A. ochraceus*, uma espécie da seção *Circumdati* que junto de *A. niger*, figuram como as espécies fúngicas de maior incidência no café brasileiro.

Há completa carência de estudos sobre a presença de fumonisinas em café, bem como do potencial de produção de fumonisinas dos *Aspergillus* negros isolados desse substrato. Considerando que *A. niger* ocorre frequentemente em grãos de café e que 74% dos isolados dessa espécie são produtores de FB<sub>2</sub> (MASSI et al., 2016), faz-se necessário que estudos de avaliação de risco sejam realizados. Além disso, detecta-se nesta revisão que há carência de estudos sobre a ocorrência de fungos toxigênicos em *Coffea canephora*, pois essa espécie de café representa 24% da produção nacional.

### 2.3.2 Uvas

As uvas viníferas têm sido alvo de investigações quanto à ocorrência de micotoxinas e fungos toxigênicos desde a década de 70, e se intensificaram a partir de 2000, principalmente na Europa (ABRUNHOSA et al., 2001; PETZINGER; ZIEGLER, 2000; SAGE et al., 2002; SCOTT; FULEKI; HARWIG, 1977).

Da Rocha Rosa et al. (2002) foram pioneiros na América Latina ao investigarem a incidência e o potencial toxigênico de fungos presentes em bagas de *Vitis vinifera* (variedades Malbec e Chardonnay) coletadas na região de Mendoza (Argentina) e Caxias do Sul (Brasil). *Aspergillus* foi o gênero fúngico mais frequente, sendo que *A. niger*, *A. carbonarius* (seção *Nigri*) e *A. flavus* (seção *Flavi*) foram as espécies mais incidentes. A análise do potencial ocratoxigênico dos isolados, realizada pelos autores, mostrou que as amostras brasileiras apresentaram maior número de isolados toxigênicos ( $n=26$ ) do que amostras de uvas argentinas ( $n=8$ ).

Ao analisarem oito variedades de uvas viníferas (Muscat Itália, Muscat Canelli, Chenin Blanc, Syrah, Touriga Nacional, Rubi Cabernet, Tempranillo e Barbera), coletadas nos estados de Pernambuco e Bahia, Freire et al. (2017) relataram o gênero *Aspergillus* como o mais

incidente representando cerca de 75% da incidência fúngica total e, dentre os *Aspergillus*, a seção *Nigri* correspondeu a 98,6% do total, sendo *A. carbonarius* e *A. niger* as espécies mais incidentes. Os autores analisaram 346 isolados quanto à produção de OTA, sendo que 32,1% dos isolados foram positivos para esse fenótipo e todos os isolados ocratoxigênicos foram identificados como *A. carbonarius*. Os autores concluíram que *A. carbonarius* é a principal espécie responsável pela contaminação das uvas com OTA.

Em contraponto à maior parte dos trabalhos, Einloft et al. (2017) demonstraram que *A. section Nigri* foi pouco incidente em amostras de uvas Merlot e Cabernet Sauvignon coletadas nas regiões nordeste, sudeste e sul do Brasil. Nesse estudo, *Alternaria* spp. foram predominantes (88.1% da incidência fúngica total) sob todos os demais gêneros fúngicos. *A. section Nigri* correspondeu a 88% da incidência total de *Aspergillus*, sendo que dentre os *Aspergillus* negros as espécies do agregado *A. niger* representaram 78% do total, os autores ainda destacaram a ausência de *A. carbonarius*.

Até o ano de 2017, a investigação da microbiota de uvas era restrita à espécie *V. vinifera*, entretanto, a maior parte das uvas produzidas no Brasil é de variedades de *Vitis labrusca* ou híbridos entre essas duas espécies. As variedades de *V. labrusca* são cultivadas em várias regiões do país e muito utilizadas para a produção de sucos e vinhos coloniais. O grupo de pesquisa da UEL em colaboração com o do ITAL foi pioneiro em investigar e divulgar resultados sobre a microbiota de *V. labrusca* (FERRANTI et al. 2018). Os autores coletaram amostras de *V. labrusca* de 8 variedades (Bordo, Cora, Concord, Isabel, Violeta, Coder, Rudder e Niagara) nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Pernambuco e São Paulo. Os gêneros *Cladosporium* e *Aspergillus* foram os mais incidentes com 27,8% e 13,9% da incidência total de fungos filamentosos, respectivamente. Dentre *A. section Nigri*, 80% pertenciam a espécies unisseriadas, 18,2% ao agregado *A. niger*, e 2,4% a *A. carbonarius*. Os autores encontraram *A. japonicus*, *A. uvarum* e *A. niger* como as espécies proeminentes. A espécie *A. vadensis* (considerada rara) foi encontrada nas amostras coletadas em Pernambuco. A incidência de isolados de *A. niger* e *A. welwitschiae* produtores de FB<sub>2</sub> foi de 70% e 18,2%, respectivamente. Dentre os fungos da seção *Nigri*, cerca de 75% dos isolados produtores de OTA pertenciam à espécie *A. carbonarius*. Esse mesmo grupo de pesquisadores, ao investigarem a microbiota de *V. labrusca*, provenientes da Serra Gaúcha, descreveram uma nova espécie de *A. section Nigri*, a qual foi nomeada *Aspergillus labruscus* (FUNGARO et al., 2017).

Conclui-se com esta revisão que *A. section Nigri* é o grupo de fungo filamentoso mais comum em uvas brasileiras, sendo *A. niger* as espécies mais frequentemente isoladas de *V. vinifera*, e *A. japonicus* a mais incidente em *V. labrusca*. Além disso, *A. carbonarius* parece ser

o principal responsável pela contaminação com OTA neste alimento. Destaca-se a descontinuidade nas investigações da microbiota de uvas brasileiras, há um hiato (2003-2016) onde as poucas investigações foram focadas na ocorrência das micotoxinas nas uvas e seus subprodutos (KRUGER; FERNANDES; ROSA, 2012; ROSA et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2011; TERRA et al., 2013; WELKE et al., 2010) e não na microbiota presente nesse substrato. Registra-se ainda a necessidade de mais investigações quanto a microbiota de *V. labrusca*, que representa cerca de 90% da produção nacional de uvas.

### 2.3.3 Castanha-do-brasil

A castanha-do-brasil também conhecida como castanha-do-pará, representa um dos principais produtos do extrativismo no país, com grande fluxo de exportação. As investigações da microbiota da castanha-do-brasil tiveram início com o trabalho de Freire e colaboradores (FREIRE et al., 2000). Esses autores avaliaram a microbiota da castanha-do-brasil coletada no estado do Pará e relataram *A. flavus* (section *Flavi*) e *A. niger* (section *Nigri*) como sendo as espécies mais frequentes, juntas representaram 39,5% da incidência fúngica total. A ocorrência de *A. tamarii* (section *Flavi*) também foi relatada, mas em baixa frequência.

Dois anos mais tarde, Bayman et al. (2002) investigaram a microbiota de várias nozes incluindo a castanha-do-brasil (em casca). O gênero *Aspergillus* foi o mais incidente em castanha-do-brasil, sendo a seção *Flavi* a mais presente. As espécies mais frequentes nas amostras foram *A. flavus* (51%), *A. tamarii* (26%), *A. niger* (14%) e *A. nidulans* (17,5%) (section *Nidulantes*). *A. fumigatus* (section *Fumigati*), também foi encontrado em 4,5% das amostras. Nesse trabalho todos os membros da seção *Nigri* foram chamados coletivamente de *A. niger*, conforme os autores esse grupo incluiu *A. niger*, *A. awamori* e ocasionalmente *A. japonicus*. Esse trabalho ilustra bem a dificuldade em se identificar as espécies da seção *Nigri* sem o auxílio de dados moleculares.

Em 2013, Lima et al. (2013) investigaram amostras de castanha-do-brasil coletadas na floresta amazônica e em mercados no estado do Pará. Esse foi um dos poucos trabalhos a empregar dados moleculares na identificação das espécies fúngicas isoladas de castanha-do-brasil, os autores identificaram os isolados com base no sequenciamento da região ITS (*nrDNA*). *Aspergillus* e *Penicillium* foram os gêneros mais comuns, *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger* foram as espécies de *Aspergillus* encontradas, porém *A. niger* foi encontrado apenas em amostras de mercado.

Reis et al. (2012) relataram *Phialemonium* como o gênero predominante (54%) em castanhas-do-brasil coletadas na região amazônica, entretanto, *A. section Flavi* também foi reportada, sendo *A. nomius* e *A. flavus* as espécies mais encontradas desse grupo. A presença de *A. section Nigri* não foi citada pelos autores, esse é um dos poucos trabalhos que reportaram o gênero *Aspergillus* como pouco incidente em castanha-do-brasil (apenas 5%).

Midorikawa et al. (2014) analisaram amostras de castanha-do-brasil coletadas nos estados do Acre, Amapá e Amazonas. Dentre os *Aspergillus*, *A. nomius* e *A. flavus* foram citados como as espécies predominantes, compreendendo juntas cerca de 85% do total. *A. niger* foi encontrado apenas em amostras do estado do Amazonas e representou apenas 0,73% do total de *Aspergillus*. Em contrapartida, Moreira et al. (2015) reportaram *A. niger* como uma das espécies mais frequentes em castanhas-do-brasil comercializadas em Fortaleza-CE, compreendendo 21,4% da incidência fúngica total, outras espécies de *Aspergillus* encontradas por esses autores foram *A. flavus* e *A. terreus* (seção *Terrei*).

Os resultados de vários outros trabalhos acerca da microbiota de castanha-do-brasil, conduzidos no período de 2005 a 2016, não serão detalhados na presente revisão (ARRUS et al., 2005; BAQUIAO et al., 2013; BAQUIAO et al., 2016; CALDERARI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2012; MIDORIKAWA et al., 2008), porque, de modo geral, enfatizaram a presença dos *Aspergillus section Flavi*, a qual não é foco da presente revisão.

Recentemente, Ferranti et al. (2017) investigaram a ocorrência de *A. section Nigri* em amostras de castanha-do-brasil coletadas em mercados do estado de São Paulo e na floresta amazônica. *A. niger* e *A. welwitschiae* foram as espécies encontradas, a ocorrência dessas duas espécies foi equilibrada com 43% e 57%, respectivamente. Esse é o primeiro trabalho que relata *A. welwitschiae* em castanha-do-brasil. Esse trabalho difere dos anteriormente citados porque a identificação das espécies foi feita com base na associação de dados morfológicos e sequências de nucleotídeos de uma porção do gene *CaM*. Até então, os poucos trabalhos que haviam utilizado dados moleculares foram conduzidos com base em sequências de nucleotídeos das regiões ITS1 e ITS2, as quais não discriminam *A. niger* e *A. welwitschiae*. É importante lembrar que o desmembramento de *A. niger* em *A. niger sensu stricto* e *A. welwitschiae* só ocorreu em 2011 (PERRONE et al., 2011). Esses autores também analisaram a presença de FB<sub>2</sub> em amostras de castanha do Brasil, mas não detectaram contaminação com a referida toxina, ainda que 21,5% dos isolados pertencentes a *A. section Nigri* tenham sido produtores de FB<sub>2</sub> em meio de cultura YESA.

Após um amplo estudo da microbiota da castanha-do-brasil, em toda sua cadeia de processamento, Taniwaki et al. (2017) reportaram que *A. tubingensis*, *A. luchuensis*, *A.*

*neoniger*, *A. ibericus*, *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. welwitschiae* são as espécies da seção *Nigri* encontradas em castanha-do-brasil. Os autores utilizaram dados morfológicos e de perfil de metabólitos secundários para a identificação das espécies, porém, para a discriminação de *A. niger* e *A. welwitschiae*, sequências de nucleotídeos do gene que codifica a beta-tubulina (*BenA*) foram utilizadas. Conforme os autores, dentre os *Aspergillus* negros as espécies do clado *A. niger* são as que mais ocorreram e, segundo a análise filogenética aplicada a esse clado, 44,4% da ocorrência correspondeu à espécie *A. welwitschiae* e 55,6% à *A. niger*. Taniwaki et al. (2017), também avaliaram a capacidade para produção de OTA dos isolados pertencentes a espécies potencialmente ocratoxigênicas, apenas 3% dos isolados de *A. niger* foram capazes de produzir a toxina, ao passo que, nenhum isolado de *A. welwitschiae* produziu OTA e todos os isolados de *A. carbonarius* apresentaram esta capacidade.

Em sùmula, *A. section Flavi* é o grupo de maior importância em castanha-do-brasil, sendo as espécies *A. flavus* e *A. nomius* as mais recorrentes, entretanto, *A. section Nigri* também foi reportada por alguns autores. *A. section Nigri* foi majoritariamente representada por espécies do clado *A. niger*. Entretanto, o número de *Aspergillus* negros isolados desse alimento que são capazes de produzir OTA e/ou FB<sub>2</sub> foi baixo.

#### 2.3.4 Cebolas

Um outro produto a ser abordado nesta revisão são os bulbos de cebola, os quais são frequentemente acometidos pela doença pós-colheita denominada “*black mould*” que tem como agente causal o fungo *A. niger* (ABD-ALLA; EL-MOHAMEDY; BADEAA, 2006; HAYDEN; MAUDE; PROCTOR, 1994). Embora a presença de fumonisinas já tenha sido relatada em cebolas destinadas ao consumo humano (BOONZAAIJER et al., 2008; GHERBAWY et al., 2015), no Brasil as investigações acerca da presença de micotoxinas e fungos toxigênicos nesse vegetal são extremamente escassas.

Bertoldo (2015), em seu trabalho de dissertação de mestrado, isolou fungos da seção *Nigri* de bulbos de cebola (pós-colheita e no campo) e identificou espécies produtoras de OTA e FB<sub>2</sub>. Foram analisadas 63 amostras de bulbos de cebola, sendo: 40 de pós-colheita e 23 de campo. Nos bulbos de cebola pós-colheita e de campo a média de infecção por *Aspergillus* section *Nigri* foi de 64% e 3%, respectivamente, resultando em um total de 1.337 isolados. Apenas 1,6% dos isolados foram produtores de OTA em meio de cultura e 53% foram produtoras de FB<sub>2</sub>.

Amostras de bulbos de cebola adquiridos mensalmente em supermercados, durante dois anos consecutivos (Janeiro/2014 a Dezembro/2015) foram analisadas quanto à presença de fungos por Massi (F.P.) (comunicação pessoal). Segundo a autora os fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* foram os mais incidentes. Isolados ( $n= 500$ ) pertencentes a *A. section Nigri* foram selecionadas ao acaso e analisados fazendo uso de uma metodologia de PCR multiplex, visando discriminar *A. niger/A. welwitschiae* das demais espécies fúngicas e detectar genes essenciais para a produção de ocratoxinas e fumonisinas. A maioria dos isolados (97,5%) foram reconhecidos como *A. niger/A. welwitschiae*. Dentre os isolados de *A. niger/A. welwitschiae*, 36,5% eram portadores do gene essencial para a síntese de fumonisina (*fum8*) e apenas 2,8% eram portadores de genes essenciais para a síntese de OTA (*radH* e *pks*). Após sequenciamento de uma porção do gene *CaM*, os autores detectaram que a maioria dos isolados (96%) de bulbos de cebolas pertenciam à espécie *A. welwitschiae*.

Como já citado na seção 2.2 dessa tese, em função do desmembramento de *A. niger sensu stricto* e *A. welwitschiae*, o agente causal de muitas doenças de plantas tem sido revisado de *A. niger* para *A. welwitschiae*, curiosamente os resultados de Massi et al. (2016) apontam para essa possibilidade, uma vez que historicamente *A. niger* tem sido imputado como o responsável pela “*black mould*” (HAYDEN; MAUDE, 2007; HAYDEN; MAUDE; PROCTOR, 1994; SRINIVASAN; SHANMUGAM, 2006; TYSON; FULLERTON, 2004).

Fica evidente a falta de informação sobre a ocorrência de fungos toxigênicos em cebolas, não apenas no Brasil mas em todo o mundo. O que se pode assimilar, é que *A. section Nigri* é de fato o principal grupo fúngico encontrado em cebolas, e que *A. welwitschiae* é a espécie prevalente. Ao contrário, do que ocorreu para os outros produtos listados nessa revisão as investigações sobre as cebolas se iniciaram recentemente, e embora sejam escassas parecem ter suscitado bons questionamentos.

### 2.3.5 Erva-mate

Existem poucas investigações acerca da micobiota da erva-mate brasileira, os estudos são, em sua maioria, publicados na forma de teses/dissertações ou em periódicos de circulação nacional (em português). A maior parte das investigações se restringe a identificação morfológica e acabam se limitando ao nível de gênero ou seção (BERNARDI et al. 2005; BORGES et al. 2002; PIMENTEL et al., 2006; VIEIRA et al. 2010).

Borges et al. (2002) analisaram a ocorrência de fungos toxigênicos em amostras de erva-mate elaborada para chimarrão comercializadas em Curitiba (PR). O gênero *Aspergillus* foi o mais incidente, com 62% da incidência fúngica total, seguido de *Penicillium* com 32%. De modo semelhante, Bernardi et al. (2005), investigaram a micobiota de amostras de erva-mate elaboradas para chimarrão comercializadas em Pelotas (RS), o gênero *Aspergillus* foi o prevalente, estando presente em 70% das amostras analisadas. Os autores não identificaram os isolados a nível de espécie.

Ao analisarem folhas jovens e velhas de erva-mate nativa e cultivada coletadas no Paraná, Pimentel et al. (2006) reportaram *Penicillium* como o gênero fúngico de maior ocorrência, seguido por *Aspergillus* no quadro geral. Os autores encontraram diferenças significativas em relação a micobiota das folhas de ervas nativos e cultivados, e em relação a idade das folhas (jovens ou velhas). *Aspergillus* foi o gênero mais incidente em folhas de erva cultivada, e em folhas jovens, enquanto que, *Penicillium* foi o prevalente em folhas de erva nativa e folhas velhas.

Vieira et al. (2010) investigaram a ocorrência de fungos patogênicos na erva-mate comercializada no Rio Grande do Sul, os autores relataram *A. niger* e *A. fumigatus* como as espécies prevalentes em suas amostras. *A. flavus* também foi reportado em baixa frequência.

Os relatos existentes concordam em demonstrar a ocorrência massiva de fungos do gênero *Aspergillus* em erva-mate, entretanto, a maior parte dos trabalhos se limita a informar o gênero fúngico, não esclarecendo se há fungos pertencentes a *A. section Nigri* e a quais espécies.

Dentre todos os substratos revisados no presente trabalho a erva-mate parece ser o que mais carece de estudos. Embora as primeiras investigações no Brasil acerca da ocorrência de fungos em erva-mate tenham se iniciado a quase duas décadas, não há nenhum trabalho que tenha empregado dados moleculares, ou técnicas modernas de detecção da capacidade de produção de micotoxinas pelos isolados fúngicos. Considerando isso, a investigação da micobiota da erva-mate brasileira pelo emprego de técnicas contemporâneas integra um dos objetivos dessa tese.

## 2.4 Fronteiras na delimitação de espécies fúngicas

### 2.4.1 Taxonomia polifásica e Reconhecimento de Espécies Filogenéticas por Concordância Genealógica (GCPSR)

A definição clara e consistente de espécie se faz necessária para guiar as práticas taxonômicas na construção de uma classificação biológica robusta (BERNHARD, 2011; QUEIROZ, 2005; VELASCO, 2008).

Conforme revisto por Aldhebiani (2018), definir e reconhecer uma espécie tem sido uma questão controversa há muito tempo. Para determinar a variação e a limitação entre espécies, muitos conceitos foram propostos ao longo dos anos, mas a aplicação de cada um deles se apresenta com aspectos positivos e negativos. Nessa recente revisão o autor discute os conceitos mais relevantes e ressalta que quando um taxonomista estuda um táxon específico, ele deve adotar um conceito de espécie e fornecer uma limitação para o mesmo.

No caso dos fungos filamentosos o conceito de espécie mais apropriado parece ser o pluralista, que nada mais é do que uma composição de vários conceitos. A utilização de mais de um conceito torna a delimitação de espécie mais fidedigna. A taxonomia polifásica muito presente na taxonomia de *Aspergillus* na última década (CARVAJAL-CAMPOS et al., 2017; FUNGARO et al., 2017; HUBKA et al., 2016; HUBKA et al., 2018; JURJEVIC et al., 2012; VARGA et al., 2011; VISAGIE et al., 2014; YILMAZ et al., 2016), pode ser alocada como uma forma pluralista de reconhecimento de espécie, pois leva em conta os conceitos de espécie morfológica (MSC) e filogenética (PSC).

O conceito de espécie filogenética (PSC) leva em consideração a ancestralidade. Uma espécie filogenética é composta por populações que compartilham características genômicas singulares que resultam em grupos monofiléticos, geralmente definidos como um grupo de organismos que inclui o ancestral comum e todos os seus descendentes. As mudanças genéticas podem ser observadas muito antes da fixação das mudanças morfológicas e comportamentais, dessa forma, a PSC tem sido apontada como a interpretação mais sensível da história evolutiva das espécies (BAUM, 1992; TAYLOR, 2000; RINTOUL; EGGERTSON; LÉVESQUE, 2012).

Conforme Samson et al. (2014), a taxonomia polifásica do gênero *Aspergillus* deve ser feita com base na análise de caracteres morfológicos e fisiológicos (ambos fazem parte de MSC), e da análise filogenética com base em sequências de nucleotídeos das regiões ITS1 e ITS2 (*barcode* para fungos) ou em sequências de marcadores alternativos (*CaM*, *BenA* e *RPB2*) (PSC).

Para as análises filogenéticas, o emprego de múltiplos *loci* tem sido recomendado, uma vez que raramente será possível reconstruir o passado evolutivo com base em um único *locus* (ALBDHEBANI et al., 2018; BALASUNDARAM et al., 2015). Conforme revisado em Upreti et al. (2015), o uso de um único *locus* pode ser útil na identificação de espécies, entretanto, pode ser limitante para grupos de espécies que divergiram recentemente, pois a genealogia

derivada de um único *locus* pode não espelhar o processo real de especiação. Dupuis et al. (2012) examinaram detalhadamente 425 estudos sobre a delimitação de diversas espécies com várias classes de marcadores (DNA ribossomal, mtDNA, ligado ao sexo e anônimo) e com diferentes *loci*, e concluíram que, de fato, a adição de mais *loci* contribui significativamente para a delimitação de espécies.

Numa tentativa de aprimorar o reconhecimento de espécies filogenéticas, Taylor et al. (2000) propuseram o reconhecimento de espécies filogenéticas por concordância genealógica (GCPSR). Esta abordagem se baseia na comparação da genealogia das árvores de vários *loci*, a fim de estabelecer o limite de uma espécie. Conforme Taylor et al. (2000), quando as diferentes genealogias são concordantes isso se deve à fixação de *loci* anteriormente polimórficos, após o isolamento genético. Desta forma, ramos concordantes conectam espécies, ao passo que, ramos conflitantes resultam da recombinação entre os indivíduos dentro de uma espécie, e a transição (intersecção) da concordância para o conflito determina os limites das espécies. Ao utilizar o GCPSR, a subjetividade de se reconhecer os limites de uma espécie filogenética é reduzida, pois o protocolo estabelece passos bem definidos que são bem apoiados conceitualmente, evitando assim o viés de confirmação. Assim, os limites das espécies servem como hipóteses taxonômicas que podem ser testadas com dados adicionais.

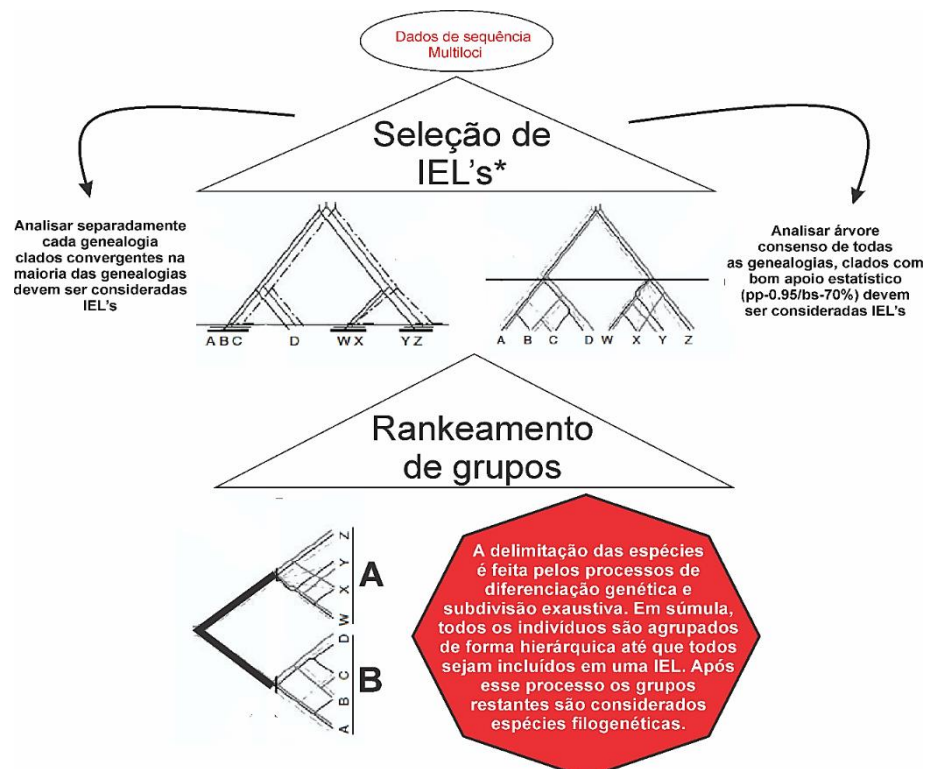
A GCPSR tem sido amplamente utilizada na filogenia de fungos, e tem apoiado a descrição de novas espécies (ABE et al., 2010; FRISVAD et al., 2019; HIRATA et al., 2007; LAURENCE et al., 2014; LIU et al., 2016; O'DONNELL et al., 2004; SECOR et al., 2014; STEWART et al., 2014; VISAGIE et al., 2016).

Conforme já dito, o conceito de reconhecimento de espécie filogenética foi elaborado por Taylor et al. (2000), que o fizeram com base nas considerações precedentes de outros estudos, especialmente de Avise e Ball (1990). Contudo, a aplicação do GCPSR propriamente dito foi elaborada por Dettman et al. (2003), que construíram um protocolo sequencial para o reconhecimento de espécies filogenéticas baseada em duas fases. Inicialmente, é realizada a identificação de linhagens evolutivas independentes (IEL'S). Para tanto, os autores estabeleceram dois critérios: (1) o de concordância genealógica, no qual o clado deve estar presente na maioria das genealogias analisadas, isto é, ao se analisar a topologia de cada árvore consenso (*Major-rule consensus*) separadamente, a linhagem evolutiva deve ser consistente na maioria delas, independentemente dos níveis de suporte estatístico (*bootstrap*-BP ou probabilidade posterior-PP). (2) o de não-discordância genealógica, no qual o clado pode ser considerado uma IEL se tiver bom suporte estatístico (BS e PP) em ao menos uma genealogia e não for contradito em um mesmo nível de apoio por outro *locus*, a identificação desses clados

é feita pela análise de uma árvore de consenso (*semi-strict consensus*) combinando a filogenia de todos os *loci* analisados. Dettman et al. (2003) estipularam valores arbitrários de suporte estatístico, ou seja, 70% para valores de *bootstrap* e 0,95 para probabilidade posterior. O critério de não discordância genealógica impede que uma não-monofilia mal suportada “atrapalhe” um monofiletismo bem suportado em um outro *locus*. O enquadramento em um destes dois critérios satisfaz a condição para o reconhecimento de uma linhagem evolutiva independente.

Na segunda fase, as IEL's são categorizadas como espécies filogenéticas através de dois critérios: 1) de diferenciação genética, onde os clados perimetrais (*minor tip clades*) reconhecidos como IEL'S tem de ser relativamente distintos e bem diferenciados dos outros para evitar que clados perimetrais sejam reconhecidos como espécies filogenéticas. (2) de subdivisão exaustiva, o qual impõe que todos os indivíduos sejam atribuídos a uma espécie filogenética. Então, se um indivíduo não é incluído dentro de uma IEL, este clado é colapsado ao nó adjacente até que se encontre a IEL mais basal possível; isto é feito hierarquicamente até que todos os indivíduos estejam alocados dentro de uma IEL que passa então a ser reconhecida como uma espécie filogenética. A Figura 4 traz um diagrama com os principais passos para a filogenia com base em GCPSR.

**Figura 4** – Diagrama ilustrando os principais passos na filogenia com base no reconhecimento de espécies por concordância genealógica (GCPSR).



Fonte: Adaptado de Taylor et al. (2000) e Dettman et al. (2003).

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo a investigação da diversidade genética de *A. section Nigri*, com foco no clado *A. niger*, isolados de uvas, cebolas, erva-mate, castanha-do-brasil e grãos de café produzidos em diferentes regiões do Brasil. Adicionalmente, este trabalho também teve como propósito comparar a diversidade genética encontrada num conjunto de isolados pertencentes ao clado *A. niger*, obtidos de produtos agrícolas produzidos no Brasil, frente a diversidade depositada no maior banco público de sequências do mundo, o GenBank.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a contaminação fúngica e a diversidade de *Aspergillus* em erva-mate (chimarrão).
- Identificar espécies toxigênicas em erva-mate e analisar a capacidade de produção de micotoxinas (OTA, FB<sub>2</sub> e aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>).
- Investigar a diversidade genética do clado *A. niger* baseando-se em sequências do gene *CaM* depositadas no GenBank.
- Investigar a diversidade genética do clado *A. niger* baseando-se em sequências do gene *CaM* de 403 isolados obtidos de produtos agrícolas.
- Comparar a diversidade genética encontrada entre os dois conjuntos de dados analisados (GenBank e produtos agrícolas).
- Fazer uso do protocolo de Reconhecimento de Espécies Filogenéticas por Concordância Genealógica (GCPSR), a fim de prospectar linhas/espécies evolucionárias independentes.
- Realizar análises morfológicas a fim de validar ou não possíveis espécies novas dentro do clado *A. niger*.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados sob a forma de dois artigos científicos.

### Artigo científico I:

#### *4.1 Occurrence and diversity of Aspergillus in commercial yerba mate elaborated for the Brazilian beverage 'chimarrão'*

Silva, Josue & Puel, Olivier & Lorber, Sophie & S. Ferranti, Larissa & F. Ortiz, Luryan & Taniwaki, Marta & T. Iamanaka, Beatriz & Fungaro, Maria. (2019). Food Research International. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.023>

### Abstract

Dried leaves and stems of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (yerba mate) are used to make a popular beverage in some countries of South America, commonly known as "chimarrão". The present study was designed to evaluate the occurrence of toxigenic *Aspergillus* in yerba mate in order to define the mycotoxin risk associated with this foodstuff. All samples tested were positive for fungal contamination, and the fungal load per sample ranged from  $2.0 \times 10^2$  to  $1.6 \times 10^4$  CFU/g. *Aspergillus* section *Nigri* was found in all samples and represented 76.5% of the total fungi isolated. *Aspergillus* section *Circumdati*, *Aspergillus* section *Flavi* and *Aspergillus* section *Cremeri* were found at low frequencies. Thirteen different *Aspergillus* species were identified. The most common species found was *A. luchuensis*, which does not produce any harmful toxin for humans. *A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. flavus* and *A. novoparasiticus*, all potentially toxigenic species, were found only in small quantities. The *A. niger* and *A. welwitschiae* strains were cultured to test for ochratoxin A and fumonisin B<sub>2</sub> production. Only one strain producing ochratoxin A was found, but approximately 29% of the strains were positive for fumonisin B<sub>2</sub>. The *A. flavus* and *A. novoparasiticus* strains were tested for aflatoxins production, and 63% were positive. *A. pallidofulvus*, recently assigned to *A.* section *Circumdati*, was reported for the first time in herbs. All *A. pallidofulvus* strains analyzed in this study were negative for ochratoxin A production. In conclusion, *A.* section *Nigri* occurs with high frequency in yerba mate, and *A. luchuensis* is the predominant species. Although toxigenic species were found in this herb, the incidence was low.

**Keywords:** mycotoxins, herbs, mycobiota, *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus pallidofulvus*, *Aspergillus novoparasiticus*

## 1. Introduction

Mate is a very popular beverage in some South American countries. It is made from the leaves and stems of *Ilex paraguariensis* St. Hil., known as yerba mate, a perennial shrub that belongs to the Aquifoliaceae family. This species is native to the subtropical regions of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay (Garcia Londono, Reynoso, & Resnik, 2014), and cultivated in northeastern Argentina, eastern Paraguay and southern Brazil (Burris, Davidson, Stewart, Zivanovic, & Harte, 2012; Heck & de Mejia, 2007).

The aqueous extract of yerba mate is traditionally consumed as a hot beverage (*chimarrão*), an infusion of the crushed and dried leaves and stems, or as a cold beverage (*tererê*), which is a mixture of mate macerated in ice water, or as roasted tea, an infusion of the leaves (Thea, Ferreira, Brumovsky, & Schmalko, 2016; Vieira, Peres, Aquino, & Pasqualotto, 2010). Yerba mate has rapidly become popular throughout the world, and the United States is one of its largest importers (FAOSTAT, 2018).

Yerba mate has important pharmacological properties. It is used as an antioxidant, vasodilator, anti-inflammatory remedy, chemopreventive agent, thermogenic agent, and to treat insulin resistance and obesity (Gambero & Ribeiro, 2015). However, the consumption of hot mate has been associated with a significantly increased risk of developing esophageal cancer. Some studies suggest that the ingestion of infusions at high temperatures is the only risk factor, but others lend weight to the hypothesis that the risk is associated with other potentially carcinogenic substances in the infusion (Deneo-Pellegrini et al., 2013; Garcia-Londono, Reynoso, & Resnik, 2014; Lopes et al., 2018).

Yerba mate undergoes several stages during processing, including exposure to high temperatures. After drying, it is aged for between 2 months and over a year to enhance the flavor (Castrillo, Horianski, & Jerke, 2013; Heck & de Mejia, 2007). It is at this stage that favorable conditions exist for the proliferation of filamentous fungi, which can alter the sensorial characteristics of the beverage and adversely affect the commercial value of the crop. In addition, some fungal species can produce toxic secondary metabolites (Marin, Ramos, Cano-Sancho, & Sanchis, 2013).

Mycotoxins that have the greatest impact on public health and food quality include aflatoxins (AF) produced primarily by *Aspergillus* section *Flavi*; ochratoxin A (OTA) produced by *A.* section *Nigri*, *A.* section *Circumdati* and *Penicillium* spp. and fumonisins (FUM) produced by *Fusarium* spp. and *A.* section *Nigri* (Varga, Baranyi, Chandrasekaran, Vágvölgyi, & Kocsubé, 2015). Aflatoxin B<sub>1</sub> is now recognized as a human carcinogen, while fumonisin B<sub>1</sub> and OTA have been designated by the International Agency for Research on Cancer (IARC,

1993) as a possible human carcinogen. Although a number of studies have evaluated fungal food contamination, there are still very few studies on yerba mate (Bugno, Almodovar, Pereira, Pinto, & Sabino, 2006; Castrillo, Horianski, & Jerke, 2013; Vieira, Peres, Aquino, & Pasqualotto, 2010).

In view of the increasing popularity of beverages derived from yerba mate and the inherent risks of contamination by mycotoxins, the aim of this study was to evaluate the presence and toxigenic potential of *Aspergillus* species in commercial yerba mate.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Samples

In total, 30 samples (1 kg packs) were collected from markets representing the main brands (15) of yerba mate (elaborated for ‘chimarrão’). These brands originate from 12 sites located in Southern Brazil (Supplementary Figure 1), the largest producing region of the world. All samples were typically green in color, with shades ranging from yellow to brown. They consisted of at least 70% leaves and up to 30% other parts of the branch, finely ground (particle size 180-300  $\mu\text{m}$ ).

### 2.2. Count and mycological analysis

Samples were analyzed by serial dilution plating. A 25 g subsample from each sample was diluted in 225 mL of peptone water (0.1% peptone). An aliquot of 0.1 mL was spread-plated onto Dichloran (18%) Glycerol Agar (DG18) (90 x 15 mm plates) and incubated at 25 °C for 5 days. The number of colony forming units (CFU) was then counted and fungal incidence determined based on morphological characteristics (Pitt & Hocking, 2009).

### 2.3. Molecular identification

A total of 232 *Aspergillus* isolates representing all yerba mate samples was subcultured onto Czapek Yeast Autolysate agar (CYA) and pure cultures obtained. Genomic DNA was extracted using the Biopur Mini Spin Genomic DNA Extraction Kit® (Biometrix, Brazil), following the manufacturer’s recommended protocol. Part of the calmodulin gene (*CaM*) sequence was determined for *A. section Nigri* isolates ( $n= 150$ , five isolates from each sample) and part of the  $\beta$ -tubulin gene (*BenA*) sequence was determined for *A. section Circumdati/Cremeri/Flavi* isolates ( $n= 82$ , up to five isolates from each of the samples in which these fungal groups occurred). PCR amplifications were performed using CMD5/CMD6 (*CaM*)

and bt2a/bt2b (*BenA*) primer pairs, as described respectively by Hong, Cho, Shin, Frisvad and Samson (2006) and Glass and Donaldson (1995). The sequencing conditions were as described in Viaro et al. (2017). The sequences obtained were deposited in GenBank and accession numbers are given in the Results and Discussion section.

All sequences obtained in this study were aligned with ex-type or neotype strain sequences from *Aspergillus* species recognized by the International Commission of *Penicillium* and *Aspergillus* (<https://www.aspergilluspenicillium.org/>). The sequences were obtained from the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Alignment was performed using Clustal *W* (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994) and a maximum likelihood tree inferred using the Kimura-2-parameter model (Kimura, 1980) with gamma distributed (+G) and invariant (+I) sites. To determine the support for each clade, a bootstrap analysis was performed with 1,000 replicates using MEGA 7.0 software (Kumar, Stecher & Tamura, 2016).

#### 2.4. Mycotoxin production by *Aspergillus* strains

All strains identified as belonging to potentially toxigenic species were analyzed for their ability to produce the following mycotoxins: fumonisin B<sub>2</sub> by *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*, aflatoxins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>) by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus novoparasiticus*, and OTA by *A. niger*, *A. welwitschiae* and *Aspergillus pallidofulvus*, although the latter species is not currently considered toxigenic.

To test for fumonisin B<sub>2</sub> production by *A. niger* and *A. welwitschiae*, the strains were inoculated onto Czapek Yeast Extract 20% Sucrose agar (CY20S agar) and incubated at 25 °C for 7 days, following the method described in Frisvad, Smedsgaard, Samson, Larsen and Thrane (2007). Five small pieces of mycelium (plugs) were removed from the central portion of the colony and the toxin extracted with 1 mL of methanol in a vortex for 3 minutes. The extract was filtered through 0.45 µm and 0.22 µm Millex membranes. Then 55 µL of the extract was transferred to an HPLC vial, adding 55 µL of ortho-phthaldialdehyde reagent (OPA), according to the method in Shephard, Sydenham, Thiel and Gelderblom (1990). The extract was mixed in a vortex for 30 seconds. Chromatography was performed using a Shimadzu LC-10VP (Shimadzu, Japan) HPLC system, with a fluorescence detector set to 335 nm excitation and 440 nm emission. A YMC column - Pack ODS-A (5 µm, 4.6 x 150 mm) (YMC Co., Ltd., Japan) was used with the following mobile phase: acetonitrile: water: acetic acid (51:47:02 v/v/v), and a mobile phase flow rate of 1 mL/1 min. The oven temperature was 40 °C and injection volume 20 µL.

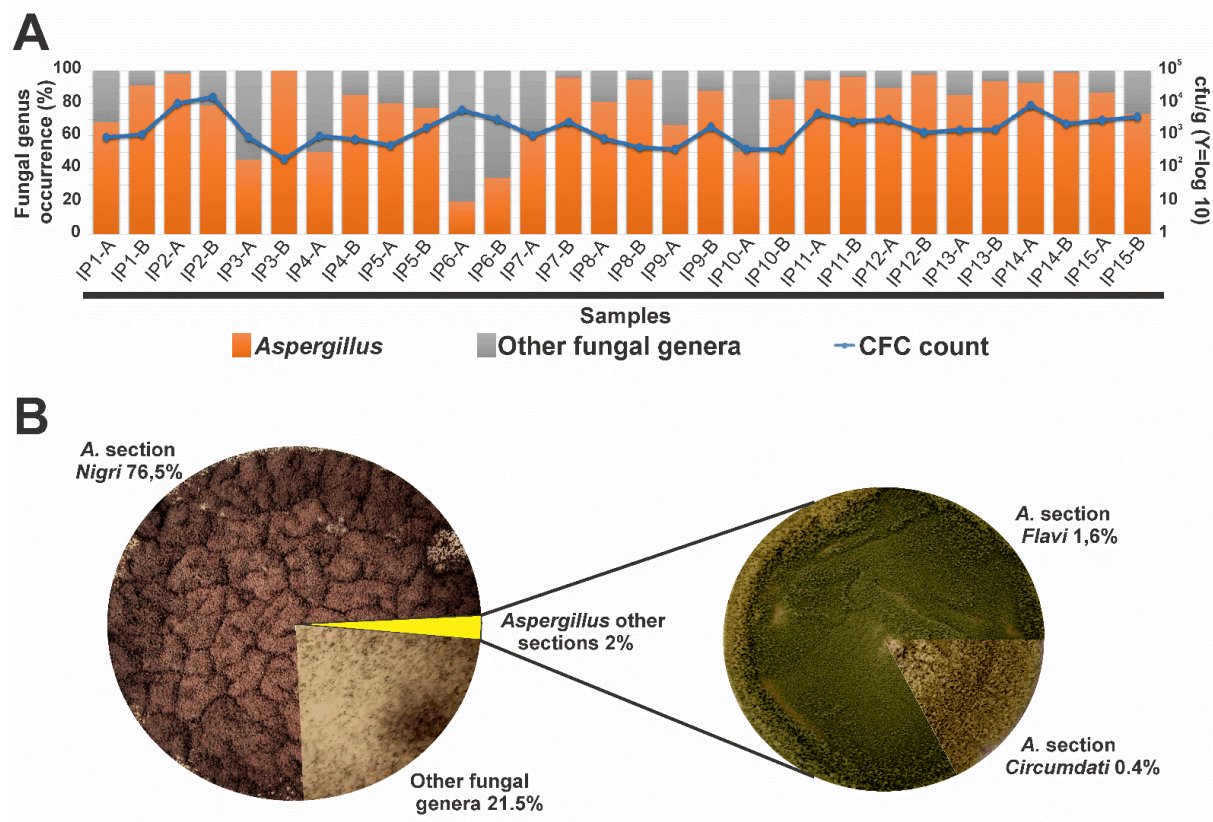
To test for ochratoxin A production by *A. niger*, *A. welwitschiae* and *A. pallidofulvus* and aflatoxins by *A. flavus* and *A. novoparasiticus*, the strains were inoculated onto Yeast Extract Sucrose Agar (YESA) and incubated at 25 °C for 7 days. Five small plugs of mycelium were removed from the middle of the colony and the toxin extracted with 1 mL of methanol by manually macerating for 2 min. The extract was filtered through 0.45 µm and 0.22 µm PVDF membranes. The eluate was injected into the Agilent 1260 Infinity (Agilent, USA) HPLC system, with a fluorescence detector. A C18 Agilent column (5 µm, 4.6 x 150 mm) (Agilent, USA) set at 40 °C, was used. The volume injection was 20 µL. For aflatoxins, the detector was set to 362 nm excitation and 455 nm emission and a Kobracell electrochemical reactor (R-Biopharm, Germany) was used. The mobile phase consisted of water:acetonitrile:methanol (6:2:3 v/v/v), with potassium bromide (119 mg/L and 350 mL of nitric acid 4M) and a flow rate 1 mL/min. For ochratoxin A the detector was set to 333 nm excitation and 477 nm emission and a flow rate was 0.8 mL/min.

The production of OTA by *A. pallidofulvus* strains was also investigated using the HPLC-DAD and LC-HRMS approaches. Ten *A. pallidofulvus* strains were cultivated on CYA, YES and Malt Extract Agar (MEA) media for 7 days at 25 °C. The cultures were extracted with 50 mL ethyl acetate and after drying in a Zymark TurboVap evaporator (McKinley Scientific, Sparta, NJ, USA), the extracts were resuspended in 400 µL water/acetonitrile (50/50, v:v). OTA was detected by HPLC-DAD and LC-HRMS. Diode array detection (DAD) analysis was carried out using the ultimate 3000 HPLC system (ThermoFisher, Les Ulis, France) with a 150 x 2.0 mm Luna C18 (2) 5 µm column (Phenomenex, Torrance, CA, united states) at a flow rate of 0.2 mL/min. A gradient program was used with 0.2% acetic acid (eluent A) and acetonitrile (eluent B) under the following elution conditions: 15% B for the first 10 min, then % B increased to 50 over the next 20 min and kept at this value for 15 min; the initial conditions were restored over the next five minutes and maintained for a further 10 min. LC-HRMS detection was performed according to Hautbergue et al. (2017) using positive mode electrospray ionization (ESI+) with the following modifications: spray voltage +5.5 kV, sheath gas (N<sub>2</sub>) flow rate of 30 au (arbitrary units) and auxiliary gas (N<sub>2</sub>) flow rate of 10 au.

### **3. Results and discussion**

#### *3.1. Fungal occurrence in yerba mate*

A total of 15 yerba mate brands marketed in Brazil (two samples of each) were examined for fungal occurrence. All samples tested were positive for fungal contamination, and the fungal load per sample ranged from  $2.0 \times 10^2$  to  $1.6 \times 10^4$  CFU/g (Fig. 1). The analysis revealed that 33.3% of the samples exhibited contamination levels below  $1.0 \times 10^3$  CFU/g; 60.1% intermediate contamination levels, between  $1.0 \times 10^3$  and  $9.0 \times 10^3$  CFU/g, and two samples (IP2-A and IP2-B) exceeded the contamination limit ( $10^4$  CFU/g) recommended by the World Health Organization as safe for human consumption (WHO, 2007). These two samples came from the same manufacturer and the high fungal counts may indicate a fail during processing or a recontamination at some stage of storage, transportation or marketing, due to an increase in moisture content. This corroborates the findings of Vieira, Peres, Aquino and Pasqualotto (2010), who analyzed different brands of yerba mate and found that most samples showed substantial fungal growth, ranging from  $1.0 \times 10^1$  to  $4.9 \times 10^3$  CFU/g.



**Fig. 1.** Fungal contamination in yerba mate samples. **A)** Colony forming units (CFU/g) per sample (IP1-A to IP15-B) and occurrence (in %) of *Aspergillus* and other fungal genera per sample. **B)** Distribution of *Aspergillus* section in the total of isolated fungi (in %).

The *Aspergillus* genus was the most prevalent (78.5%, Fig.1A). Pérez, Collavino, Sansberro, Mroginski and Galdeano (2016) analyzed fresh leaves of *I. paraguariensis* and found that *Fusarium* was the predominant genus, with only low incidences of *Aspergillus*. This difference in the fungal community between fresh leaves and packaged yerba mate is not surprising, since processing is multi-stage, involving selection of the best leaves, blanching and drying at temperatures of up to 400 °C (Vieira, Peres, Aquino, & Pasqualotto, 2010). Although the end product is extremely dehydrated, contamination by xerophilic fungi can occur during storage or packaging. Efuntoye (1996) showed that the storage of herbs can influence the fungal community. Under post-harvest conditions *Aspergillus* and *Penicillium* tend to proliferate, rather than field fungi like *Fusarium*.

Bugno, Almodovar, Pereira, Pinto, and Sabino (2006) investigated the presence of fungal species in 63 different types of herbal remedies commonly used in Brazil (including *I. paraguariensis*) and highlighted the predominance of *Aspergillus* and *Penicillium* over other genera. Aiko and Mehta (2016) analyzed 38 kinds of herbs and spices marketed in China and found that *Aspergillus* and *Penicillium* were predominant in the samples examined.

In overall terms, the fungi belonging to *A. section Nigri* were predominant (76.5%, Fig.1B) and were found in all yerba mate samples examined herein (Supplementary Table 1). Castrillo, Horianski and Jerke (2013) also reported that black aspergilli were predominant in mate from Argentina. Similarly, other studies on herbal teas have also identified *A. section Nigri* as the most frequent fungal occurrence (Bokhari & Aly, 2013; Kosalec, Cvek, & Tomic, 2009; Mogensen, Varga, Thrane, & Frisvad, 2009). *A. section Flavi* and *A. section Circumdati* were also found in 70% (21/30) of samples examined herein, but represented only 2% of total fungal incidence (Fig. 1B).

The occurrence of fungi belonging to *A. section Nigri*, *A. section Flavi* and *A. section Circumdati* in yerba mate demands attention because of the risk of mycotoxin production. Among the species assigned to *A. section Nigri*, some *A. welwitschiae* and *A. niger* strains are fumonisin producers. Furthermore, some *A. welwitschiae*, *A. carbonarius*, *A. sclerotioniger* and *A. niger* strains are OTA producers (Varga, Baranyi, Chandrasekaran, Vágvölgyi, & Kocsubé, 2015). In *A. section Flavi* in particular, many species can produce aflatoxins, including *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. pseudocaelatus*, *A. novoparasiticus*, *A. bombycis*, *A. parvisclerotigenus*, *A. minisclerotigenes*, *A. arachidicola*, *A. mottae*, *A. sergii*, *A. transmontanensis*, *A. pseudotamarii*, *A. togoensis* and *A. korhogoensis* (Carvajal-Campos et al., 2017; Soares, Rodrigues, Peterson, Lima, & Venancio, 2012; Varga, Baranyi, Chandrasekaran, Vágvölgyi & Kocsubé, 2015). Among the twenty-seven species belonging to *A. section*

*Circumdati*, 12 produce large quantities of OTA: *A. affinis*, *A. cretensis*, *A. fresenii*, *A. muricatus*, *A. occultus*, *A. ochraceopetaliformis*, *A. ochraceus*, *A. pseudoelegans*, *A. pulvericola*, *A. roseoglobulosus*, *A. steynii* and *A. westerdijkiae*. A further eight species produce OTA inconsistently and/or in trace amounts: *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. persii*, *A. salwaensis*, *A. sesamicola*, *A. subramanianii*, *A. sclerotiorum* and *A. westlandensis* (Visagie et al., 2014).

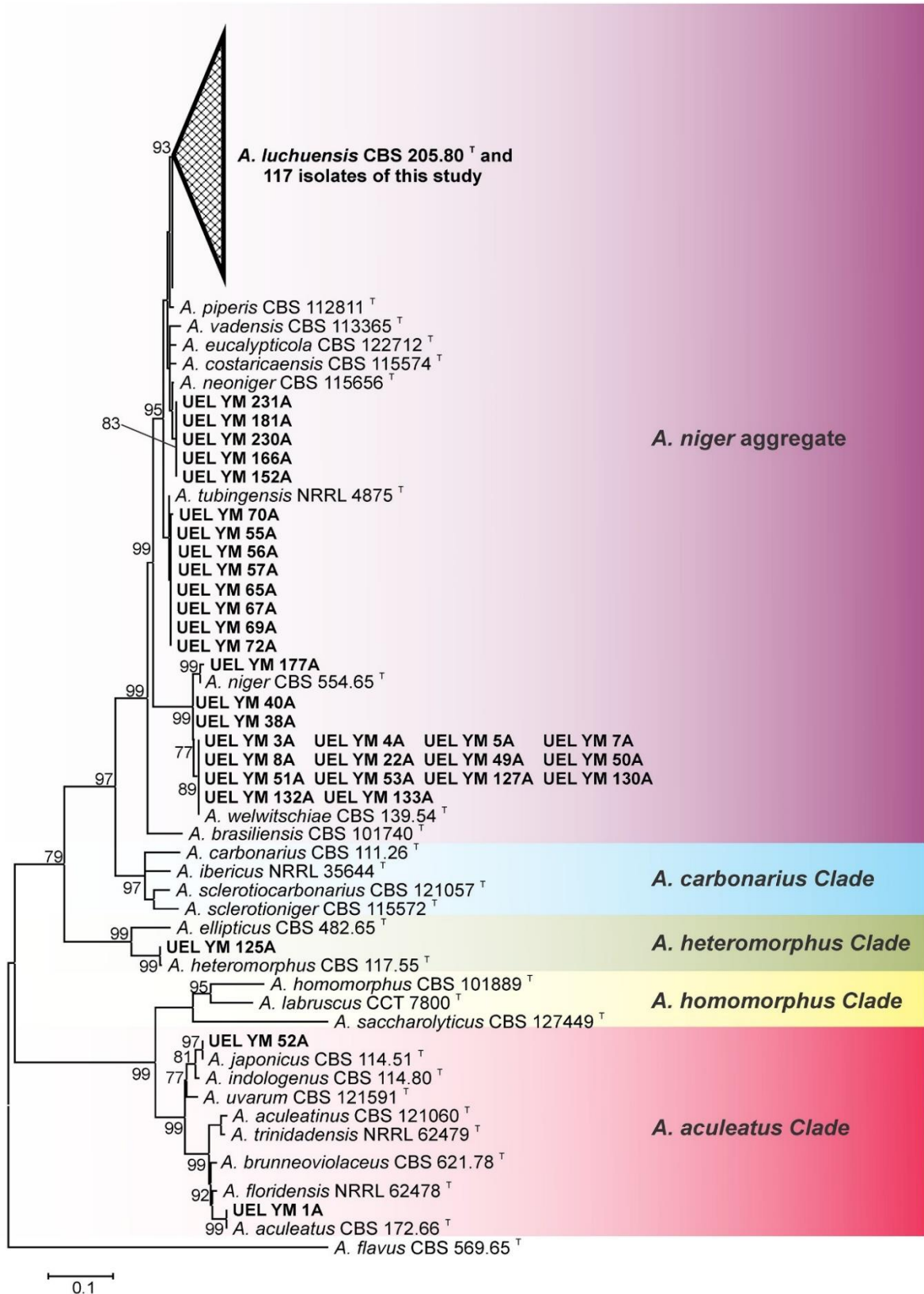
Mate is consumed within a sociocultural context and is part of the daily diet of Argentines, Uruguayans, and Brazilians (southern Brazil) (Bracesco, Sanchez, Contreras, Menini, & Gugliucci, 2011). In regions where this beverage is popular, average consumption *per capita* ranges from 1.265 L day<sup>-1</sup> to 6 L day<sup>-1</sup> (Barros et al., 2000). For this reason, identifying species of fungi occurring in yerba mate and their ability to produce mycotoxins is essential in order to assess the risk of human exposure to ochratoxins, fumonisins and aflatoxins.

### 3.2. Molecular identification

A total of 232 *Aspergillus* strains representing all the yerba mate samples analyzed herein was subjected to molecular identification. Phylogenetic analysis revealed the presence of at least 13 species belonging to four *Aspergillus* sections: *Nigri*, *Circumdati*, *Flavi* and *Cremeri*.

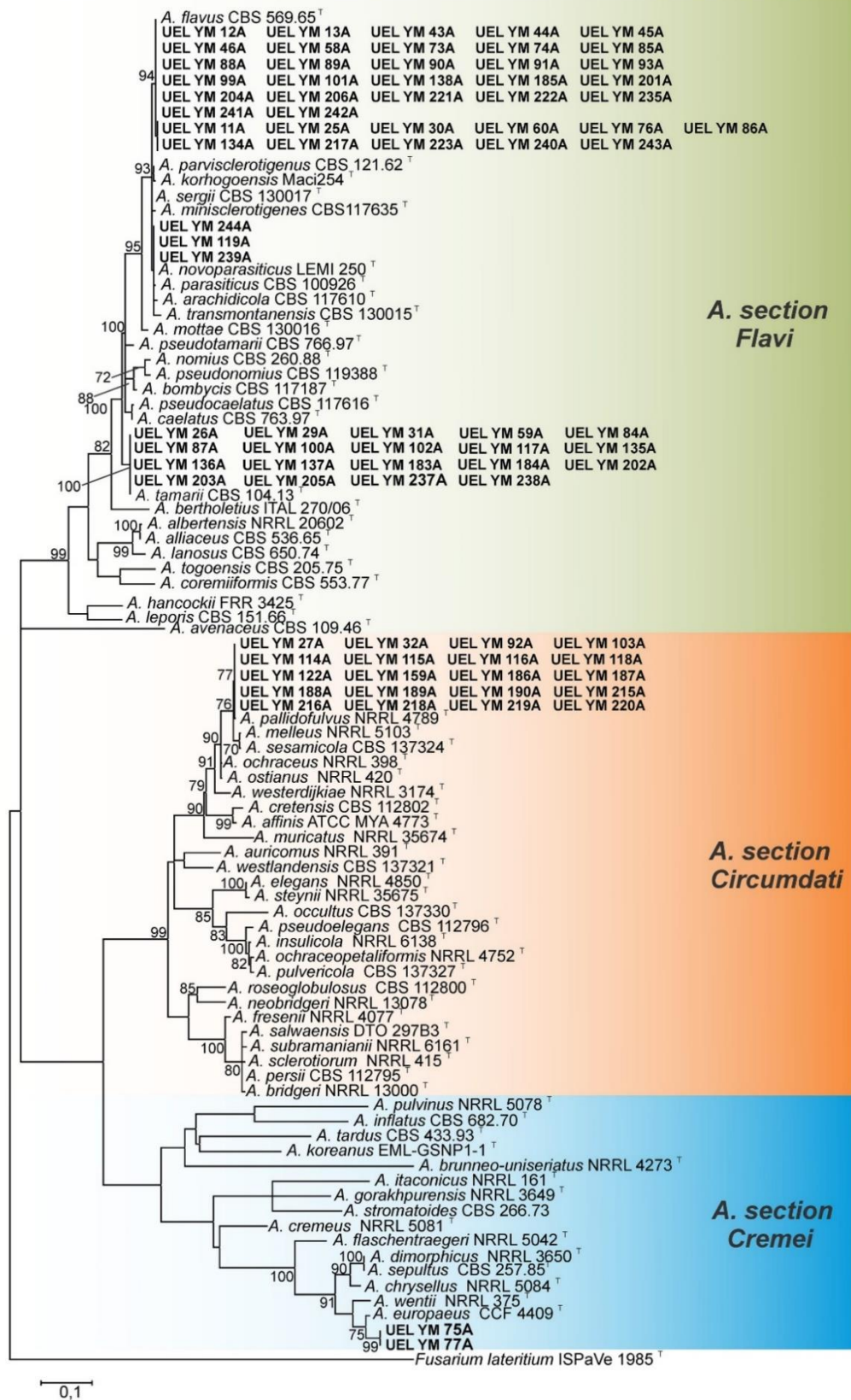
The following *A.* section *Nigri* species (Fig. 2) were found: *A. niger* ( $n= 3$ , GenBank accession nos. MK193877 to MK193879), *A. welwitschiae* ( $n= 14$ , GenBank accession nos. MK166190 to MK166203), *Aspergillus tubingensis* ( $n= 8$ , GenBank accession nos. MK166178 to MK166185), *Aspergillus neoniger* ( $n= 5$ , GenBank accession nos. MK166186 to MK166189), *Aspergillus heteromorphus* ( $n= 1$ , GenBank accession no. MK191021), *Aspergillus japonicus* ( $n= 1$ , GenBank accession no. MK191022), *Aspergillus aculeatus* ( $n= 1$ , GenBank accession no. MK191020) and *Aspergillus luchuensis* ( $n= 117$ , GenBank accession nos. MK166061 to MK166177).

Fortunately, *A. carbonarius* and *A. sclerotioniger*, both reported as ochratoxigenic species, were not found in our samples. *A. niger* and *A. welwitschiae* were found but only at low frequency. This corroborates the findings of Castrillo, Horiński and Jerke (2013), who also reported that these species were infrequent in Argentinian mate. *A. luchuensis* was preponderant in yerba mate but does not produce any toxins harmful to humans (Hong et al., 2013), and can be considered safe for use in food and beverage fermentation. *A. luchuensis* (*syn. Aspergillus acidus*) was also found to be prevalent in samples of Pu-erh tea (*Camellia sinensis*) analyzed by Haas et al. (2013) in South-western China.



**Fig. 2.** Maximum Likelihood tree based on the *CaM* gene showing the relationships between *Aspergillus* section *Nigri* species and isolates of yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Aspergillus flavus* is the outgroup. T superscript = type strain. Isolates from this study are in bold type.

The following *A. section Flavi* species were found (Fig. 3): *Aspergillus tamaris* ( $n= 19$ , GenBank accession nos. MK101396 to MK101414), *A. flavus* ( $n= 38$ , GenBank accession nos. MK101348 to MK101385) and *A. novoparasiticus* ( $n= 3$ , GenBank accession nos. MK101386 to MK101388). Our findings are corroborated by several studies reporting *A. flavus* as one of the main toxigenic species found in herbs, spices and teas (Aiko & Mehta, 2016; Bugno, Almodovar, Pereira, Pinto, & Sabino (2006); Halt, 1998; Rizzo, Vedoya, Maurutto, Haidukowski & Varsavsky, 2004; Zheng et al., 2017). *A. novoparasiticus* strains have been reported as aflatoxin B and G producers. This species was isolated for the first time from clinical sources (Goncalves et al., 2012) and later found in corn kernels, cassava and rice (Adjovi et al., 2014; Katsurayama et al., 2018; Viaro et al., 2017). We are the first to report the presence of this species in tea, infusions or medicinal herbs.



**Fig. 3.** Maximum Likelihood tree based on the *BenA* gene, showing the relationships between *A. section Flavi*, *A. section Circumdati* and *A. section Cremei* species and isolates

of yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Fusarium lateritium* is the outgroup. T superscript = type strain. Isolates from this study are in bold type.

In *A.* section *Circumdati* (Fig. 3), *A. pallidofulvus* ( $n= 20$ , GenBank accession nos. MK101415 to MK101434) was the only species found in yerba mate. It has been isolated in green coffee beans in India and has recently been assigned to *A.* section *Circumdati* by Visagie et al. (2014). *A. pallidofulvus* was also detected in human clinical specimens in India (Masih et al., 2016).

In *A.* section *Cremeri* (Fig.3), only *Aspergillus europaeus* ( $n= 2$ , GenBank accession nos. MK109911 to MK109912) was identified in yerba mate. This species, very recently described by Hubka et al. (2016), has been found in European soil samples. This is the first report of the occurrence of this species in food.

### 3.3. Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus* section *Nigri*

The *A. welwitschiae* ( $n= 14$ ) and *A. niger* ( $n= 3$ ) strains identified herein were analyzed for FB<sub>2</sub> production using high performance liquid chromatography (HPLC).

All *A. niger* strains were FB<sub>2</sub>-producing, whereas only two strains of *A. welwitschiae* were able to produce this mycotoxin (Table 1), the fumonisin producing strains were isolated from four yerba mate samples (IP2-B, IP3-B, IP4-A and IP11-A; Supplementary Table 1). These results corroborate previous results obtained by our group, confirming that *A. niger* has a larger number of fumonisin producing strains than *A. welwitschiae* (Massi et al., 2016).

**Table 1.** Mycotoxins produced by the *Aspergillus* strains isolated from yerba mate (number of positive strains/total number of tested strains).

<b>Mycotoxins</b>	<i>A. flavus</i>	<i>A. novoparasiticus</i>	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. pallidofulvus</i>
Aflatoxins B <sub>1</sub> and B <sub>2</sub>	23/38	3/3	N.T.	N.T.	N.T.
Aflatoxins G <sub>1</sub> and G <sub>2</sub>	0/38	3/3	N.T.	N.T.	N.T.
Fumonisin B <sub>2</sub>	N.T	N.T	2/14	3/3	N.T.
Ochratoxin A	N.T	N.T	1/14	0/3	0/10

N.T. = not tested. Limit of detection ( $\mu\text{g/Kg}$ ) for: aflatoxins (0.25); ochratoxin A (0.71); FB<sub>2</sub> (80).

### 3.4. Aflatoxin production by *Aspergillus* section *Flavi*

Approximately 60% (23/38) of the *A. flavus* strains produced aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in culture (Table 1), and were isolated from 12 yerba mate samples (IP1-A, IP3-A, IP3-B, IP4-B, IP5-A, IP5-B, IP7-A, IP12-A, IP12-B, IP13-B, IP14-A, IP14-B; Supplementary Table 1). These finds are in line with those of Rajeshwari and Raveesha (2016) who reported that around 60% of the *A. flavus* strains isolated from herbal remedy raw materials were able to produce aflatoxins.

All three strains of *A. novoparasiticus* were able to produce aflatoxins B (B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>) and G (G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>) (Table 1), corroborating previous studies (Varga, Baranyi, Chandrasekaran, Vágvölgyi, & Kocsubé, 2015). These aflatoxigenic strains of *A. novoparasiticus* were isolated from samples IP6-B, IP14-A and IP14-B; Supplementary Table 1)

### 3.5. OTA production by *Aspergillus* section *Nigri* and *Aspergillus* section *Circumdati*

All *A. welwitschiae* ( $n=14$ ), *A. niger* ( $n=3$ ) and *A. pallidofulvus* ( $n=20$ ) strains isolated in the present study were analyzed by HPLC-FLD for OTA production in culture. No *A. niger* strains and only one *A. welwitschiae* strain (isolated from the sample IP1-A) were found to produce OTA (Table 1; Supplementary Table 1). This is not surprising, since the number of OTA-producing strains of *A. niger* and *A. welwitschiae* isolated from different substrates has been reported as generally limited (Battilani, Giorni, Bertuzzi, Formenti, & Pietri, 2006; Chiotta et al., 2011; Chiotta, Ponsone, Sosa, Combina, & Chulze, 2013; Palumbo & O'Keeffe, 2013). During their studies of mycotoxin production by *A. section Nigri* in herbal teas available on the Swiss market, Storari, Dennert, Bigler, Gessler and Brogginini (2012) found that only 7% of *A. niger* and none of the *A. welwitschiae* strains could produce OTA. *A. niger* and *A. welwitschiae* strains harboring the OTA biosynthetic genetic cluster (essential for the production of OTA) in their genomes are reported as infrequent (Massi et al., 2016; Susca et al., 2016).

The HPLC-FLD results were not conclusive regarding OTA production by *A. pallidofulvus* strains, due to the presence of different compounds impairing peaks separation.

According to the literature, among the twenty-seven species accepted as belonging to *A. section Circumdati*, twelve produce large amounts of OTA while a further eight species produce OTA inconsistently and/or in trace amounts. Visagie et al. (2014) examined several strains of the species purported to belong to section *Circumdati* and produced a monographic treatment on the section. Seven new species were described, including *A. pallidofulvus*. The authors examined four *A. pallidofulvus* strains for OTA production and all were reported unable to produce this mycotoxin.

In order to shed more light on the inability of *A. pallidofulvus* to produce OTA, we analyzed 10 strains in YES, CYA and MEA media at 25 °C, using two detection approaches (HPLC-DAD and LC-HRMS) and no trace of OTA was detected in any of the cultures, confirming and extending the results previously reported (Visagie et al., 2014).

Interestingly, *A. ochraceus*, *A. westerdjikiae*, *A. ostianus*, *A. melleus* and *A. sesamicola*, belonging to the same clade as *A. pallidofulvus*, harbor OTA-producing strains (Visagie et al., 2014). Further investigations are required regarding the presence of some ochratoxigenic strains within this species, and the presence/absence of the OTA biosynthetic gene cluster.

#### 4. Conclusions

*A.* section *Nigri* was the most frequent fungal group in yerba mate, and *A. luchuensis* the predominant species found. Although toxigenic species were found in yerba mate, the incidence was low. The occurrence of *A. europaeus*, *A. novoparasiticus* and *A. pallidofulvus* in herbs was described for the first time. Under the conditions investigated, it was confirmed that, *A. pallidofulvus* does not harbor ochratoxigenic strains.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank the following Brazilian institutions: Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, research fellowship awarded to MHPF and MHT) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES, scholarship awarded to JJS) and International Cooperation Program CAPES/COFECUB).

#### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### 5. References

- Adjovi, Y. C. S., Bailly, S., Gnonlonfin, B. J. G., Tadriss, S., Querin, A., Sanni, A., ... Bailly, J. D. (2014). Analysis of the contrast between natural occurrence of toxigenic Aspergilli of the *Flavi* section and aflatoxin B1 in cassava. *Food Microbiology*, 38, 151–159.
- Aiko, V., & Mehta, A. (2016). Prevalence of toxigenic fungi in common medicinal herbs and spices in India. *3 Biotech*, 6(2), 1–10.
- Barros, S. G. S., Ghisolfi, E. S., Luz, L. P., Barlem, G. G., Vidal, R. M., Wolff, F. H., ... Prolla, J. C. (2000). Mate (chimarrão) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. *Arquivos de Gastroenterologia*, 37(1), 25-30.

- Battilani, P., Giorni, P., Bertuzzi, T., Formenti, S., & Pietri, A. (2006). Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, *111*, 53-60.
- Bokhari, F. M., & Aly, M. M. (2013). Unexpected hazard due to fumonisins contaminating herbal teas used traditionally by Saudi people. *African Journal of Microbiology Research*, *7*, 35-40.
- Bracesco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T., & Gugliucci, A. (2011). Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *Journal of Ethnopharmacology*, *136*(3), 378-384.
- Bugno, A., Almodovar, A. A. B., Pereira, T. C., Pinto, T. de J. A., & Sabino, M. (2006). Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Brazilian Journal of Microbiology*, *37*, 47-51
- Burris, K. P., Davidson, P. M., Stewart, C. N. J., Zivanovic, S., & Harte, F. M. (2012). Aqueous extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) as a natural antimicrobial against *Escherichia coli* O157:H7 in a microbiological medium and pH 6.0 apple juice. *Journal of Food Protection*, *75*(4), 753-757.
- Carvajal-Campos, A., Manizan, A. L., Tadrist, S., Akaki, D. K., Koffi-Nevry, R., Moore, G. G., ... Puel, O. (2017). *Aspergillus korhogoensis*, a novel aflatoxin producing species from the Côte d'Ivoire. *Toxins*, *9*(11), 1-22.
- Castrillo, M. L., Horianski, M. A., & Jerke, G. (2013). Aislamiento de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* en la yerba mate comercializada en Posadas (Misiones, Argentina) y evaluación de su potencial ocratoxigénico. *Revista Argentina de Microbiología*, *45*, 110-113.
- Chiotta, M. L., Ponsone, M. L., Sosa, D. M., Combina, M., & Chulze, S. N. (2013). Biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentinian vineyards and ochratoxin A contamination. *Food Microbiology*, *36*(2), 182-190.
- Chiotta, M. L., Susca, A., Stea, G., Mulè, G., Perrone, G., Logrieco, A., & Chulze, S. N. (2011). Phylogenetic characterization and ochratoxin A - fumonisin profile of black *Aspergillus* isolated from grapes in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, *149*(2), 171-176.
- Deneo-Pellegrini, H., De Stefani, E., Boffetta, P., Ronco, A. L., Acosta, G., Correa, P., & Mendilaharsu, M. (2013). Mate consumption and risk of oral cancer: Case-control study in Uruguay. *Head & Neck*, *35*(8), 1091-1095.
- Efuntoye, M. O. (1996). Fungi associated with herbal drug plants during storage. *Mycopathologia*, *136*(2), 115-118.

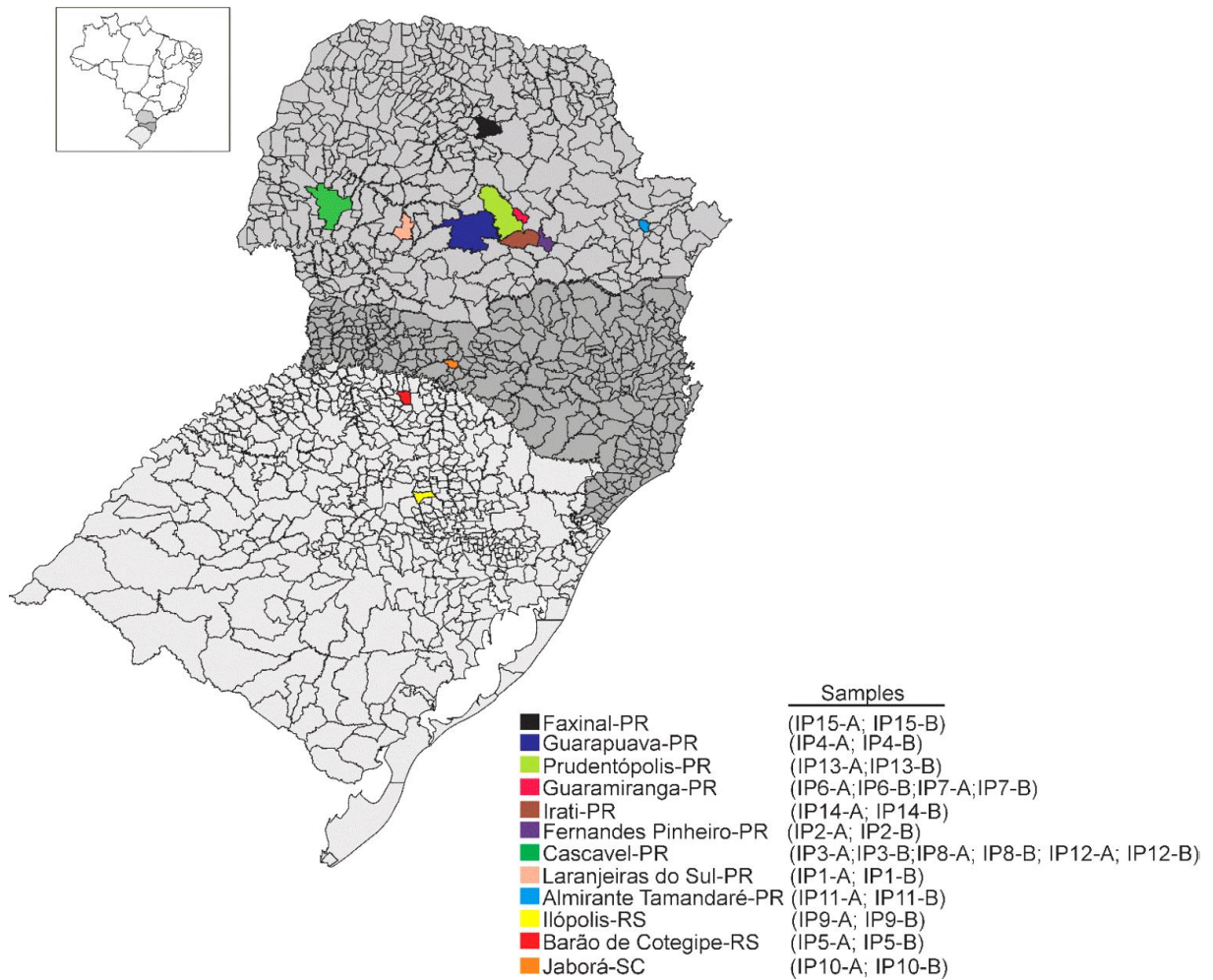
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations- Statistics. Trade of crops and livestock products: maté 2000-2013. (2018). Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/TP/visualize>. (Accessed on 20 March 2018).
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O., & Thrane, U. (2007). Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 9727–9732.
- Gambero, A., & Ribeiro, M. L. (2015). The positive effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in obesity. *Nutrients*, *7*(2), 730–750.
- Garcia Londono, V. A., Reynoso, M., & Resnik, S. (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) from the Argentinean market. *Food Additives and Contaminants- Part B*, *7*, 247–253.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*, 1323–1330.
- Goncalves, S. S., Stchigel, A. M., Cano, J. F., Godoy-Martinez, P. C., Colombo, A. L., & Guarro, J. (2012). *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. *Medical Mycology*, *50*(2), 152–160.
- Haas, D., Pfeifer, B., Reiterich, C., Partenheimer, R., Reck, B., & Buzina, W. (2013). Identification and quantification of fungi and mycotoxins from Pu-erh tea. *International Journal of Food Microbiology*, *166*(2), 316–322.
- Halt, M. (1998). Medicinal, moulds and mycotoxins in herb tea and Plants. *European Journal of Epidemiology*, *14*, 269–274.
- Hautbergue, T., Puel, O., Tadrist, S., Meneghetti, L., Pean, M., Delaforge, M., ... Jamin, E. L. (2017). Evidencing 98 secondary metabolites of *Penicillium verrucosum* using substrate isotopic labeling and high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *1071*, 29–43.
- Heck, C. I., & de Mejia, E. G. (2007). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations, *Journal of Food Science*, *72*, 138-151.
- Hong, S. B., Cho, H. S., Shin, H. D., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2006). Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*, 477–486.
- Hong, S. B., Lee, M., Kim, D. H., Varga, J., Frisvad, J. C., Perrone, G., ... Samson, R. A. (2013). *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia.

- PLoS ONE*, 8(5), e63769.
- Hubka, V., Nováková, A., Samson, R. A., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Sklenář, F., ... Kolařík, M. (2016). *Aspergillus europaeus* sp. nov., a widely distributed soil-borne species related to *A. wentii* (section *Cremeri*). *Plant Systematics and Evolution*, 302(6), 641–650.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1993. Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans. In: Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. vol. 56. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, pp. 489.
- Katsurayama, A. M., Martins, L. M., Iamanaka, B. T., Fungaro, M. H. P., Silva, J. J., Frisvad, J. C., ... Taniwaki, M. H. (2018). Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Brazilian rice: From field to market. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 213–221.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120.
- Kosalec, I., Cvek, J., & Tomic, S. (2009). Contaminants of medicinal herbs and herbal products. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 60, 485–501.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.
- Lopes, A. B., Metzdorf, M., Metzdorf, L., Sousa, M. P. R., Kavalco, C., Etemadi, A., ... Fagundes, R. B. (2018). Urinary concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in mate drinkers in Rio Grande do Sul, Brazil. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 27, 331–337.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237.
- Masih, A., Singh, P. K., Kathuria, S., Agarwal, K., Meis, J. F., & Chowdhary, A. (2016). Identification by molecular methods and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and antifungal susceptibility profiles of clinically significant rare *Aspergillus* species in a referral chest hospital in Delhi, India. *Journal of Clinical Microbiology*, 54, 2354-2364.
- Massi, F. P., Sartori, D., de Souza Ferranti, L., Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., Vieira, M. L. C., & Fungaro, M. H. P. (2016). Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and

- Aspergillus welwitschiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 221, 19–28.
- Mogensen, J. M., Varga, J., Thrane, U., & Frisvad, J. C. (2009). *Aspergillus acidus* from Puerh tea and black tea does not produce ochratoxin A and fumonisin B2. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2–3), 141–144.
- Palumbo, J. D., & O’Keeffe, T. L. (2013). Distribution and mycotoxigenic potential of *Aspergillus* section *Nigri* species in naturally contaminated almonds. *Journal of Food Protection*, 76, 702–706.
- Pérez, M. L., Collavino, M. M., Sansberro, P. A., Mroginski, L. A., & Galdeano, E. (2016). Diversity of endophytic fungal and bacterial communities in *Ilex paraguariensis* grown under field conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(4), 1–15.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D., (2009). *Fungi and Food Spoilage (3th ed)*, London: Springer US, (519 pp.)
- Rajeshwari, P., & Raveesha, K. A. (2016). Mycological analysis and aflatoxin B 1 contaminant estimation of herbal drug raw materials. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13(5), 123–131.
- Rizzo, I., Vedoya, G., Maurutto, S., Haidukowski, M., & Varsavsky, E. (2004). Assessment of toxigenic fungi on Argentinean medicinal herbs. *Microbiological Research*, 159(2), 113–120.
- Shephard, G. S., Sydenham, E. W., Thiel, P. G., & Gelderblom, W. C. A. (1990). Quantitative determination of fumonisin B1 and B2 by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 13 (10), 2077–2087.
- Soares, C., Rodrigues, P., Peterson, S. W., Lima, N., & Venancio, A. (2012). Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. *Mycologia*, 104, 682–697.
- Storari, M., Dennert, F. G., Bigler, L., Gessler, C., & Brogini, G. A. L. (2012). Assessment of the ochratoxin A production ability of *Aspergillus tubingensis*. *Food Additives and Contaminants- Part A*, 29, 1450–1454.
- Susca, A., Proctor, R. H., Morelli, M., Haidukowski, M., Gallo, A., Logrieco, A. F., & Moretti, A. (2016). Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1412.
- Thea, A. E., Ferreira, D., Brumovsky, L. A., & Schmalko, M. E. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil) traditional infusions (mate and tereré). *Food Control*, 60, 215–220.

- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Varga, J., Baranyi, N., Chandrasekaran, M., Vágvölgyi, C., & Kocsubé, S. (2015). Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: An update. *Acta Biologica Szegediensis*, 59(2), 151–167.
- Viaro, H. P., da Silva, J. J., de Souza Ferranti, L., Bordini, J. G., Massi, F. P., & Fungaro, M. H. P. (2017). The first report of *A. novoparasiticus*, *A. arachidicola* and *A. pseudocaelatus* in Brazilian corn kernels. *International Journal of Food Microbiology*, 243, 46–51. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.002>
- Vieira, N. O., Peres, A., Aquino, V. R., & Pasqualotto, A. C. (2010). Drinking yerba mate infusion: A potential risk factor for invasive fungal diseases? *Transplant Infectious Disease*, 12(6), 565–569.
- Visagie, C. M., Varga, J., Houbraken, J., Meijer, M., Kocsubé, S., Yilmaz, N., ... Samson, R. A. (2014). Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Studies in Mycology*, 78(1), 1–61.
- WHO, World Health Organization. (2007). Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO.
- Zheng, R., Wang, W., Tan, J., Xu, H., Zhan, R., & Chen, W. (2017). An investigation of fungal contamination on the surface of medicinal herbs in China. *Chinese Medicine*, 12(1), 1–8.

## Supplementary archives



**Supplementary Figure 1.** Geographical origin of the samples of yerba mate (Chimarrão). The colors represent the cities where the samples were produced.

**Supplementary Table 1.** Distribution of the strains analyzed for the production of mycotoxins (fumonisin B<sub>2</sub>, aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, and ochratoxin A), according to thirty samples of yerba mate and their origins.

Samples	<i>Section Nigri</i>		<i>Section Flavi</i>		<i>Section Circumdati</i>	Origin
	<i>A. niger</i>	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. novoparasiticus</i>	<i>A. pallidofulvus</i>	
IP1-A	*	1(B) 3(E)	2(C) 1(E)	*	*	Laranjeiras do Sul-PR
IP1-B	*	1(E)	*	*	*	Laranjeiras do Sul-PR
IP2-A	*	*	2(E)	*	1(E)	Fernandes Pinheiro-PR
IP2-B	*	1(A)	2(E)	*	1(E)	Fernandes Pinheiro-PR
IP3-A	*	*	4(C)	*	*	Cascavel-PR
IP3-B	2(A)	*	4(C)	*	*	Cascavel-PR
IP4-A	*	1(A) 2(E)	1(E)	*	1(E)	Guarapuava-PR
IP4-B	*	1(E)	2(C)	*	*	Guarapuava-PR
IP5-A	*	*	2(C) 1(E)	*	*	Barão de Cotegipe-RS
IP5-B	*	*	1(C) 1(E)	*	1(E)	Barão de Cotegipe-RS
IP6-A	*	*	*	*	4(E)	Guaramiranga-PR
IP6-B	*	*	*	1 (C;D)	1E	Guaramiranga-PR
IP7-A	*	1(E)	1(C) 1(E)	*	*	Guaramiranga-PR
IP7-B	*	3(E)	*	*	*	Guaramiranga-PR
IP8-A	*	*	*	*	*	Cascavel-PR
IP8-B	*	*	*	*	*	Cascavel-PR
IP9-A	*	*	*	*	1E	Ilópolis-RS
IP9-B	*	*	*	*	*	Ilópolis-RS
IP10-A	*	*	*	*	*	Jaborá-SC
IP10-B	*	*	*	*	*	Jaborá-SC
IP11-A	1(A)	*	1(E)	*	2(E)	Almirante Tamandaré-PR
IP11-B	*	*	*	*	3(E)	Almirante Tamandaré-PR
IP12-A	*	*	1(C)	*	*	Cascavel-PR
IP12-B	*	*	1(C) 1(E)	*	*	Cascavel-PR
IP13-A	*	*	1(E)	*	4(E)	Prudentópolis-PR
IP13-B	*	*	2(C) 1(E)	*	1(E)	Prudentópolis-PR
IP14-A	*	*	1(C)	1 (C; D)	*	Irati-PR
IP14-B	*	*	2(C) 2(E)	1 (C;D)	*	Irati-PR
IP15-A	*	*	*	*	*	Faxinal -PR
IP15-B	*	*	*	*	*	Faxinal -PR

(A)= Fumonisin B<sub>2</sub> producer; (B)= Ochratoxin A producer; (C)= Aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> producers; (d)= Aflatoxins G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> producers; (E)= Strain non-toxigenic; \*=Species absent.

**Artigo científico II:***4.2 Phylogenetic species delimitation unravels a new species in Aspergillus section Nigri: Aspergillus paraniger sp. nov.***Abstract**

Morphological approaches do not perform well for the identification of *A. niger* aggregate species, one of the most important subgroups of species for food mycology and biotechnology. At present, gene sequences are mandatory to establish the taxonomic status of this fungal subgroup. Among *A. niger* aggregate strains isolated from different Brazilian foodstuffs the species belonging to the *A. niger* clade are prevalent. The objective of this study was to investigate the genetic diversity of the *A. niger* clade. Firstly, we investigated the molecular diversity using calmodulin gene sequences of approximately 700 accessions belonging to this clade. Based on *CaM* sequences, 8 haplotypes were clearly identified as *A. niger* ( $n= 247$ ), and 17 were identified as *A. welwitschiae* ( $n= 403$ ). However, *CaM* sequences did not provide definitive species identities for six haplotypes, representing 45 strains. To elucidate the taxonomic position of these haplotypes two other *loci*, part of the beta-tubulin gene and part of the RNA polymerase II gene, were sequenced and used to perform an analysis of Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition. In addition to *A. niger* and *A. welwitschiae*, this analysis enabled the recognition of 2 new phylogenetic species. The strains representing one of the new phylogenetic species were found morphologically distinct from the strains representing the remaining phylogenetic species. When the results of Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition and morphological evidences are jointly considered, our study reveals a new species in *Aspergillus* subgenus *Circumdati* section *Nigri* (described as *Aspergillus paraniger*).

**Keywords:** *Aspergillus niger* clade, GCPSR, genealogical concordance, genetic diversity

## Introduction

The black aspergilli are among the most important fungal groups in the genus *Aspergillus*. These aspergilli include species causing food spoilage and mycotoxin production, often being reported as the third most common *Aspergillus* spp. associated with invasive human disease and aspergillomas (Howard et al., 2011; Varga et al., 2014). Conversely, this fungal group includes several of the most industrially important species. For instance, *A. niger* is used in the production of various enzymes and organic acids, including 99% of the citric acid produced worldwide (1.4 million tons per year, see Park et al., 2017).

Taxonomically, black aspergilli are classified as *Aspergillus* subgenus *Circumdati* section *Nigri*, but traditional morphological approaches do not perform well for the identification of all species. The main difficulties are related to the identification of the cryptic species (*i.e.*, morphologically similar species). Currently, gene sequence analysis are necessary to establish the taxonomic status of this section. The rDNA-ITS region, which is the official DNA barcode for fungi, is too conserved for distinguishing the species of the *Aspergillus* section *Nigri*; therefore, the calmodulin (*CaM*) gene sequence has been recommended as a secondary barcoding marker (Raja et al., 2017; Samson et al., 2014).

At present, in light of molecular phylogeny, 27 species are included in section *Nigri* which (Fungaro et al., 2017; Samson et al., 2014), in turn, is split into seven clades: *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus* and *A. aculeatus*. The species *A. costaricaensis*, *A. luchuensis*, *A. neoniger*, *A. piperis*, *A. tubingensis*, *A. eucalypticola* and *A. vadensis* (clade *A. tubingensis*), *A. niger* and *A. welwitschiae* (*A. niger* clade) and *A. brasiliensis* (*A. brasiliensis* clade) are morphologically highly similar and have been generally called *Aspergillus niger* aggregate (Samson et al., 2014). Consequently, it is imperative to provide additional data for their correct identification.

The species assigned to the *A. niger* clade overlap in their morphological and physiological traits, but the phylogeny based on the *CaM* sequence data provides, in general, definitive species identification (Samson et al., 2014). During the last 10 years, our research group has isolated a large number of *A. niger* aggregate strains from different Brazilian foodstuffs, in which species belonging to the *A. niger* clade are prevalent. The great majority of our isolates were identified as *A. niger* or *A. welwitschiae*, but the identity of certain isolates remained ambiguous.

This led us to investigate the molecular diversity at the gene level and the phylogenetic relationships among approximately 700 sequences belonging to the *A. niger* clade to determine whether *A. welwitschiae* or *A. niger* harbours distinct evolutionary lineages/species.

## Materials and Methods

- **Origin of *CaM* sequences**

A total of 403 strains belonging to the *A. niger* clade used in the present study were previously isolated from Brazilian foodstuffs (coffee beans, yerba mate, onion bulbs, grape berries, brazil nuts) and identified by means of multiplex PCR or partial calmodulin gene sequencing by our research group (Ferracin et al., 2009; Ferranti et al., 2018, 2017; Magnani et al., 2005; Massi et al., 2016; Sartori et al., 2006; Taniwaki et al., 2003).

A portion of the *CaM* gene was amplified and sequenced for all strains in both directions, forward and reverse, using the primer-pair designed by Hong et al. (2006) with amplification conditions shown in Table 1, and sequencing protocol described in Taniwaki et al. (2012). With the *CaM* sequences obtained, we created the “Brazilian Dataset of *CaM* Sequences”.

Additionally, using the keywords calmodulin, *Aspergillus niger*, *A. welwitschiae*, *A. awamori*, *A. foetidus*, and *A. lacticoffeatus*, 424 *CaM* sequences belonging to the *A. niger* clade were retrieved from GenBank (12-07-2018). From this total, 132 *CaM* sequences were removed because they were very short or of low-quality, or because they represent deposits with obsolete definitions. With the remaining sequences ( $n= 292$ ), we created the “GenBank Dataset of *CaM* Sequences.”

The Brazilian Dataset ( $n= 403$ ) plus the GenBank Dataset ( $n= 292$ ) consisted of 695 *CaM* gene sequences (Supplementary Table 1).

**Table 1.** PCR conditions for *CaM*, *BenA* and *RPB2* loci.

		35 Cicles				
		1 min	45 s		1 min*	5 min
Primers		Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension
Thermal program	<i>CaM</i> (Hong et al. (2006))	95 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C
	<i>BenA</i> (Glass and Donaldson, 1995)	95 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C
	<i>RPB2</i> (this study)	95 °C	94 °C	58 °C	72 °C	72 °C
PCR conditions -Final volume 25 µL	<i>Taq</i> DNA polymerase	1 U				
	PCR buffer	1x				
	Primer	0.4 µM -each primer				
	dNTP	0.2 Mm				
	MgCl <sub>2</sub>	1.5 Mm				
	DNA template	10 ng				

\*1 min and 30 s for *RPB2* locus

- **Diversity and Phylogenetic relationships of *CaM* haplotypes**

All sequences (the Brazilian Dataset of *CaM* Sequences and the GenBank Dataset of *CaM* Sequences) were aligned using MUSCLE (Edgar, 2004) in the MEGA 7 computational package (Kumar et al., 2016).

The haplotype identification, haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) were performed using the DNA sp5.10 computational package (Rozas et al., 2017). To illustrate the relationship between haplotypes, a median-joining haplotype network (Bandelt et al., 1999) for the *CaM* locus was constructed in the program Splitstree 4 (Huson and Bryant, 2006).

The phylogenetic relationships among the haplotypes were first examined using *CaM locus* sequences. DNA sequences of representatives of each haplotype recognized here were aligned using MUSCLE with homologous sequences from holotype/neotype strains of *A. section Nigri* biseriate species (*A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. tubingensis*, *A. costaricaensis*, *A. eucalypticola*, *A. piperis*, *A. vadensis*, *A. neoniger*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. sclerotioniger*, *A. sclerotiocarbonarius* and *A. ibericus*). The phylogenetic tree was reconstructed using a maximum likelihood method with the Kimura-2-parameter model (Kimura, 1980) (previously calculated in MEGA7 and jModelTest2) with discrete Gamma distribution and invariant sites (G+I) with Subtree Pruning Regrafting (SPR level 5) and a very weak branch swap filter. Sequence identity was also confirmed using a GenBank BLASTn search (Altschul et al., 1990).

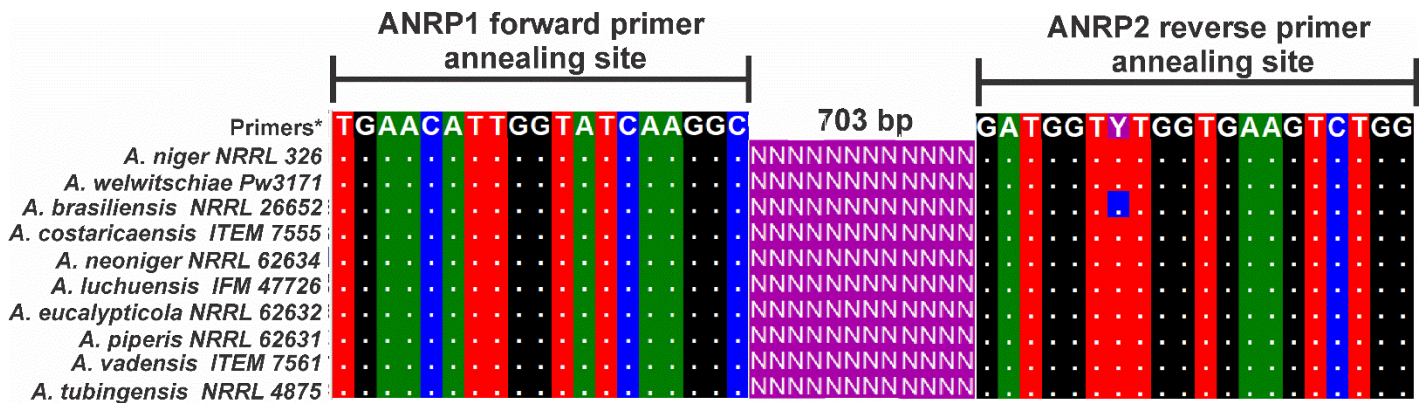
- **Sequencing beta-tubulin (*BenA*) and RNA polymerase II (*RPB2*) genes**

To investigate and elucidate the taxonomic position of the haplotypes identified in the present study, two other *loci*, part of the beta-tubulin (*BenA*) and part of the RNA polymerase II (*RPB2*) genes, both considered alternative markers for *A. section Nigri* (Samson et al., 2014) were sequenced and used to compose the Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSR) analysis. Up to 10 strains (when available) were selected for each haplotype, present in the Brazilian dataset.

The primers used for the amplification of the *BenA* gene were those described by Glass and Donaldson (Glass and Donaldson, 1995) with amplification conditions shown in Table 1. The sequencing protocol was the same as that used by Taniwaki et al. (2012).

The primer-pair used for the amplification of the *RPB2* gene was designed in the present study. Primer design involved the recovery of *RPB2* gene sequences from all species of the *A. niger* aggregate available in GenBank, the alignment of the sequences using MUSCLE in MEGA 7, and a visual search for regions conserved within and between species. The melting temperature, the formation of secondary structures and other parameters were analysed *in silico* using Oligoanalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/Analyzer/Home/Instructions>). The primer sequences and the the segment of the *RPB2* gene ( $\cong$  720 bp) are shown in Fig 1. PCR amplification was performed according to the conditions shown in Table 1. All PCR products were purified and sequenced, in forward and reverse directions, on an ABI 3500 XL genetic analyser.

**Fig. 1.** Alignment of partial *RPB2* gene sequences of *A. niger* aggregate. The boxes marked by arrows indicate the annealing site of the ANRP primer pair. \* ANRP1-F or ANRP2-R designed in this study.



- **Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition – GCPSR**

Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSR) is a practical approach to Phylogenetic Species Recognition (PSR). The GCPSR protocol adopted in this study was that found in Dettman et al. (2003). Sequence data of three *loci* (*CaM*, *BenA* and *RPB2*) were analysed individually and in combination.

Initially, we recognized the independent evolutionary lineages (IELs) based on the criteria of genealogical concordance and genealogical non-discordance (Dettman et al., 2003). According to the criterion of genealogical concordance, a clade must be present in most of the phylogenies analysed, that is, when analysing the phylogeny of each gene tree separately, the evolutionary lineage must be consistent in most of them, regardless of support levels (Bootstraps, BP or Posterior Probabilities, PP).

For the application of the genealogical concordance criterion, maximum parsimony (MP) and Bayesian inference (BI) trees were constructed for each *locus*, individually. The alignments were performed using MUSCLE in MEGA 7. The maximum parsimony trees based on these sequence alignments were created using MEGA 7. The heuristic search option with 1,000 bootstraps and Tree Bisection Reconnection (TBR) branch swapping were used to infer the most parsimonious trees, and a Majority-Rule Consensus (MRC 50%) was generated (Margush and McMorris, 1981).

A Bayesian Inference (BI) analysis was conducted in MrBayes 3.2.3 (Ronquist et al., 2012). The most suitable model of sequence evolution for each dataset was selected based on the lowest Akaike Information Criterion (AIC) value in jModeltest2 (Darriba et al., 2012). For BI, the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algorithm was run for  $5 \times 10^6$  generations with a

sample frequency of 100 and with 25% of trees removed for burn-in. Convergence diagnostics were monitored based on standard deviations of frequencies below 0.01. The consensus tree topology (MRC 50%) and the PP for the nodes were visualized using FigTree version 1.4.3 (<https://goo.gl/4Egf1P>).

According to the criterion of genealogical non-discordance, a clade can be considered to be an IEL if it is statistically supported (BS and PP) in at least one phylogeny and is not contradicted at the same level of support by another *locus*. The identification of these clades is done through analysis of a semi-strict consensus tree combining the phylogenies of all analysed *loci*. Dettman et al. (2003) stipulated an arbitrary value of statistical support as 70% for BP values and 0.95 for PP.

For the application of the criterion of genealogical non-discordance, semi-strict consensus trees (MP and BI) were constructed. The semi-strict consensus trees were constructed in the PAUP 4.0 (Miller et al., 2010) based on the phylogenies of the three *loci* analysed.

The framing on one of the two criteria (genealogical concordance/non-discordance) satisfies the condition for the recognition of an IEL. To determine an IEL as a phylogenetic species, we used the criteria of genetic differentiation and exhaustive subdivision (Dettman et al., 2003).

In genetic differentiation, minor tip clades recognized as IELs must be relatively distinct and well-differentiated to avoid minor tip clades being recognized as phylogenetic species. In the exhaustive subdivision, all individuals must be assigned to a phylogenetic species. Therefore, if an individual was not included within an IEL, we collapsed this clade to the adjacent node, this was done hierarchically until all the individuals were allocated within an IEL and the rankings possibilities are exhausted. The final groups were recognized as phylogenetic species.

- **Random Amplified Length Polymorphism (RAPD)**

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis was applied to four phylogenetic species (7 strains representing each phylogenetic species). DNA amplifications were carried out using six arbitrary primers (OPAM02, OPAM07, OPAM10, OPAM11, OPAM13 and OPX11) in a Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA). The conditions of the reactions were the same as those described in Fungaro et al. (1996). Amplified fragments were scored 1 for the presence and 0 for the absence in each strain. The program

Ntsys-PC was used to obtain a similarity matrix using a Dice coefficient and a dendrogram with the UPGMA method. The allele frequencies of the sets of strains were estimated and submitted to pairwise  $\phi_{st}$  analysis using Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier and Lischer, 2010).

Bayesian clustering was also used to assess genetic structuring of fungal groups using the program Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). The number of clusters ( $K$ ) was estimated using the admixture ancestral model, with  $K$  ranging from 1 to 8. Twenty independent runs of  $10^5$  MCMC generations with  $2 \times 10^4$  generations of “burn-in” were used for each value of  $K$ . To interpret the number of population clusters  $\Delta K$  (Evanno et al., 2005) statistics built into the Structure harvester (Earl and vonHoldt, 2012) virtual platform were used.

- **Morphological analysis**

The morphological analysis were conducted in accordance with the guidelines of Samson et al. (2014). For macromorphological observations, representatives from each phylogenetic species identified by GCPSR (PS1, PS2, PS3 and PS4) were inoculated in three points onto Czapek Yeast Autolysate agar (CYA), Malt Extract Agar (MEA), Yeast Extract Sucrose Agar (YESA) and Creatine Agar (CREA) and incubated for 7 d at 25 °C in the dark. In addition, for growth pattern examination, CYA plates were incubated at 37 °C and 42 °C. The experiments were done in triplicate.

For micromorphological observations (optical microscopy), microscopic mounts were made in lactic acid from MEA colonies (7 d at 25 °C). The microstructures: conidiophores, stipes, vesicles, conidia, metulae, and phialides were measurements using the software AxioVision Release 4.8.2.

For scanning electron microscopy,  $0.5 \times 0.5$  cm plugs (MEA, 7 d at 25 °C) were fixed in 2% glutaraldehyde solution at 4 °C, for 24 h and later washed in 0.1 M sodium phosphate buffer, (three times, for 15'). Subsequently, the plugs were post-fixed with 1% osmium tetroxide (aqueous solution) at room temperature for 2 h at 25 °C in the dark. After washing in 0.1 M sodium phosphate buffer, the fragments were dehydrated with ethanol at 70, 80, 90 and 100% for 10' at each step. The samples were transferred to a critical-point dryer (Bal-Tec, CSDC 030) and gold-coated on a vaporizer (Bal-Tec, SDC050). The images were obtained with a Quanta 200® FEI Scanning Microscope.

## **Results and Discussion**

- **Diversity and Phylogenetic relationships of *CaM* haplotypes**

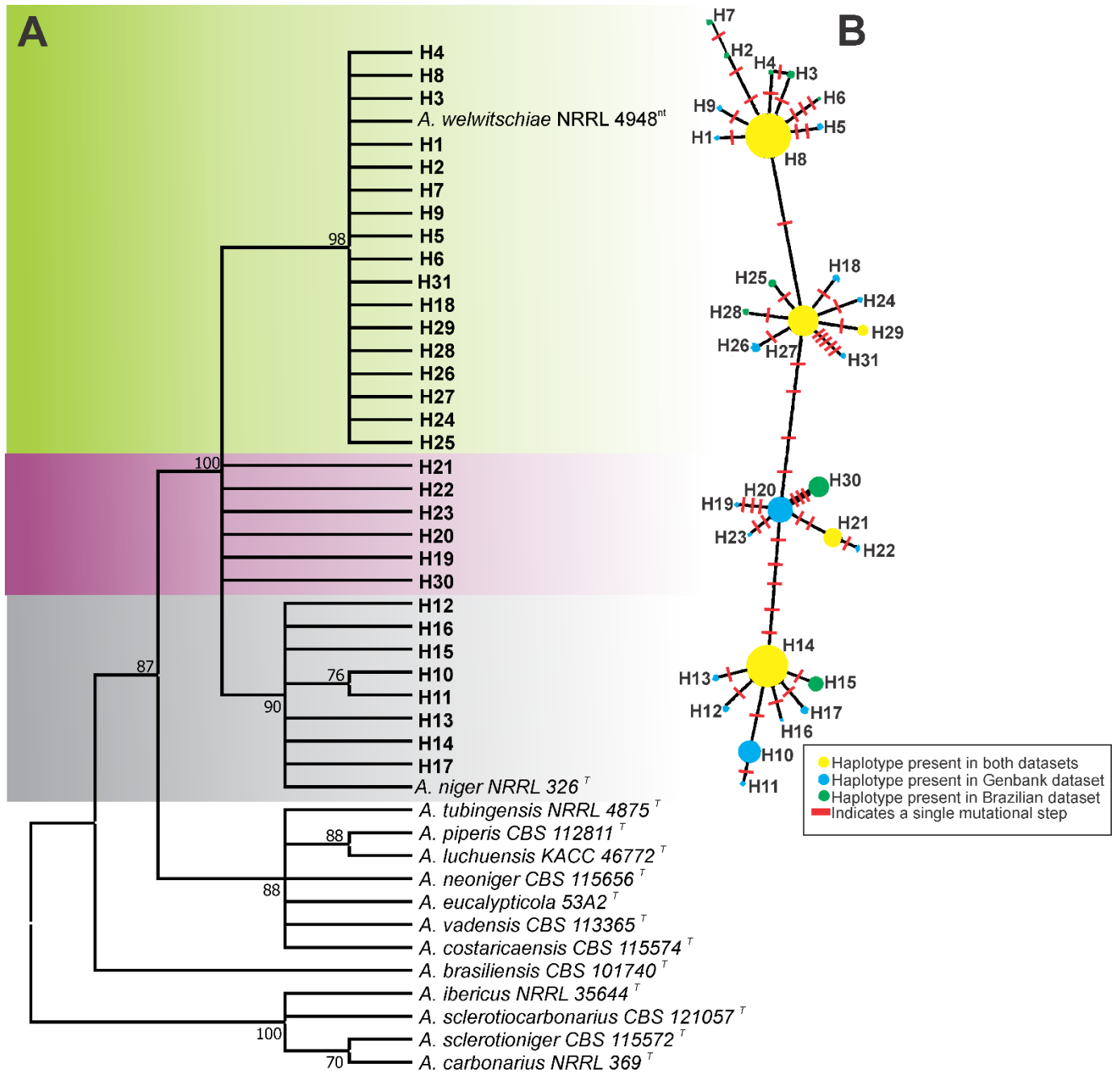
The 418-character matrix of the aligned *CaM* sequences generated from the Brazilian Dataset of *CaM* Sequences ( $n= 403$ ) plus the GenBank Dataset of *CaM* Sequences ( $n= 292$ ) enabled the detection of 47 variable sites with 18 parsimony informative sites, yielding 31 *CaM* haplotypes (Supplementary Table 1). Of the total number of haplotypes detected, 93.5% (29/31) were generated from SNP's and only 6.5% (2/31) were generated from INDEL's.

Among all haplotypes, 19 were singletons, and 12 occurred from 2 to 336 times. The haplotype H8 ( $n= 336$ ), which has an identical *CaM* sequence to that from the *A. welwitschiae* neotype strain (NRRL 4748), exhibited the highest frequency, and the haplotype H14 ( $n= 222$ ), with a sequence identical to *A. niger* type strain (CBS 554.65), was the second most frequent. This finding means that the haplotypes identical to *A. niger* and *A. welwitschiae* type strains accounted for 80.3% (558/695) of the total *CaM* sequences identified in the present study. Nine haplotypes (H2, H3, H4, H6, H7, H15, H25, H28, H30) were exclusively found in Brazilian dataset and accounted for only 3.4% (24/695) of the total sequences. Conversely, seventeen haplotypes (H1, H5, H9, H10, H11, H12, H13, H16, H17, H18, H19, H20, H22, H23, H24, H26, H31) were exclusive to the GenBank dataset, accounting for 8.9% (62/695) of the total sequences (Supplementary Table 1).

By taking the 695 sequences as a single dataset, the overall haplotype diversity ( $H_d$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) were  $0.654 \pm 0.013$  and  $0.00990 \pm 0.00100$ , respectively. When Brazilian dataset ( $n= 403$ ) and GenBank dataset ( $n= 292$ ) sequences were analysed separately, higher diversity was noted in the GenBank dataset sequences ( $H_d= 0.686 \pm 0.022$ ;  $\pi= 0.00974 \pm 0.00026$ ) compared to the Brazilian dataset ( $H_d= 0.524 \pm 0.025$ ;  $\pi= 0.00762 \pm 0.00044$ ). The greater genetic diversity within GenBank dataset sequences is not surprising because GenBank receives sequences from strains isolated from different countries throughout the world and from a higher range of substrates than here analysed. The genetic relationships among haplotypes identified in the present study were inferred by phylogenetic analysis of the *CaM* nucleotide sequences. Most of the haplotypes are on well-supported branches with the neotype strain of *A. welwitschiae* (NRRL 4948) (98% bootstrap value) or with the type strain of *A. niger* (CBS 554.65) (90% bootstrap value) and were confidently identified as *A. niger* ( $n= 248$ ) or *A. welwitschiae* ( $n= 403$ ). The exceptions to this identification were six haplotypes (H19, H20, H21, H22, H23, H30), representing 45 strains, which were not resolved on well-supported branches in the *A. niger* or *A. welwitschiae* clades (Fig. 2). Thus, the phylogenetic analyses using only *CaM* sequences did not provide definitive species identities for these haplotypes. Some

authors have also found strains belonging to the *A. niger* clade with ambiguous identities (Howard et al., 2011; Susca et al., 2014).

Among the six haplotypes unresolved, two (H30 and H21) occurred in the Brazilian dataset, and it was possible to investigate them more deeply to determine whether they might represent new phylogenetic species.



**Fig. 2.** A) Maximum Likelihood tree of *A.* section *Nigri* biseriata species and *CaM* haplotypes of *A. niger* clade species, branches condensed at 70% bootstrap values. B) Median-joining network of *CaM* haplotypes of *A. niger* clade species, node size by taxa frequency.

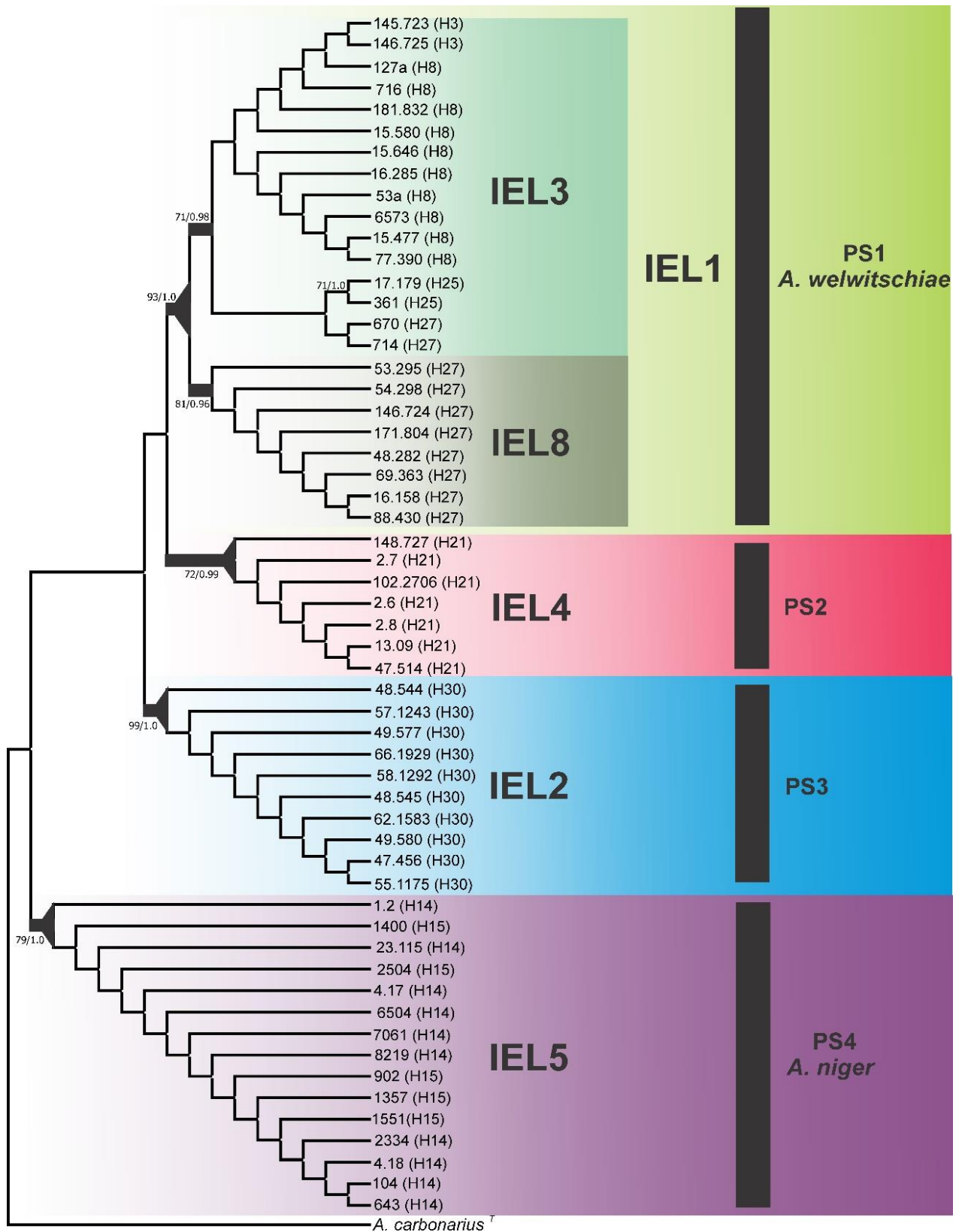
- **Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSR)**

Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSR) is a term originally suggested by Taylor et al. (2000) which reflects the concept of genealogical concordance established by Avise and Ball (1990), later operationalized by Dettman et al. (2003). Briefly, it is an analysis of multiple *loci* realized by the observation of the phylogenies and the statistical support of the clades in two scenarios: individual and consensus genealogies.

For the GCPSR implementation, nucleotide sequences of 3 *loci* (*CaM*, *BenA* and *RPB2*) were used in our study. A total of 56 strains isolated from Brazilian foodstuffs were selected according to the analysis of haplotypes based on the *CaM locus* (gold standard for phylogeny of *A. section Nigri*) and additionally sequenced for parts of the *RPB2* and *BenA* genes. For GCPSR analysis, the alignment of the *CaM locus* resulted in a fragment of 430 bp ( $Hd = 0.863 \pm 0.015$ ;  $\pi = 0.01076 \pm 0.00043$ ); for the *BenA locus*, the final alignment resulted in 453 bp ( $Hd = 0.807 \pm 0.024$ ;  $\pi = 0.00395 \pm 0.00024$ ); and for the *RPB2 locus*, the final alignment resulted in 625 bp ( $Hd = 0.303 \pm 0.067$ ;  $\pi = 0.00340 \pm 0.00075$ ). As can be observed, the *CaM locus* has more resolution power for phylogeny of the *A. niger* clade in relation to the other *loci* analysed. The combined data (*CaM* + *BenA* + *RPB2*) totalled 1,508 bp ( $Hd = 0.880 \pm 0.017$ ;  $\pi = 0.00563 \pm 0.00034$ ).

Based on the criteria of genealogical concordance (Supplementary Fig. 1) and genealogical non-discordance (Supplementary Fig. 2), 8 independent evolutionary lineages (IELs) were recognized. IEL 1 and 2 were identified by the genealogical concordance criterion, and the remaining IELs were identified by the genealogical non-discordance criterion. As mentioned in the “Material and Methods section” to recognize an IEL as a phylogenetic species (PS), the criteria of genetic differentiation and exhaustive subdivision (Dettman et al., 2003) were used. The minor tip clades IEL 6 and 7 were excluded from the ranking process according to the genetic differentiation criterion.

The limits of the phylogenetic species were then established by means of the exhaustive subdivision criterion. Based on this criterion, IELs 3 and 8 were collapsed, and all individuals were harboured under IEL 1; therefore, this node was recognized as the limit of phylogenetic species 1 (PS1). A group of seven strains representing the IEL 4 formed the phylogenetic species 2 (PS2). This phylogenetic species was well supported statistically in the combined three-locus data sets (Fig. 3) and *CaM locus* analyses (Supplementary Fig. 1).



**Fig. 3.** Maximum Parsimony cladogram of *A. niger* clade species using three-locus (*CaM*, *BenA*, and *RPB2*) phylogenies. The branches in bold indicate that these clades were considered independent evolutionary lineages. The triangles at the nodes indicate phylogenetic species

based on the ranking of groups (Dettman et al., 2003). Bootstrap values (BS) and/or posterior probabilities values (pp) higher than 70% and 0.70, respectively, are shown. *A. carbonarius* is the outgroup.

The IEL 2 harboured 10 strains, and following the ranking process, it was identified as phylogenetic species 3 (PS3). This phylogenetic species was well supported statistically in all analyses in the individual and/or combined genealogies (Fig. 3 and Supplementary Figures 1 and 2).

Under the exhaustive subdivision criterion, the node of IEL 5, which was well-supported in the combined analysis (three-*locus* dataset) was recognised as a phylogenetic species boundary and designated as phylogenetic species 4 (PS4). Fifteen strains examined in this study were allocated to this phylogenetic species (Fig. 3).

The strains belonging to the PS1 and PS4, were those identified as *A. welwitschiae* (H3, H8, H25, H27) and *A. niger* (H14 and H15), respectively. On the basis of our data, *A. welwitschiae* neotypes strains (NRRL 4948 and ITEM 4509) (*A. awamori sensu* Perrone (Perrone et al., 2011) are assigned to H8, whereas the extype strain of *A. niger* (NRRL 426) is assigned to H14.

The PS2 (H21) and PS3 (H30) were not collapsed to *A. niger* and *A. welwitschiae*, thereby becoming candidates for new species.

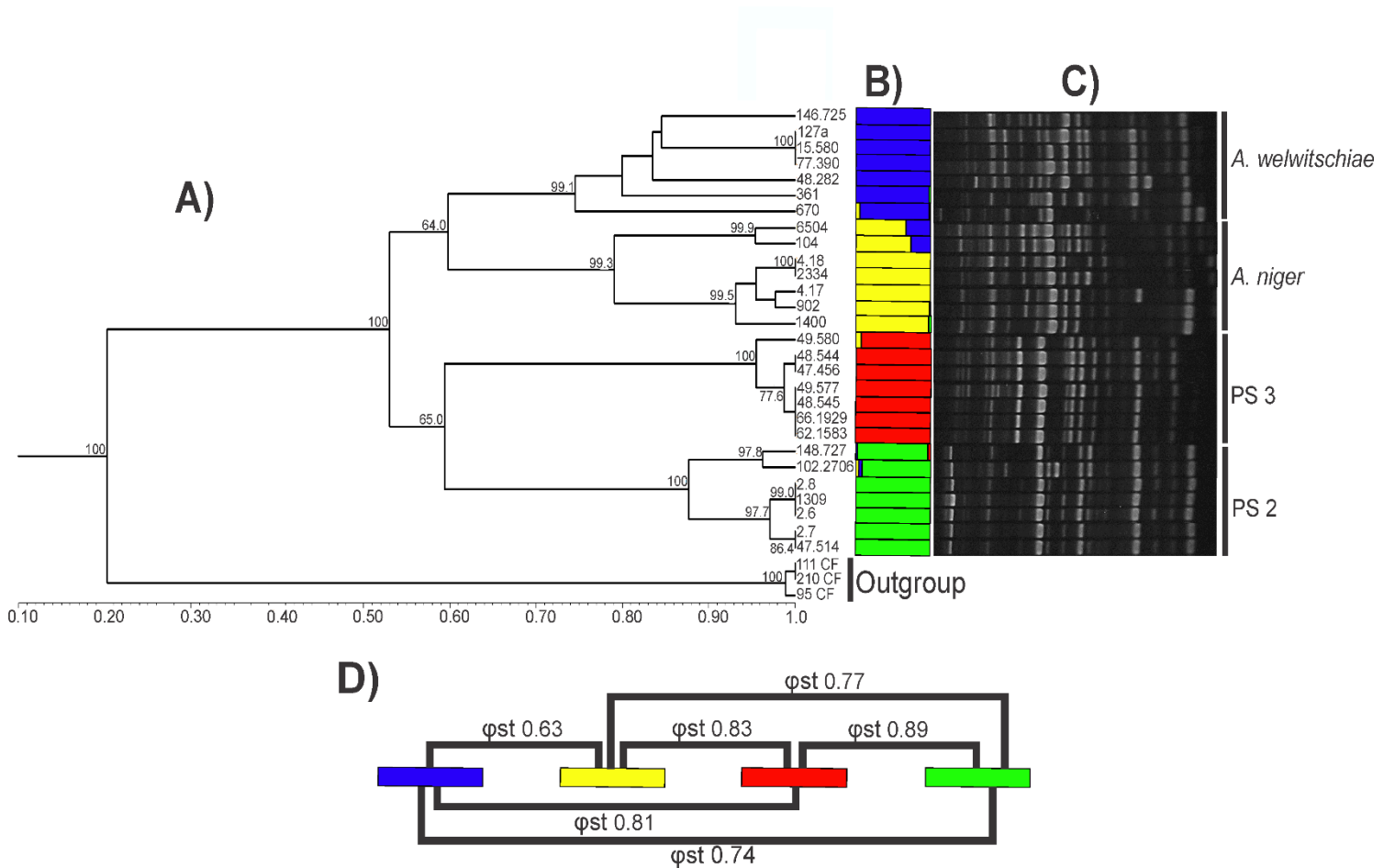
Phylogenetic species 2 (PS2) was recognized by the sequence data collected from 7 Brazilian strains isolated from coffee beans, grape berries and onions bulbs. Based on *CaM* sequence, these seven strains (2.7, 2.6, 2.8, 47.514, Ac 148.727, 13.09), as well as two clinical isolates (F8478 and F12140) characterized by Howard et al. (2011) in their study of cryptic species in the *Aspergillus niger* complex, represent the haplotype H21 (Supplementary Table 1). There are five SNPs fixed for PS2 in relation to *A. niger* and four in relation to *A. welwitschiae*. Interesting, among several *A. niger* and *A. welwitschiae* strains tested by Howard et al. (2011), only the strain F12140 was highly cross-resistant to all azole drugs. Combining calmodulin and beta-tubulin sequencing, these authors observed that the F12140 isolate is most closely related to *A. awamori* (currently *A. welwitschiae*); however, by the *cyp51A* sequence, the isolate was most similar to *A. niger*, although bootstrap values were low (<70) for all analyses. Using *cyp51A* sequences, the strain F12140 appears to be even more divergent from *A. awamori* and *A. niger* (Howard et al., 2011). It is also important to note that the *CaM* sequence of the strain denoted as ITEM 1148 (see Susca et al., 2014), sequence not available

in GenBank), recovered from Brazilian cashew nuts, is identical to those from our seven Brazilian strains recognized as PS2 and that the identity of this strain was considered ambiguous by Susca et al. (2014).

PS3 is exclusive to the Brazilian dataset. All strains in PS3 were isolated from grape samples grown in the São Francisco Valley, Northeastern Brazil (Supplementary Table 1). The concept of genealogical concordance has been widely used to recognize species boundaries, and has supported the description of new species (Abe et al., 2010; Hirata et al., 2007; Laurence et al., 2014; Liu et al., 2016; O'Donnell et al., 2004; Secor et al., 2014; Stewart et al., 2014; Visagie et al., 2016). As an example, recently Frisvad et al. (2019) revised the taxonomy of the *Aspergillus* section *Flavi* and with the help of GCPSR described eight new species. The GCPSR allows us to determine the limit of a species through a protocol based on the concordance/conflict of the different genealogies, thus reducing the subjectivity in recognizing these limits. However, as pointed in Rintoul et al. (2012), the limits of the species must be interpreted as explicit taxonomic hypotheses and must be tested with additional data, and/or based on other concepts.

- **RAPD analysis**

A total of 92 reproducible RAPD bands were obtained from six random primers. The dendrogram generated by UPGMA cluster analysis using Dice similarity coefficient was congruent to the results obtained using sequence data. Four well-defined groups were found, with one of them being composed of *A. niger* strains (GI), another being composed of *A. welwitschiae* strains (GII), and the two other groups formed by strains here recognized as belonging to PS2 (GIV) and PS3 (GIII) (Fig. 4).



**Fig. 4.** Cluster analysis based on RAPD markers. PS 2= Phylogenetic species 2, PS3= Phylogenetic species 3. Each colour corresponds to a genetic group ( $K=4$ ). A) UPGMA dendrogram obtained using Dice similarity coefficient using *A. carbonarius* strains as the outgroup. B) Bayesian analysis (Structure barplot). C) RAPD profile representative, OPAM 07 primer. (D) Pairwise  $\phi_{st}$  index.

Several studies have used “ $F$ ” statistic and its analogs as indicative of the degree of genetic structuring/differentiation between several groups of fungi (Al-Sadi et al., 2015; Araujo et al., 2010; Asadollahi et al., 2013; Liu et al., 2018; Matute et al., 2006; Silva et al., 2017; Tsehaye et al., 2016; Zeng and Chen, 2015). In our study, the pairwise  $\phi_{st}$  analysis corroborated the GCPSR findings. The values of  $\phi_{st}$  for the comparisons among the four phylogenetic species ranged from 0.63 to 0.89 (Fig. 4), values that can be interpreted as a very large differentiation (Dighton et al., 2005). Massi et al. (2014) used the value of  $F_{st}$  as support to discriminate *Aspergillus nomius* from *Aspergillus pseudonomius*, two closely related species.

According to the authors, values of *Fst* above 0.73 are uncommon for strains of the same species.

In the Bayesian clustering analysis, it was observed that the ideal number of clusters to allocate all strains was 4 (the best *K* value according to the model described by Evanno et al., 2005). As expected, the strains of the putative new species (PS2 and PS3) were designated as a group different from the groups of *A. niger* and *A. welwitschiae*, which are represented by a color-coded bar graph shown in Fig. 4. These findings corroborated with UPGMA analysis and with the GCPSR results.

The genotypic data (GCPSR and RAPD) obtained in the present study allows the undoubted validation of PS2 and PS3 as new phylogenetic species pertaining to the *A. niger* clade. Molecular approaches provide the largest number of variable characters for fungal taxonomy, currently many phylogenetic species are being recognized. However, according to the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, for the description of new species, differential phenotypic characters must be presented. Therefore, we decided to investigate phylogenetic species 2 and 3 to determine if they are genuine species, in front of the polyphasic taxonomy.

- **Phenotypic analysis**

A morphological analysis was carried out to establish a comparison between the phylogenetic species found in GCPSR. No morphological differences were found among strains representing PS2, PS4 (*A. niger*) and PS1 (*A. welwitschiae*), however the PS3 strains differ in their morphology when compared to any of the other phylogenetic species here analysed. The PS3 strains show reduced growth on MEA medium in relation to PS2, *A. niger* and *A. welwitschiae* strains (Table 2 and Fig. 5). On CYA after 7 days at 25°C the colonies of PS3 strains show white mycelial area with very sparse sporulation and produce sclerotia. The sclerotia formed are globose, white to cream coloured, and large ( $1,300 \pm 200 \mu\text{m}$ ). No strains of *Aspergillus niger sensu stricto* and *A. welwitschiae* produce sclerotia on conventional media (Frisvad et al 2014). Sclerotial development is an important prerequisite for sexual development in *Aspergillus* subgenus *Circumdati*, but only some species of *Aspergillus* section *Nigri* have been reported to produce sclerotia: *A. aculeatus*, *A. aculeatinus*, *A. brunneoviolaceus*, *A. carbonarius*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. japonicus*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger*, *A. sclerotiocarbonarius* and *A. tubingensis*. According to Frisvad et al. (2014) in certain strains of

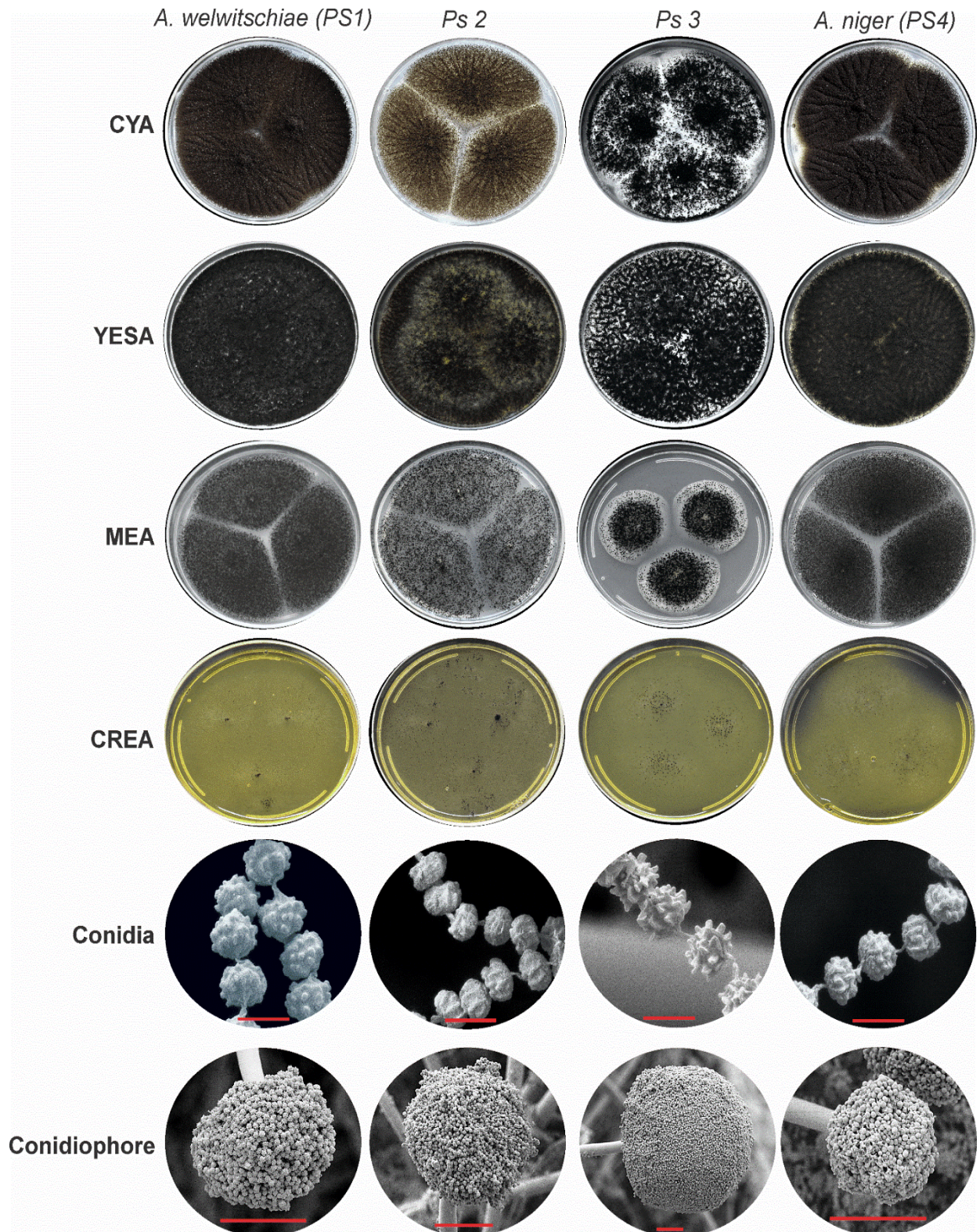
*A. niger* sclerotium production occurs only when whole raising, or other plant parts is added to CYA medium (CYAR) and, *A. welwitschiae* did not produce sclerotia under any conditions. Regarding the production of organic acids, no differences were found all strains here analysed were excellent producers (Fig. 5, CREA medium).

**Table 2.** Morphological characteristics of the phylogenetic species (PS) found in the *A. niger* clade.

		Growth rate (mm)				
		Temperature	PS1 ( <i>A. welwitschiae</i> )	PS2	PS3	PS4 ( <i>A. niger</i> )
<b>Macromorphology</b>	<b>CYA</b>	25 °C	63.3 ± 0.9	63 ± 0.8	65,2 ± 1.2	64,7 ± 0,5
		37 °C	62.3 ± 0,8	61 ± 0.3	63.2 ± 0.4	62.3 ± 1,2
		42 °C	34 ± 4.3	39 ± 0.2	23.6 ± 1.2	28 ± 0.8
	<b>MEA</b>	25 °C	54.2 ± 5.3	50 ± 0.4	38.2 ± 1.2	58.7 ± 4.7
	<b>YESA</b>	25 °C	65.7 ± 2.3	68 ± 0.7	67.2 ± 0.8	67 ± 1.4
	<b>Sclerotia</b>		Absent	Absent	White to cream*	Absent
	<b>Conidia colour</b>		Black	Black	Black	Black
<b>Micromorphology**</b>	<b>Colour in micelial area</b>		Black	Black	White	Black
	<b>Vesicle shape</b>		Globose to subglobose	Globose to subglobose	Globose to subglobose	Globose to subglobose
	<b>Conidial ornamentation</b>		Smooth to roughened	Smooth to finely roughened	Finely roughened to echinulate	Smooth to finely roughened
	<b>Vesicle size</b>		40.5 ± 5.2	45.8 ± 4.1	68.2 ± 8.8	41.7 ± 3.2
	<b>Conidiophore size</b>		76.5 ± 12.7	86.6 ± 11.9	169 ± 23.1	82.2 ± 12.8
	<b>Conidial size</b>		4.1 ± 0.6	4 ± 0.6	4.6 ± 0.6	3.8 ± 0.5
	<b>Stipe size</b>		12.8 ± 1.6	14.6 ± 1.1	18.3 ± 2.1	12.4 ± 0.8

\* Sclerotia are produced constitutively in CYA medium and so inconsistently in MEA medium.

\*\* Micromorphological analysis was performed in MEA medium.



**Fig. 5.** Macro and micromorphological characteristics of strains representing the phylogenetic species recognized by GCPSR in *Aspergillus niger* clade. *A. welwitschiae* PS1 (H3, H8, H25, H27), Phylogenetic species 2 (H21), Phylogenetic species 3 (H30) and *A. niger* PS4 (H14 and H15). Scale bars conidia, 5 µm; Scale bars conidiophore, 50 µm.

No significant micromorphological differences were found between PS2, *A. niger* and *A. welwitschiae*. However, the PS3 strains presented conidiophores that were notably larger (Table 2 and Fig. 5) than the other species of the clade. Another observed difference was the ornamentation of the conidia: PS2, *A. niger* and *A. welwitschiae* conidia varied from smooth to rough, but the conidia of the strains representing PS3 varied from finely roughened to echinulate (Fig. 5).

Concluding, the morphology data did not support the separation of PS2 from *A. niger* and *A. welwitschiae*; however, this group of strains seems to be in the process of speciation. It is well-known that genetic changes can be observed before the fixation of the morphological and behavioural changes. In contrast, the PS3 can be diagnosed based on morphological characters and this phylogenetic species can also be framed in the morphological species concept.

Based on the agreement between multilocus species delimitation results, macro- and micromorphological characters and genetic diversity measuring by RAPD, the phylogenetic species 3 (PS3) is proposed in this report to be a new species in the *Aspergillus* subgenus *Circumdati* section *Nigri*, entitled *Aspergillus paraniger*. This new species is close to *A. niger* and *A. welwitschiae* and is represented by 10 strains isolated from grapes samples grown in the São Francisco Valley, Northeastern Brazil, where the climate is hot and semi-arid.

### Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

### References

- Abe, A., Asano, K., Sone, T., 2010. A molecular phylogeny-based taxonomy of the genus *Rhizopus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 1325–1331.
- Al-Sadi, A.M., Al-Oweisi, F.A., Edwards, S.G., Al-Nadabi, H., Al-Fahdi, A.M., 2015. Genetic analysis reveals diversity and genetic relationship among *Trichoderma* isolates from potting media, cultivated soil and uncultivated soil. *BMC Microbiol.* 15, 1–11.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.

- Araujo, R., Amorim, A., Gusmão, L., 2010. Genetic diversity of *Aspergillus fumigatus* in indoor hospital environments. *Med. Mycol.* 48, 832–838.
- Asadollahi, M., Fekete, E., Karaffa, L., Flipphi, M., árnyasi, M., Esmaeili, M., Váczy, K.Z., Sándor, E., 2013. Comparison of *Botrytis cinerea* populations isolated from two open-field cultivated host plants. *Microbiol. Res.* 168, 379–388.
- Avise, J.C., Ball, J.R.M., 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surv. Evol. Biol.* 7.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Rohl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37–48.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 9, 772.
- Dettman, J.R., Jacobson, D.J., Taylor, J.W., 2003. A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evolution* 57, 2703–2720.
- Dighton, J., White, J., Oudemans, P., 2005. *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*, Bioscience.
- Earl, D., vonHoldt, B., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 359–361.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567.
- Ferracin, L.M., Frisvad, J.C., Taniwaki, M.H., Iamanaka, B.T., Sartori, D., Schapovaloff, M.E., Fungaro, M.H.P., 2009. Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* aggregate. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* .

- Ferranti, L. de S., Fungaro, M.H.P., Massi, F.P., Silva, J.J. da, Penha, R.E.S., Frisvad, J.C., Taniwaki, M.H., Iamanaka, B.T., 2018. Diversity of *Aspergillus* section *Nigri* on the surface of *Vitis labrusca* and its hybrid grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 268, 53–60.
- Ferranti, L.S., Correa, B., Fungaro, M.H.P., Iamanaka, B.T., Massi, F.P., Phippen, C.B.W., Frisvad, J.C., Taniwaki, M.H., 2017. Occurrence and fumonisin B<sub>2</sub> producing potential of *Aspergillus* section *Nigri* in Brazil nuts. *Mycotoxin Res.* 33, 49–58.
- Frisvad, J.C., Hubka, V., Ezekiel, C.N., Hong, S.-B., Nováková, A., Chen, A.J., Arzanlou, M., Larsen, T.O., Sklenář, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A., Houbroken, J., 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stud. Mycol.* 93, 1–63.
- Fungaro, M.H.P., Ferranti, L.S., Massi, F.P., da Silva, J.J., Sartori, D., Taniwaki, M.H., Frisvad, J.C., Iamanaka, B.T., 2017. *Aspergillus labruscus* sp. nov., a new species of *Aspergillus* section *Nigri* discovered in Brazil. *Sci. Rep.* 7, 6203.
- Fungaro, M.H.P., Vieira, M.L.C., Pizzirani-Kleiner, A.A., De Azevedo, J.L., 1996. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 389–392.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1323–1330.
- Hirata, K., Kusaba, M., Chuma, I., Osue, J., Nakayashiki, H., Mayama, S., Tosa, Y., 2007. Speciation in *Pyricularia* inferred from multilocus phylogenetic analysis. *Mycol. Res.* 111, 799–808.
- Hong, S.B., Cho, H.S., Shin, H.D., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2006. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 477–486.
- Hong, S.B., Lee, M., Kim, D.H., Varga, J., Frisvad, J.C., Perrone, G., Gomi, K., Yamada, O., Machida, M., Houbroken, J., Samson, R.A., 2013. *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia. *PLoS One* 8.
- Howard, S.J., Harrison, E., Bowyer, P., Varga, J., Denning, D.W., 2011. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4802–4809.

- Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol. Biol. Evol.* 23, 254–267.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Laurence, M.H., Summerell, B.A., Burgess, L.W., Liew, E.C.Y., 2014. Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Biol.* 118, 374–384.
- Liu, F., Wang, M., Damm, U., Crous, P.W., Cai, L., 2016. Species boundaries in plant pathogenic fungi: A *Colletotrichum* case study. *BMC Evol. Biol.* 16, 1–14.
- Liu, Q., Xin, Y.H., Zhou, Y.G., Chen, W.X., 2018. Multilocus sequence analysis of homologous recombination and diversity in *Arthrobacter sensu lato* named species and glacier-inhabiting strains. *Syst. Appl. Microbiol.* 41, 23–29.
- Magnani, M., Fernandes, T., Prete, C.E.C., Homechim, M., Ono, E.Y.S., Vilas-Boas, L.A., Sartori, D., Furlaneto, M.C., Fungaro, M.H.P., 2005. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Sci. Agric.* .
- Margush, T., McMorris, F.R., 1981. Consensus-trees. *Bull. Math. Biol.* 43, 239–244.
- Massi, F.P., Sartori, D., de Souza Ferranti, L., Iamanaka, B.T., Taniwaki, M.H., Vieira, M.L.C., Fungaro, M.H.P., 2016. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 221, 19–28.
- Massi, F.P., Vieira, M.L.C., Sartori, D., Penha, R.E.S., de Freitas Munhoz, C., Ferreira, J.M., Iamanaka, B.T., Taniwaki, M.H., Frisvad, J.C., Fungaro, M.H.P., 2014. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. *Int. J. Food Microbiol.* 186, 14–21.
- Matute, D.R., McEwen, J.G., Puccia, R., Montes, B.A., San-Blas, G., Bagagli, E., Rauscher, J.T., Restrepo, A., Morais, F., Niño-Vega, G., Taylor, J.W., 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.* 23, 65–73.

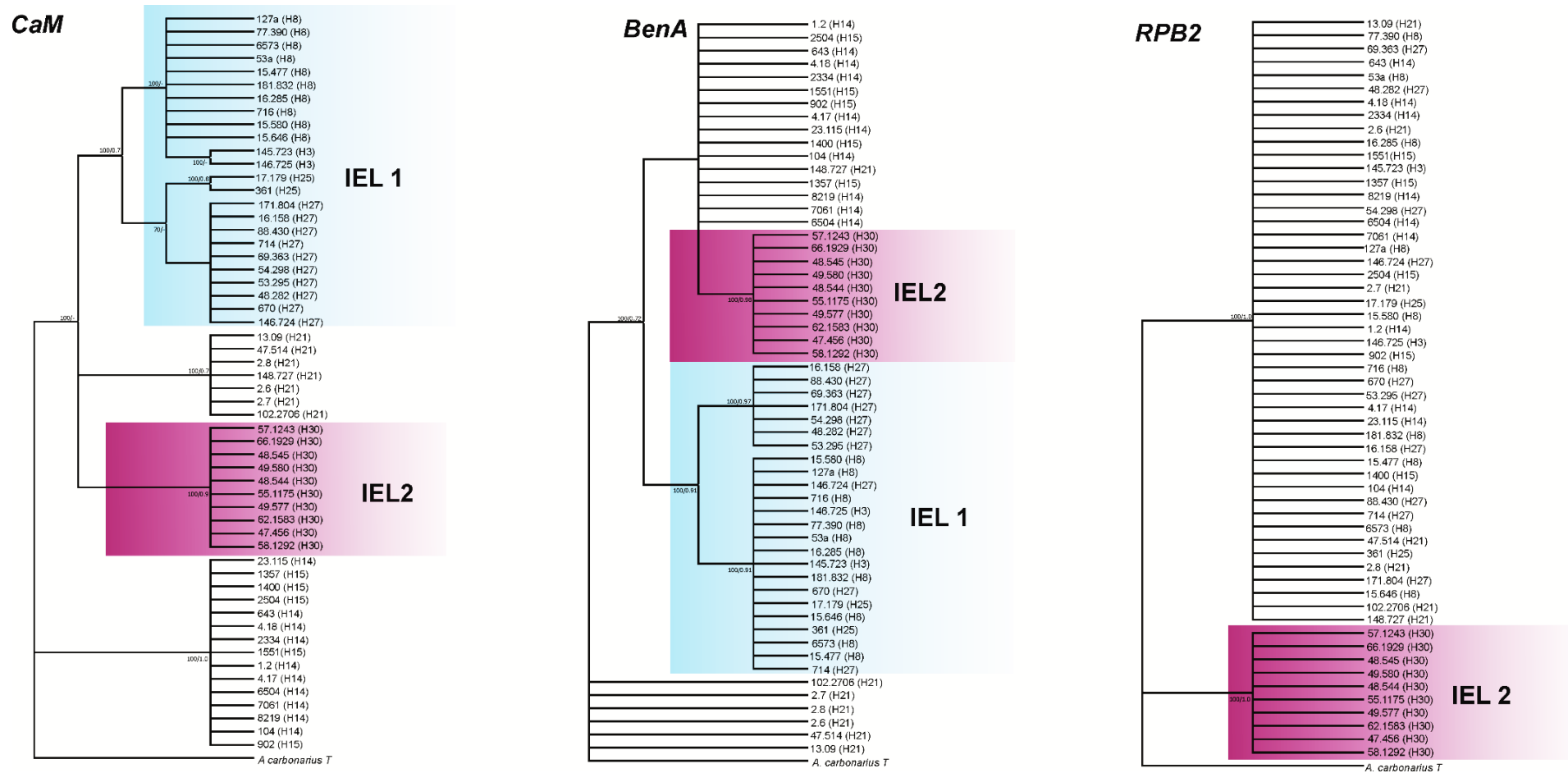
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees, in: 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE). pp. 1–8.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Kistler, H.C., Aoki, T., 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet. Biol.* 41, 600–623.
- Park, H.S., Jun, S.C., Han, K.H., Hong, S.B., Yu, J.H., 2017. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. *Adv. Appl. Microbiol.* 100, 161–202.
- Perrone, G., Stea, G., Epifani, F., Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2011. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biol* 115, 1138–1150.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Raja, H.A., Baker, T.R., Little, J.G., Oberlies, N.H., 2017. DNA barcoding for identification of consumer-relevant mushrooms: A partial solution for product certification? *Food Chem.* 214, 383–392.
- Rintoul, T.L., Eggertson, Q.A., Lévesque, C.A., 2012. Multigene Phylogenetic Analyses to Delimit New Species in Fungal Plant Pathogens BT - Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols, in: Bolton, M.D., Thomma, B.P.H.J. (Eds.), . Humana Press, Totowa, NJ, pp. 549–569.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., Sanchez-Gracia, A., 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol. Biol. Evol.* 34, 3299–3302.
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraeken, J., Hong, S.B., Hubka, V., Klaassen, C.H., Perrone,

- G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsube, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J.C., 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 78, 141–173.
- Sartori, D., Furlaneto, M.C., Martins, M.K., Ferreira de Paula, M.R., Pizzirani-Kleiner, A.A., Taniwaki, M.H., Fungaro, M.H.P., 2006. PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Res. Microbiol.* 157, 350–354.
- Secor, G.A., Rivera-Varas, V., Christ, D.S., Mathew, F.M., Khan, M.F.R., Varrelmann, M., Bolton, M.D., 2014. Characterization of *Fusarium secorum*, a new species causing *Fusarium* yellowing decline of sugar beet in north central USA. *Fungal Biol.* 118, 764–775.
- Silva, J.J., Viaro, H.P., Ferranti, L.S., Oliveira, A.L.M., Ferreira, J.M., Ruas, C.F., Ono, E.Y.S., Fungaro, M.H.P., 2017. Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations and occurrence of fumonisins in maize grown in Southern Brazil. *Crop Prot.* 99, 160–167.
- Stewart, J.E., Timmer, L.W., Lawrence, C.B., Pryor, B.M., Peever, T.L., 2014. Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: Incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen. *BMC Evol. Biol.* 14, 1–14.
- Susca, A., Moretti, A., Stea, G., Villani, A., Haidukowski, M., Logrieco, A., Munkvold, G., 2014. Comparison of species composition and fumonisin production in *Aspergillus* section *Nigri* populations in maize kernels from USA and Italy. *Int J Food Microbiol* 188, 75–82.
- Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Iamanaka, B.T., Sartori, D., Copetti, M. V, Balajee, A., Fungaro, M.H.P., Frisvad, J.C., 2012. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. *PLoS One* 7, e42480.
- Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Teixeira, A.A., Iamanaka, B.T., 2003. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 173–179.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., Fisher, M.C., 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 31, 21–32.

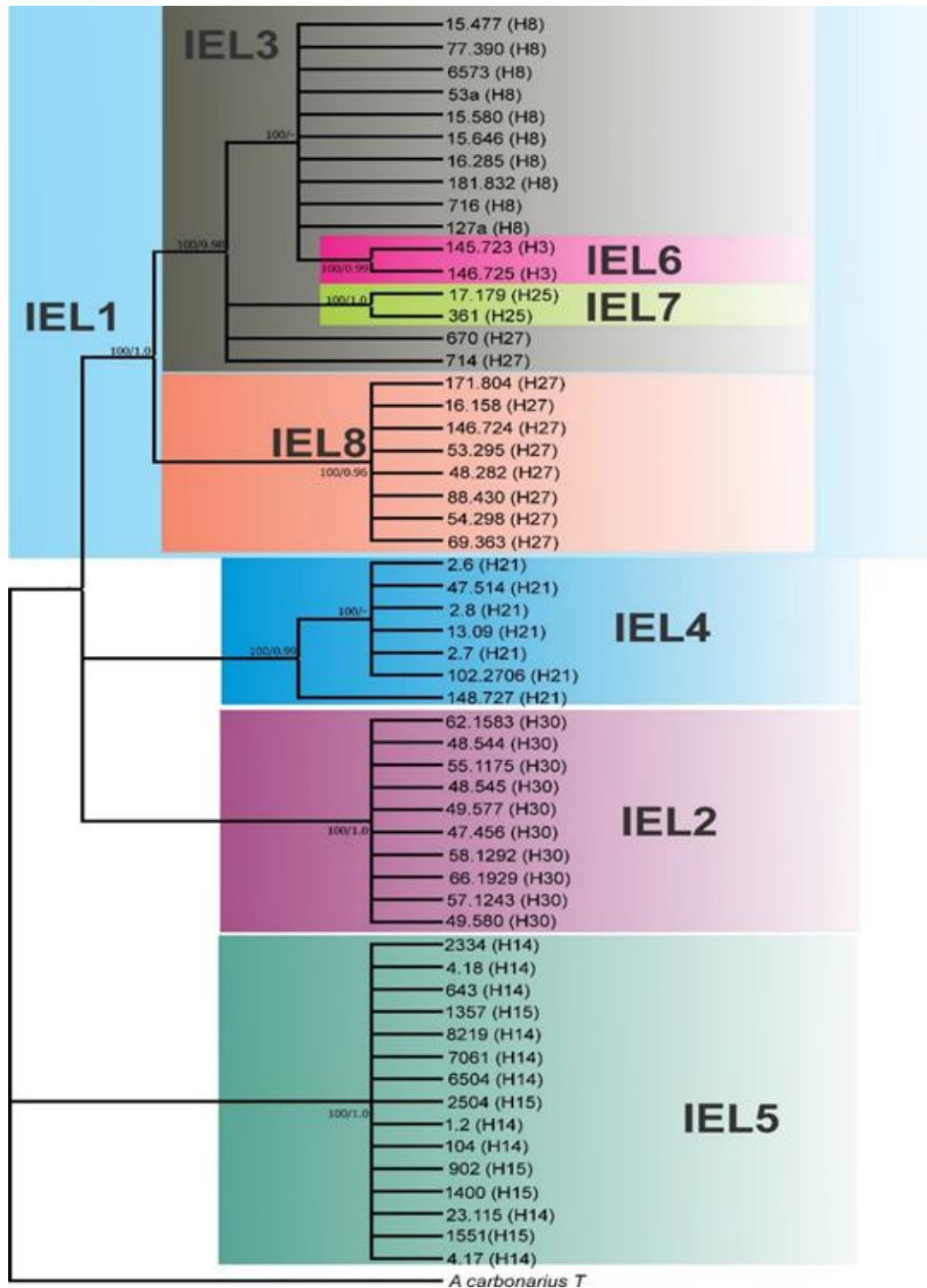
- Tsehay, H., Elameen, A., Tronsmo, A.M., Sundheim, L., Tronsmo, A., Assefa, D., Brurberg, M.B., 2016. Genetic variation among *Fusarium verticillioides* isolates associated with Ethiopian maize kernels as revealed by AFLP analysis. *Eur. J. Plant Pathol.* 1–10.
- Varga, J., Kocsube, S., Szigeti, G., Baranyi, N., Vagvolgyi, C., Jaksic Despot, D., Magyar, D., Meijer, M., Samson, R.A., Segvic Klaric, M., 2014. Occurrence of black Aspergilli in indoor environments of six countries. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 65, 219–223.
- Visagie, C.M., Seifert, K.A., Houbraken, J., Samson, R.A., Jacobs, K., 2016. A phylogenetic revision of *Penicillium* sect. *Exilicaulis*, including nine new species from fynbos in South Africa. *IMA Fungus* 7, 75–117.
- Zeng, D.F., Chen, B., 2015. Genetic variability and bottleneck detection of four *Tricholoma matsutake* populations from northeastern and southwestern China. *Environ. Microbiol.* 17, 2870–2881.

### Supplementary archives

**Supplementary Table 1.** Listing of the strains and distribution of haplotypes found in this study. (Available in <https://goo.gl/LPSzee>).



**Supplementary Fig. 1.** Maximum parsimony tree (MR 50%) of *A. niger* clade species using the loci *CaM*, *BenA*, and *RPB2*. Genealogical Concordance criterion: The lineages that occur in most of the single loci are highlighted in coloured boxes, and these lineages were identified as independent evolutionary lineages. Bootstrap values (BS) and/or posterior probabilities values (pp) higher than 70% and 0.70, respectively, are shown. *A. carbonarius* is the outgroup.



**Supplementary Fig. 2.** Maximum parsimony tree (semi-strict consensus) of *A. niger* clade species using three-locus (*CaM*, *BenA*, and *RPB2*) phylogenies. Genealogical non-discordance criterion: The lineages that were well supported by at least one locus but not contradicted by any other locus are identified as independent evolutionary lineages (coloured boxes). Bootstrap values (BS) and/or posterior probabilities values (pp) higher than 70% and 0.70, respectively, are shown. *A. carbonarius* is the outgroup.

## 5 CONCLUSÕES FINAIS

- *Aspergillus* section *Nigri* é o principal grupo fúngico encontrado na erva-mate nacional preparada para chimarrão, sendo *A. luchuensis* a espécie predominante. Espécies de *Aspergillus* potencialmente toxigênicas (*A. flavus*, *A. novoparasiticus*, *A. niger* e *A. welwitschiae*) ocorrem em erva-mate em baixa frequência. Dentre estas, *A. flavus* é a espécie mais frequente e a que contempla mais isolados toxigênicos, sugerindo que o grupo das aflatoxinas deva ser priorizado nas investigações sobre a possibilidade de contaminação da erva-mate com micotoxinas.
- Dentre os *Aspergillus* section *Nigri* isolados de produtos agrícolas (café, uva, castanha-do-brasil, cebola e erva-mate), os pertencentes ao clado *A. niger* (*A. niger* e *A. welwitschiae*) são os mais frequentes. No universo de 695 sequências do gene *CaM* para este clado (403 de produtos agrícolas produzidos no Brasil e 292 do GenBank), há 31 haplótipos, sendo 6 não passíveis de identificação por sequências de nucleotídeos deste gene. A análise de Concordância Genealógica (GCPSR) usando outros dois *loci* (*BenA* e *RPB2*) sugere que o clado *A. niger* contempla 4 espécies filogenéticas. As linhagens representando uma das espécies filogenéticas são morfologicamente distintas das linhagens que representam as demais espécies filogenéticas. Dentre as diferenças morfológicas, a mais relevante é a capacidade de produção de esclerócios. Sugere-se a descrição dessa nova espécie de *Aspergillus* subgenus *Circumdati* section *Nigri* como *Aspergillus paraniger*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M.L.; et al. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 3, p. 504–506, 2003.

ABARCA, M.L.; et al. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2650–2652, 1994.

ABARCA, M.L.; et al. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 1, p. 33–49, 2004.

ABBOTT, C.L. et al. Development of a SNP genetic marker system based on variation in microsatellite flanking regions of *Phytophthora infestans*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 32, n. 4, p. 440–457, 2010.

ABD-ALLA, M.A.; EL-MOHAMEDY, R.S.R.; BADEAA, R.I. Effect of some volatile compounds on black mould disease on onion bulbs during storage. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 2, n. 6, p. 384–390, 2006.

ABE, A.; ASANO, K.; SONE, T.A. Molecular Phylogeny-based taxonomy of the genus *Rhizopus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 74, n. 7, p. 1325–1331, 2010.

ABRUNHOSA, L. et al. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 240–242, 2001.

ALDHEBIANI, A.Y. Species concept and speciation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 3, p. 437–440, 2018.

ALEGRE, J.C.; VILCAHUAMÁN, L.J.V; CORREA, G. Geração da curva alométrica para avaliar as reservas de carbono em plantios de erva-mate, no Sul do Brasil. **Emprapa Florestas**, v.1, n. 33, p. 1-19, 2007.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M.M. **Introductory Mycology**. 4 ed. Califórnia: Wiley, 1996, p. 868.

ALIZADEH, A.M.; et al. Fumonisin B1 contamination of cereals and risk of esophageal cancer in a high-risk area in northeastern Iran. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 6, p. 2625–2628, 2012.

ARCARI, D.P.; et al. Anti-inflammatory effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n. 2, p. 110–115, 2011.

ARRUS, K. et al. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, v. 41, n. 5, p. 513–527, 2005.

AVISE, J.C.; BALL, J.R.M. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. **Oxford Surveys in Evolutionary Biology**, v. 7, p. 45-67, 1990.

BALASUNDARAM, S.V.; et al. How many DNA markers are needed to reveal cryptic fungal species? **Fungal Biology**, v. 119, n. 10, p. 940–945, 2015.

BAQUIÃO, A.C.; et al. Monitoring and determination of fungi and mycotoxins in stored Brazil nuts. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 8, p. 1414–20, 2013.

BAQUIAO, A.C.; LOPES, E.L.; CORREA, B. Molecular and mycotoxigenic biodiversity of *Aspergillus flavus* isolated from Brazil nuts. **Food Research International**, v. 89, n. Pt 1, p. 266–271, 2016.

BARBERIS, C.L.; DALCERO, A.M.; MAGNOLI, C.E. Evaluation of aflatoxin B1 and ochratoxin A in interacting mixed cultures of *Aspergillus* sections *Flavi* and *Nigri* on peanut grains. **Mycotoxin Research**, v. 28, n. 3, p. 149–156, 2012.

BARROS, S.G.S.; et al. Mate (chimarrão) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 37, n. 1, p. 25-30, 2000.

BATISTA, L.R.; et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 293–300, 2003.

BAUM, D. Phylogenetic species concepts. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 1–2, 1992.

BAYMAN, P.; L BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts: Incidence and associations. **Mycopathologia**, v. 7, n. 1, p. 161-169, 2002.

BENEVENUTO, J.; et al. Molecular variability and genetic relationship among Brazilian strains of the sugarcane smut fungus. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 24, 2016.

BERNARDI, E.; CALDEIRA, M.F.; NASCIMENTO, J.S. Identificação de fungos filamentosos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil.). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 489-493, 2005.

BERNHARD, H. Progress toward a general species concept. **Evolution**, v. 65, n. 4, p. 923–931, 2011.

BERTOLDO, R. ***Aspergillus* section *Nigri* em bulbos de cebola - ocorrência, identificação e produção de fumonisina B2 e ocratoxina A**. 2015. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

BIXBY, M.; et al. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Science**, v. 77, n. 3, p. 345–358, 2005.

BOAVENTURA, B.C.; et al. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 657–664, 2012.

BOONZAAIJER, G. et al. An exploratory investigation of several mycotoxins and their natural occurrence in flavour ingredients and spices, using a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 167–174, 2008.

BORGES, L.R.; et al., Contagem de fungos no controle de qualidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil) e isolamento de gêneros potencialmente micotoxigênicos. **B.CEPPA**, v. 20, n. 1, p. 103-110, 2002.

BORGES, M.C.; et al. The effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on metabolic and inflammatory parameters in high-fat diet-fed Wistar rats. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, n. 5, p. 561–569, 2013.

BROWN, E.M.; et al. Phylogenetic analysis reveals a cryptic species *Blastomyces gilchristii*, sp. nov. within the human pathogenic fungus *Blastomyces dermatitidis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

BUGNO, A.; et al. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 47-51, 2006.

- CALDERARI, T.O.; et al. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: From rainforest to consumer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 267–272, 2013.
- CARMO, L.S.; et al. The effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) consumption on IL-1, IL-6, TNF-alpha and IL-10 production by bone marrow cells in wistar rats fed a high-fat diet. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 83, n. 1, p. 26–35, 2013.
- CARVAJAL-CAMPOS, A.; et al. *Aspergillus korhogoensis*, a novel aflatoxin producing species from the Côte d'Ivoire. **Toxins**, v. 9, n. 11, p. 1–22, 2017.
- CASTELLSAGUE, X.; et al. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. **International Journal of Cancer**, v. 88, n. 4, p. 658–664, 2000.
- CASTRILLO, M.L.; HORIANSKI, M.A.; JERKE, G. Aislamiento de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* en la yerba mate comercializada en Posadas (Misiones, Argentina) y evaluación de su potencial ocratoxigénico. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 45, p. 110–113, 2013.
- CHABI, M.L. et al. Pulmonary aspergillosis. **Diagnostic and Interventional Imaging**, v. 96, n. 5, p. 435–442, 2015.
- CHIOTTA, M.L.; et al. Biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentinian vineyards and ochratoxin A contamination. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 182–190, 2013.
- CHULZE, S.N.; MAGNOLI, C.E.; DALCERO, A.M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, 2006.
- COPETTI, M.V; et al. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 1–2, p. 67–70, 2010.
- CRAWFORD, J.E.; et al. Reticulate speciation and barriers to introgression in the *Anopheles gambiae* species complex. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 11, p. 3116–3131, 2015.
- DA ROCHA ROSA, C.A.; et al. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food additives and contaminants: Part A**, v. 19, n. 4, p. 408–414, 2002.

DASANAYAKE, A.P.; SILVERMAN, A.J.; WARNAKULASURIYA, S. Mate drinking and oral and oro-pharyngeal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Oral Oncology**, v. 46, n. 2, p. 82–86, 2010.

DAVOLOS, D.; PIETRANGELI, B. A molecular and bioinformatic study on the ochratoxin A (OTA)-producing *Aspergillus affinis* (section *Circumdati*). **Mycotoxin Research**, v. 30, n. 2, p. 113–122, 2014.

DELMOTTE, F.; et al. Characterization of single-nucleotide-polymorphism markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 21, p. 7861–7863, 2011.

DETTMAN, J.R.; JACOBSON, D.J.; TAYLOR, J.W. A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. **Evolution**, v. 57, n. 12, p. 2703–2720, 2003.

DUARTE, E.A.A. et al. Putting the mess in order: *Aspergillus welwitschiae* (and not *A. niger*) is the etiological agent of sisal bole rot disease in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1227, 2018.

DUPUIS, J.R.; ROE, A.D.; SPERLING, F.A.H. Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: One marker is not enough. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 18, p. 4422–4436, 2012.

EINLOFT, T.C.; et al. Survey of mycobiota, black *Aspergillus* and ochratoxin A occurrence on Brazilian wine grapes. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 59–64, 2017.

EL-ATY, A.M. et al. Residues and contaminants in tea and tea infusions: a review. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 31, n. 11, p. 1794–1804, 2014.

FAOSTAT. 2018. Top Production Maté. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, 12 de jul. de 2018.

FARDOS, M.B.; MAGDA, M.A. Unexpected hazard due to fumonisins contaminating herbal teas used traditionally by Saudi people. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 1, p. 35–40, 2013.

FDA. Food and Drug Administration. 2018. Microorganisms and microbial-derived ingredients used in food. Disponível em :

<https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm>, 17 de jan. de 2019.

FERNANDES, E.S.; et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: in vitro and in vivo studies. **Nutrition**, v. 28, n. 11–12, p. 1157–1164, 2012.

FERRANTI, L.S.; et al. Diversity of *Aspergillus* section *Nigri* on the surface of *Vitis labrusca* and its hybrid grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 268, p. 53–60, 2018.

FERRANTI, L.S.; et al. Occurrence and fumonisin B2 producing potential of *Aspergillus* section *Nigri* in Brazil nuts. **Mycotoxin Research**, v. 33, n. 1, p. 49–58, 2017.

FREIRE, F.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, v. 149, n. 1, p. 13–19, 2000.

FREIRE, L.; et al. Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and ochratoxin A in wines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 181–190, 2017.

FRISVAD, J. C. et al. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 93, p. 1–63, 2019.

FRISVAD, J.C.; et al. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23496, 2011.

FRISVAD, J.C.; et al. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9727–9732, 2007.

FUNGARO, M.H.P.; et al. *Aspergillus labruscus* sp. nov., a new species of *Aspergillus* section *Nigri* discovered in Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, p. 6203, 2017.

GAMBERO, A.; RIBEIRO, M.L. The positive effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in obesity. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 730–750, 2015.

GARCIA, M.V.; et al. Fungi in spices and mycotoxigenic potential of some *Aspergilli* isolated. **Food Microbiology**, v. 73, p. 93–98, 2018.

GARCIA-LONDONO, V.A.; REYNOSO, M.; RESNIK, S. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) from the Argentinean market. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 7, n. 4, p. 247–253, 2014.

GEISER, D.M.; et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 1–10, 2007.

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

GHERBAWY, Y.; et al. Molecular characterization of black *Aspergillus* Species from onion and their potential for ochratoxin A and fumonisin B2 production. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 5, p. 414–423, 2015.

GLADIEUX, P.; et al. Genomic sequencing reveals historical, demographic and selective factors associated with the diversification of the fire-associated fungus *Neurospora discreta*. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 22, p. 5657–5675, 2015.

GONCALVES, J.S. et al. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1817– 1825, 2012.

GRUBISHA, L.C.; et al. Intercontinental divergence in the Populus-associated ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma populinum*. **New Phytologist**, v. 194, n. 2, p. 548– 560, 2012.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, n. 2, p. 338–344, 1996.

HAAS, D. et al. Identification and quantification of fungi and mycotoxins from Pu-erh tea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 316–322, 2013.

HANIF, K.; AKHTAR, N.; HAFEEZ, R. First report of *Aspergillus welwitschiae* as a postharvest pathogen of *Brassica campestris* seeds in Pakistan. **Journal of Plant Pathology**, v. 98, n. 1, p. 185, 2016.

HAYDEN, N.J.; MAUDE, R.B. The role of seed-borne *Aspergillus niger* in transmission of black mould of onion. **Plant Pathology**, v. 41, n. 5, p. 573–581, 2007.

HAYDEN, N.J.; MAUDE, R.B.; PROCTOR, F.J. Studies on the biology of black mould (*Aspergillus niger*) on temperate and tropical onions. 1. A comparison of sources of the disease in temperate and tropical field crops. **Plant Pathology**, v. 43, n. 3, p. 562–569, 1994.

- HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.
- HIRATA, K.; et al. Speciation in *Pyricularia* inferred from multilocus phylogenetic analysis. **Mycological Research**, v. 111, n. 7, p. 799–808, 2007.
- HONG, S.B.; et al. *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.
- HONG, S.B.; KIM, D.H.; SAMSON, R.A. *Aspergillus* associated with meju, a fermented soybean starting material for traditional soy sauce and soybean paste in Korea. **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p. 218–224, 2015.
- HUBKA, V.; et al. *Aspergillus europaeus* sp. nov., a widely distributed soil-borne species related to *A. wentii* (section *Cremeri*). **Plant Systematics and Evolution**, v. 302, n. 6, p. 641–650, 2016.
- HUBKA, V.; et al. Polyphasic data support the splitting of *Aspergillus candidus* into two species; proposal of *Aspergillus dobrogensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 995–1011, 2018.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. Fumonisin B. In: **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human: some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene**, v. 82, Lyon: IARC press, 2002, p. 301–345.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. Ochratoxin A. In: **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human: Some Naturally Occurring Substances; Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic amines and mycotoxins**, v. 56, Lyon: IARC press, 1993, p. 489–521.
- JEDIDI, I.; et al. Aflatoxins and ochratoxin A and their *Aspergillus causal* species in Tunisian cereals. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 10, n. 1, p. 51–58, 2017.
- JURJEVIĆ, Ž.; et al. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air. **IMA Fungus**, v. 3, n. 2, p. 159–173, 2012.
- KERMANI, F.; et al. Diversity, molecular phylogeny and fingerprint profiles of airborne *Aspergillus* species using random amplified polymorphic DNA. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 96, 2016.

KLEIN, G.A.; et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: a pilot study. **The Journal of the American College of Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 320–332, 2011.

KLICH, M.A. **Identification of Common *Aspergillus* Species**. 1 ed. American Society for Microbiology, 2002, p. 116.

KOSALEC, I.; CVEK, J.; TOMIC, S. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. **Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju**, v. 60, n. 4, p. 485–501, 2009.

KOZAKIEWICZ, Z. ***Aspergillus* Species on Stored Products**. 1 ed. Cambrian Printers, 1989, p. 188.

KRÜGER, C.D.; FERNANDES, A.M.; ROSA, C.A.R. Ochratoxin A in wines from 2002 to 2008 harvest marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 5, n. 3, p. 204–207, 2012.

LAMBONI, Y.; et al. Diversity in secondary metabolites including mycotoxins from strains of *Aspergillus* section *Nigri* isolated from raw cashew nuts from Benin, West Africa. **Plos One**, v. 11, n. 10, p. e0164310, 2016.

LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 310–50, 1999.

LAURENCE, M.H.; et al. Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal Biology**, v. 118, n. 4, p. 374–384, 2014.

LESLIE, J.F.; et al. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1–2, p. 25–32, 2007.

LIMA, A.M. et al. Critical points of Brazil nuts: a beginning for food safety, quality control and Amazon sustainability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 735–740, 2013.

LIU, F.; et al. Species boundaries in plant pathogenic fungi: A *Colletotrichum* case study. **BMC Evolutionary Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2016.

LOGRIECO, A.F.; et al. *Aspergillus* section *Nigri* as contributor of fumonisin B(2) contamination in maize. **Food Additives and Contaminants Part: A**, v. 31, n. 1, p. 149–155, 2014.

- LUO, H.; et al. Genome-wide analysis of simple sequence repeats and efficient development of polymorphic SSR markers based on whole genome re-sequencing of multiple isolates of the wheat stripe rust fungus. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0130362, 2015.
- MAGNANI, M.; et al. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 1, p. 45-49, 2005.
- MANSSON, M.; et al. Isolation and NMR characterization of fumonisin B2 and a new fumonisin B6 from *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 949–953, 2010.
- MARIN, S.; et al. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218–237, 2013.
- MARIN, S.; et al. Predicting the growth/no-growth boundary and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in pistachio nuts. **Food Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 683–689, 2008.
- MARROQUÍN-CARDONA, A.G.; et al. Mycotoxins in a changing global environment– A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, n. 0, p. 220–230, 2014.
- MARTINS, M.L.; MARTINS, H.M.; BERNARDO, F. Fumonisin B1 and B2 in black tea and medicinal plants. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 8, p. 1268–1270, 2001.
- MARTINS, M.L.; MARTINS, H.M.; GIMENO, A. Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 12, p. 1127–1131, 2003.
- MASSI, F.P.; et al. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p. 19–28, 2016.
- MATEO, E.M.; et al. Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR-based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 118–126, 2011.
- MIDORIKAWA, G.E.O.; et al. Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 12–18, 2008.

MIDORIKAWA, G.E.O.; et al. Characterization of *Aspergillus* species on Brazil nut from the Brazilian Amazonian region and development of a PCR assay for identification at the genus level. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.

MIRANDA, D.D.; et al. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, v. 23, n. 4, p. 261–265, 2008.

MISHRA, V.; et al. Molecular diversity and detection of endophytic fungi based on their antimicrobial biosynthetic genes. In: SINGH, B.P.; Gupta, V.K. (Org.). **Molecular Markers in Mycology**; 1 ed. Switzerland: Springer Nature, 2017. p. 1-35.

MOGENSEN, J.M.; et al. *Aspergillus acidus* from Puerh tea and black tea does not produce ochratoxin A and fumonisin B<sub>2</sub>. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, n. 3, p. 141–144, 2009.

MONBALIU, S. et al. Multimycotoxin UPLC-MS/MS for tea, herbal infusions and the derived drinkable products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 24, p. 12664–12671, 2010.

MONCRIEF, I.; et al. Development of simple sequence repeat (SSR) markers for discrimination among isolates of *Fusarium proliferatum*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 126, p. 12–17, 2016.

MORAIS, E.C.; et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8316–8324, 2009.

MOREIRA, M.F.; et al. Occurrence of fungi and aflatoxins B in nuts and products marketed the Brazilian northeastern regions. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, p. 1-6, 2015.

MOSLEM, M.A.; et al. Molecular detection of ochratoxigenic *Aspergillus* species isolated from coffee beans in Saudi Arabia. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 4, p. 2292–2299, 2010.

NOONIM, P.; et al. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 1727–1734, 2008.

- O'DONNELL, K.; et al. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 6, p. 600–623, 2004.
- OVIEDO, M.S.; et al. Toxigenic profile and AFLP variability of *Alternaria alternata* and *Alternaria infectoria* occurring on wheat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 447–455, 2013.
- PALENCIA, E.R.; et al. Analyses of black *Aspergillus* species of peanut and maize for ochratoxins and fumonisins. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 5, p. 805–813, 2014.
- PALUMBO, J.D.; O'KEEFFE, T.L. Detection and discrimination of four *Aspergillus* section *Nigri* species by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 188–195, 2015.
- PAPPIER, U.; et al. Effect of processing for saponin removal on fungal contamination of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 153–157, 2008.
- PERRONE, G.; et al. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. **Fungal Biology**, v. 115, n. 11, p. 1138–1150, 2011.
- PERRONE, G.; et al. *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1032–1039, 2008.
- PERRONE, G.; et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 53–66, 2007.
- PERSSON, E.C. et al. Fumonisin B1 and risk of hepatocellular carcinoma in two Chinese cohorts. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 50, n. 3–4, p. 679–683, 2012.
- PETERSON, S.W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycologia**, v. 100, n. 2, p. 205–226, 2008.
- PETZINGER, E.; ZIEGLER, K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 2, p. 91–8, 2000.

PIMENTEL, G.D.; et al. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 5, p. 809–818, 2013.

PIMENTEL, I.C.; et al. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.-HIL.). **Floresta**, v. 36, n. 1, p. 123-128, 2006.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3 ed. New York: Springer, 2009, p. 535.

PITT, J.I.; SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: SAMSON, R.A.; PITT, J.I. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods of *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Amsterdam: Harwood Academic, 2000. p. 9-49.

PLAZA-BOLAÑOS, P.; FRENICH, A.G.; VIDAL, J.L.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 41, p. 6303–6326, 2010.

PROCTOR, R.H.; et al. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2424–2430, 2006.

QIU, M.; LIU, X.; WANG, Y.; ZHANG, C. Survey on the fumonisins intake and the urinary Sa/So ratio of people suffered from a high incidence of esophageal cancer. **Journal of Hygiene Research**, v. 30, n. 6, p. 365–367, 2001.

QUEIROZ, K. Ernst Mayr and the modern concept of species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 6600-6607, 2005.

REIS, T.A.; et al. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 2, p. 61–68, 2012.

REVERBERI, M.; et al. Lipoperoxidation affects ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* and its interaction with wheat seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1935–1946, 2010.

ŘEZÁČOVÁ, V.; KUBÁTOVÁ, A.; V KUBÁTOVÁ, Ř. Saprobic microfungi in tea based on *Camellia sinensis* and on other dried herbs. **Czech Mycology**, v. 57, n. 2, p. 79–89, 2005

REZENDE, E.F.; et al. Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 377–384, 2013.

RHEEDER, J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v. 82, n. 3, p. 353-357, 1992.

RINTOUL, T.L.; EGGERTSON, Q.A.; LÉVESQUE, C.A. Multigene phylogenetic analyses to delimit new species in fungal plant pathogens. In: BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J. (Org.). **Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols**. 1 ed. New York: Humana Press., 2012. p. 549–569.

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

SAGE, L. et al. Fungal flora and ochratoxin a production in grapes and musts from france. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 5, p. 1306–1311, 2002.

SALGADO-SALAZAR, C.; et al. Phylogeny and taxonomic revision of *Thelonectria discophora* (Ascomycota, Hypocreales, Nectriaceae) species complex. **Fungal Diversity**, v. 70, n. 1, 2014.

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

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

SANCHEZ-HERVAS, M.; et al. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 336–340, 2008.

SANTOS, L.; et al. Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 10, p. 1802–1807, 2009.

SANTOS-CISCON, B.A; et al. *Aspergillus* species from Brazilian dry beans and their toxigenic potential. **International Journal of Food Microbiology**, v. 292, p. 91–100, 2019.

SCHMIDT, H.; et al. Detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* in green coffee by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 464–469, 2004.

SCHOCH, C.L.; et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.

SCOTT, P.M.; FULEKI, T.; HARWIG, J. Patulin content of juice and wine produced from moldy grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 434–437, 1977.

SEAB. (Secretaria de Estado de Agricultura e Abastecimento). 2018. Produtos Florestais Erva-Mate. Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/erva\\_mate\\_2014\\_2015.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/erva_mate_2014_2015.pdf), 12 de jul. de 2018.

SECOR, G.A.; et al. Characterization of *Fusarium secorum*, a new species causing *Fusarium* yellowing decline of sugar beet in north central USA. **Fungal Biology**, v. 118, n. 9, p. 764–775, 2014.

SEWRAM, V.; et al. Mate consumption and the risk of squamous cell esophageal cancer in uruguay. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 12, n. 6, p. 508–513, 2003.

SHAMIM, M.; et al. Assessing fungal biodiversity using molecular markers. In: SINGH, B.P.; Gupta, V.K. (Org.). **Molecular Markers in Mycology**; 1 ed. Switzerland: Springer Nature, 2017. p. 37–52.

SHARMA, V.; SALWAL, R. Molecular markers and their use in taxonomic characterization of *Trichoderma* spp. In: SINGH, B.P.; Gupta, V.K. (Org.). **Molecular Markers in Mycology**. 1 ed. Switzerland: Springer Nature, 2017. p. 37–52.

SILVA, C.F. et al. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food microbiology**, v. 25, n. 8, p. 951–957, 2008.

SILVA, C.F.; et al. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2–3, p. 251–260, 2000.

SNIF Sistema Nacional de informações Florestais. Produtos não madeiros. 2018. Disponível em: < <https://goo.gl/QmhEbm> >. Acesso em 12 de junho de 2018.

SOLFRIZZO, M.; et al. Comparison of urinary sphingolipids in human populations with high and low maize consumption as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 11, p. 1090–1095, 2004.

SORENSEN, A.; et al. *Aspergillus saccharolyticus* sp. nov., a black *Aspergillus* species isolated in Denmark. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 3077–3083, 2011.

SRINIVASAN, R.; SHANMUGAM, V. Post harvest management of black mould rot of onion. **Indian Phytopathology**, v. 59, n. 3, p. 333–339, 2006.

STEWART, J.E.; et al. Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: Incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2014.

SUGA, H.; et al. A single nucleotide polymorphism in the translation elongation factor 1alpha gene correlates with the ability to produce fumonisin in Japanese *Fusarium fujikuroi*. **Fungal Biology**, v. 118, n. 4, p. 402–412, 2014.

SUSCA, A.; et al. Comparison of species composition and fumonisin production in *Aspergillus section Nigri* populations in maize kernels from USA and Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 75–82, 2014.

SUSCA, A.; et al. Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. e1412, 2016.

SUSCA, A.; et al. Variation in the fumonisin biosynthetic gene cluster in fumonisin-producing and nonproducing black aspergilli. **Fungal Genetics and Biology**, v. 73, p. 39–52, 2014.

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

TANIWAKI, M.H.; et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 173–179, 2003.

TANIWAKI, M.H.; IAMANAKA, B.T.; FUNGARO, M.H.P. Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Coffee. In: SCHWAN, R. (Ed.), FLEET, G. (Ed.). **Cocoa and Coffee Fermentations**. Boca Raton: CRC Press, 2015.

TAYLOR, J.W.; et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, n. 1, p. 21–32, 2000.

TEIXEIRA, T.R. et al. Determination of ochratoxin A in wine from the southern region of Brazil by thin layer chromatography with a charge-coupled detector. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 4, n. 4, p. 289–293, 2011.

TERRA, M.F. et al. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 890–894, 2013.

TOMAN, J. et al. Transfer of ochratoxin A from raw black tea to tea infusions prepared according to the Turkish tradition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 1, p. 261–265, 2017.

TOURNAS, V.H.; RIVERA CALO, J.; SAPP, C. Fungal profiles in various milk thistle botanicals from US retail. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 1, p. 87–91, 2013.

TYSON, J.L.; FULLERTON, R.A. Effect of soil-borne inoculum on incidence of onion black mould (*Aspergillus niger*). **Horticultural and Arable Pathology**, v. 57, p. 138–141, 2004.

UPRETI, D.K. et al. **Recent advances in lichenology: Modern methods and approaches in Lichen systematics and culture techniques, volume 2**. Springer, 2015, p. 232.

URBANO, G.R.; et al. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 8, p. 1226–1230, 2001.

VAN DER MERWE, K.J.; STEYN, P.S.; FOURIE, L. 1304. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh. **Journal of the Chemical Society**, n. 1, p. 7083–7088, 1965.

VARGA, J.; et al. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: An update. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 59, n. 2, p. 151–167, 2015.

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

VELASCO, J.D. Species concepts should not conflict with evolutionary history, but often do. **Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, v. 39, n. 4, p. 407–414, 2008.

VIEGAS, C.; et al. Fungal contamination in green coffee beans samples: A public health concern. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2017.

- VIEIRA, N.O.; et al. Drinking yerba mate infusion: A potential risk factor for invasive fungal diseases? **Transplant Infectious Disease**, v. 12, n. 6, p. 565–569, 2010.
- VIJAY, N.; et al. Population genomic analysis reveals contrasting demographic changes of two closely related dolphin species in the last glacial. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 16, p. 4284–4295, 2017.
- VILELA, D.M.; et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1128–1135, 2010.
- VISAGIE, C.M.; et al. A phylogenetic revision of *Penicillium* sect. *Exilicaulis*, including nine new species from fynbos in South Africa. **IMA Fungus**, v. 7, n. 1, p. 75–117, 2016.
- VISAGIE, C.M.; et al. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 1–61, 2014.
- WARRIS, A. The biology of pulmonary aspergillus infections. **Journal of Infection**, v. 69, p. S36–S41, 2014.
- WELKE, J.E. et al. Determination of ochratoxin a in wine by high-performance thin-layer chromatography using charged coupled device. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 3, p. 441–446, 2010.
- WU, F.; GROOPMAN, J.D.; PESTKA, J.J. Public health impacts of foodborne mycotoxins. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, p. 351–372, 2014.
- YILMAZ, N.; et al. Taxonomic re-evaluation of species in *Talaromyces* section *Islandici*, using a polyphasic approach. **Persoonia**, v. 36, n. 1, p. 37–56, 2016.
- ZIEGENHALS, K.; JIRA, W.; SPEER, K. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in various types of tea. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 1, p. 83–91, 2008.
- ZOTTI, M. et al. Onychomycosis from *Aspergillus melleus*, a novel pathogen for humans. fungal identification and in vitro drug susceptibility. **Experimental Dermatology Denmark**, v. 24, n. 12, p. 966–968, 2015.