



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LARA MUNIQUE FERRACIN

**ANÁLISE ESTRUTURAL DE GENES POLICETÍDEOS  
SINTASES (*PKS*) DE *ASPERGILLUS NIGER***

LARA MUNIQUE FERRACIN

**ANÁLISE ESTRUTURAL DE GENES POLICETÍDEOS  
SINTASES (*PKS*) DE *ASPERGILLUS NIGER***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

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

Londrina  
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

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

F368a Ferracin, Lara Munique.

Análise estrutural de genes policetídeos sintases (*pks*) de *Aspergillus niger* / Lara Munique Ferracin. – Londrina, 2011.  
83 f. : il.

Orientador: Maria Helena Pelegrinelli Fungaro.

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. *Aspergillus niger* – Teses. 2. Fungos – Genética – Teses. 3. Micotoxinas – Teses. 4. Ocratoxinas – Teses. 5. Genes – Sequência de nucleotídeos – Teses.  
I. Fungaro, Maria Helena Pelegrinelli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.  
III. Título.

CDU 581.169

LARA MUNIQUE FERRACIN

**ANÁLISE ESTRUTURAL DE GENES POLICETÍDEOS SINTASES  
(PKS) DE *ASPERGILLUS NIGER***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo  
ESALQ – Piracicaba – SP

---

Dr<sup>a</sup>. Fernanda Gonzales Paião  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Laurival Antonio Vilas-Boas  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Cristina Furlaneto  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 19 de agosto de 2011.

**Dedico especialmente este trabalho**

*Aos meus pais, Nivaldo e Marissuze, que sempre me apoiaram e me fizeram acreditar nas realizações dos meus sonhos.*

**Ofereço especialmente este trabalho**

*À minha orientadora, professora Maria Helena Pelegrinelli Fungaro,  
pelos ensinamentos, apoio, dedicação e confiança.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente na minha vida e tornar tudo possível.

À minha orientadora, professora Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, pela orientação, por seu exemplo de profissionalismo, pela dedicação, motivação, oportunidade e incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

À Capes, pelo apoio financeiro concedido.

À professora Dr<sup>a</sup>. Cláudia Barros Monteiro-Vitorello, pelos valiosos ensinamentos, pela colaboração, receptividade e apoio.

À professora Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Carneiro Vieira e ao Dr. Alessandro de Mello Varani, pelas contribuições.

Aos professores Dr. João Lúcio de Azevedo, Dr. Laurival Antonio Vilas-Boas e Dr<sup>a</sup>. Márcia Cristina Furlaneto, e à Dr<sup>a</sup>. Fernanda Gonzales Paião, pela disponibilidade em participar da banca de defesa de tese.

Às professoras Dr<sup>a</sup>. Daniele Sartori e Dr<sup>a</sup>. Marina Venturini Copetti, por aceitarem participar da banca de defesa de tese como suplentes.

Às professoras Dr<sup>a</sup>. Rosa Elisa Carvalho Linhares e Dr<sup>a</sup>. Floristhér Elaine Carrara-Marrone, pela participação e pela colaboração durante o exame de qualificação.

À Dr<sup>a</sup>. Marta Hiromi Taniwaki e Dr<sup>a</sup>. Beatriz Thie Iamanaka, pelas colaborações.

Ao professor Dr. Massami Shimokomaki.

À professora Dr<sup>a</sup>. Daniele Sartori, pela companhia, pelas contribuições e por todo apoio e amizade.

Aos amigos do laboratório, pelos inúmeros momentos agradáveis durante nossa convivência.

À equipe dos laboratórios das professoras Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Ehara Watanabe e Dr<sup>a</sup>. Márcia Cristina Furlaneto, pelas colaborações.

Aos meus pais, Nivaldo e Marissuze, por serem meus melhores exemplos, às minhas irmãs, Ingryt e Márjore, e ao Sérgio El Khouri da Mota, por todo carinho, apoio e torcida.

Muito Obrigada!



*“Suba o primeiro degrau com fé.  
Não é necessário que você veja toda  
a escada. Apenas dê o primeiro  
passo”.*

*Martin Luther King*

FERRACIN, Lara Munique. **Análise Estrutural de Genes Policetídeos Sintases (*pks*) de *Aspergillus niger***. 2011. 83f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2011.

## RESUMO

Os genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo secundário geralmente encontram-se agrupados um ao lado do outro, ditos em *clusters*. Estes *clusters* gênicos comumente contêm genes que codificam hidrolases, oxidases, metilases, proteínas reguladoras e proteínas de transporte que estão adjacentes a genes que codificam para policetídeos sintases (PKS) e peptídeos não-ribossomais sintases (NRPS). Devido os genes *pks* e *nrps* serem característicos de metabolismo secundário, um procedimento apropriado para encontrar *clusters* associados a um dado processo, é primeiramente buscar estes genes típicos e depois examinar as adjacências. Embora *Aspergillus niger* seja um fungo há muitos anos utilizado para obtenção de produtos destinados à indústria de alimentos, mais recentemente foi descrita a habilidade de algumas linhagens desta espécie em produzir micotoxinas, tais como ocratoxina A e fumonisina (FB<sub>2</sub> e FB<sub>4</sub>). Nesta tese, análises de bioinformática foram aplicadas para inventariar genes *pks* de dois genomas de *A. niger* (CBS 513.88 e ATCC 1015) visando a identificação de *clusters* relacionados ao metabolismo secundário que sejam linhagem-específicos. A comparação *in silico* de 34 genes *pks* preditos na linhagem CBS 513.88 com os genes presentes no genoma da linhagem ATCC 1015 desta mesma espécie, revelou alta identidade de sequências de nucleotídeos para 31 deles (91%). No entanto, a linhagem CBS 513.88 possui três genes *pks* (An01g01130, An11g05940 e An15g07920) em que homólogos não são encontrados em ATCC 1015. Baseando-se em sequências de nucleotídeos de CBS 513.88 depositada no banco de dados do NCBI, pares de *primers* de PCR foram idealizados e usados na investigação destes genes únicos em 119 linhagens de *A. niger* coletadas de diferentes substratos e regiões geográficas. Amplicons dos genes *pks* An01g01130, An11g05940 e An15g07920 foram detectados, respectivamente, em 97%, 71% e 26% das linhagens. A identidade destes amplicons foi confirmada por sequenciamento. Devido um dos genes *pks* linhagem-específico (An15g07920) estar localizado em um *cluster* possivelmente envolvido na biossíntese de ocratoxina A, investigações adicionais acerca deste gene foram conduzidas. A capacidade de produção de ocratoxina A das 119 linhagens de *A. niger* foi avaliada. Um total de trinta e um isolados (26%) foi produtor desta micotoxina. Uma associação positiva entre a presença de amplicons correspondente ao gene An15g07920 e a capacidade das linhagens produzirem a referida toxina, foi claramente demonstrada. Dados de *Southern blot* confirmaram a associação entre a presença do gene An15g07920 e produção da ocratoxina A.

**Palavras-chave:** *Aspergillus niger*. Policetídeos sintases linhagem-específicas. Ocratoxina A. Metabólitos secundários. Micotoxinas.

FERRACIN, Lara Munique. **Structural Analysis of polyketide synthase genes (*pks*) of *Aspergillus niger***. 2011. 83f. Thesis (Doctoral Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2011.

## ABSTRACT

Genes associated with secondary metabolite biosynthesis are often clustered in filamentous fungi. These clusters generally harbor genes encoding for polyketide synthases (PKS) and nonribosomal peptide synthetases (NRPS) neighboring to ones encoding for hydrolases, oxidases, methylases, transporters, and regulatory proteins. As PKS and NRPS are characteristically related to with secondary metabolism, an appropriate approach to find a novel biosynthetic pathway is to explore genome sequences for those genes first and then investigating adjacent regions. *Aspergillus niger* is one of the most important microorganisms used for biotechnological purposes, however mycotoxin, (such as ochratoxin A and fumonisina FB<sub>2</sub> e FB<sub>4</sub>) production in some strains from this species has been recently described. In this thesis, bioinformatic approaches were applied to the *pks* gene inventory of two *A. niger* genome (CBS 513.88 and ATCC 1015) aiming the identification of strain-specific gene clusters for secondary metabolism pathways. *In silico* comparison of 34 putative *pks* genes in *Aspergillus niger* CBS 513.88 versus *A. niger* ATCC 1015 genome revealed significant nucleotide identity for 31 of them (91%). *A. niger* CBS 513.88 harbors three putative *pks* genes (An01g01130, An11g05940 and An15g07920) for which nucleotide identity were not found in *A. niger* ATCC 1015. Based on the nucleotide sequence from *A. niger* CBS 513.88 deposited in the NCBI database primer pairs were designed and used in an attempt to amplify regions of the An15g07920 gene from 119 wild type *A. niger* strains obtained from different substrates and geographical regions. PCR amplification signal for the An01g01130, An11g05940 and An15g07920 *pks* genes were detected in only, respectively, 97%, 71% and 26% of the strains. The identities of these amplicons were confirmed by nucleotide sequencing. Because the cluster in which An15g07920 *pks* is located was annotated as a putative ochratoxin cluster, we concentrated our investigation on it. The ochratoxin A production capability by each of the strains here studied were assessed. In our sample, 26% (31/119) of the strains evaluated were able to produce OTA. A positive association between amplicon detection and the strains capability of ochratoxin producing were found. The realities of the PCR data were confirmed by Southern blot analyses, supporting a clear association between the An15g07920 *pks* gene and OTA phenotype.

**Keywords:** *Aspergillus niger*. Strain-specific polyketide synthase. Ochratoxin A. Secondary metabolites. Mycotoxin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão Bibliográfica

<b>Quadro 1</b> – Espécies e linhagens de <i>Aspergillus</i> que possuem o genoma sequenciado.....	21
<b>Quadro 2</b> – Composição característica da ocratoxina A e metabólitos derivados.....	33
<b>Figura 1</b> – Organização geral dos domínios de: (A) NR-PKS; (B) PR-PKS e (C) HR-PKS .....	27
<b>Figura 2</b> – Fórmula estrutural da OTA.....	32
<b>Figura 3</b> – Estrutura geral das ocratoxinas.....	33
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática da via biossintética de OTA.....	34
<b>Figura 5</b> – Estrutura química da Fumonisina B1 .....	38
<b>Figura 6</b> – Representação esquemática do cluster gênico de fumonisina e seus genes flaqueadores descrito para <i>F. verticillioides</i> . .....	41
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática da via biossintética de fumonisina B1.....	42
<b>Figura 8</b> – Genes do cluster da biossíntese de fumonisina em <i>G. moniliformis</i> que são ortólogos a um conjunto de genes em <i>A. niger</i> 4 .....	43

### Artigo Científico

<b>Figure 1</b> - Comparative sequence analysis of the putative ochratoxin gene cluster harboring PKS An15g07920 of <i>A. niger</i> CBS 513.88, and equivalent genomic regions of <i>A. niger</i> ATCC 1015 and <i>A. carbonarius</i> ITEM 5010 v3 .....	76
<b>Figure 2</b> - Dendrogram showing amino acid sequence similarity relationships among selected PKSs.....	77
<b>Figure 3</b> - (A) A phylogenetic tree of <i>Aspergillus</i> from section <i>Nigri</i> based on $\alpha$ -tubulin gene sequences. (B) RAPD profiles of 39 <i>A. niger</i> strains using the primer OPX-7 .....	78
<b>Figure 4</b> - Schematic representation and domain architecture of the PKS An15g07920 (GenBank: CAK42679.1).....	79
<b>Figure 5</b> - Association between An15g07920 and OTA production capability of each strain, as demonstrated by PCR performed with two primer pairs,	

PKS15CMeT (A) and PKS15KS (B) ..... 80

**Figure 6** - Association between An15g07920 and OTA production capability of each strain, as demonstrated by Southern blot analysis of randomly selected *A. niger* OTA producing (lanes 1-7) and OTA non-producing strains (lanes 8-12)..... 80

## LISTA DE TABELAS

Artigo Científico

<b>Table 1</b> - Target gene, designation, sequence, annealing temperature, and expected amplicon size, of the primer pairs used in the study.....	81
<b>Table 2</b> - A comparison of 34 predicted pks sequences present in A niger CBS 513.88 against A. niger ATCC 1015 genome, performed using JGI BLAST search.....	82

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ACP</b>	Proteína carreadora de acil
<b>AMFEP</b>	<i>Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products</i>
<b>AMP</b>	Domínio de adenilação
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AT</b>	Acil transferase
<b>CDS</b>	<i>Coding Sequence</i> (Sequência Codificadora)
<b>C-MeT</b>	Metiltransferase
<b>COM</b>	Domínio de condensação
<b>BEM</b>	<i>Balkan Endemic Nephropathy</i> (Nefropatia Endêmica dos Balcãs)
<b>DH</b>	Desidratase
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>D.O.U.</b>	Diário Oficial da União
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i>
<b>ER</b>	Enoil redutase
<b>FB</b>	Fumonisinias série B
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>GOLD</b>	<i>Genome OnLine Database</i>
<b>GRAS</b>	<i>Generally Recognized as Safe</i>
<b>HPN</b>	Híbrido PKS-NRPS
<b>HR-PK</b>	Policetídeo altamente reduzido
<b>HR-PKS</b>	Policetídeo sintase altamente redutora
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>JGI</b>	<i>Joint Genome Institute</i>
<b>Kb</b>	<i>Kilobase</i>
<b>KR</b>	Cetoredutase
<b>KS</b>	$\beta$ -cetoacilsintase
<b>LMT</b>	Limites Máximos Tolerados
<b>Mb</b>	Megabases
<b>MC</b>	<i>Czapek-Dox Medium</i>
<b>ME</b>	<i>Malt Extract Médium</i>
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NITE</b>	<i>National Institute of Technology and Evaluation</i>
<b>NR-PK</b>	Policetídeo não reduzido
<b>NR-PKS</b>	Policetídeo sintase não redutora
<b>NR-PS</b>	Peptídeo não-ribossomal sintase
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i> (Quadro de Leitura Aberto)
<b>OTA</b>	Ocratoxina A
<b>pb</b>	Par de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
<b>PDA</b>	<i>Potato Dextrose Agar</i>
<b>PK</b>	Policetídeo
<b>PKS</b>	Policetídeo sintase
<b>ppm</b>	Parte por milhão
<b>PR-PK</b>	Policetídeo parcialmente reduzido
<b>PR-PKS</b>	Policetídeo sintase parcialmente redutora
<b>RAPD</b>	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (Polimorfismo do DNA amplificado ao acaso)
<b>SMURF</b>	<i>Secondary Metabolite Unique Regions Finder</i>
<b>SSH</b>	<i>Suppression Subtractive Hybridization</i>
<b>TE</b>	Tioesterase
<b>t-RNA</b>	RNA transportador
<b>U. S. DOE</b>	<i>United States Department of Energy</i>
<b>YES</b>	<i>Yeast Extract Sucrose</i>



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1	ASPERGILLUS NÍGER.....	18
2.2.	GENÔMICA DE ASPERGILLUS NÍGER.....	20
2.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E POLICETÍDEOS FÚNGICOS.....	24
2.4.	MICOTOXINAS.....	27
2.5	OCRATOXINA A.....	29
2.6	ASPECTOS GENÉTICOS DA BIOSÍNTESE DE OCRATOXINA A.....	31
2.7	FUMONISINA.....	37
2.8.	ASPECTOS GENÉTICOS DA BIOSÍNTESE DE FUMONISINA.....	40
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	44
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	57
5.1	ARTIGO: STRAIN-SPECIFIC POLYKETIDE SYNTHASE GENES (PKS) OF ASPERGILLUS NIGER STRICTO SENSU.....	57
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	83

## 1 INTRODUÇÃO

*Aspergillus niger* é fungo pertencente à seção *Nigri* que há muitos anos é utilizado para obtenção de produtos destinados à indústria de alimentos. Ácido cítrico, amilases, celulasas, lipases e proteases são exemplos de produtos com *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*) obtidos de *A. niger*.

Os caracteres morfológicos nem sempre são suficientes para discriminar *A. niger* das outras espécies pertencentes a esta seção. Por apresentarem diferenças muito sutis, *A. niger* não se distingue morfológicamente de *A. tubingensis*, *A. brasiliensis* e *A. foetidus*, constituindo um grupo conhecido como “agregado *A. niger*”. Análises de sequências de nucleotídeos e de perfil de extrólitos, aliadas aos dados morfológicos, tornam-se importantes ferramentas para discriminação destas espécies. Apesar da semelhança morfológica, as espécies do agregado *A. niger* diferem com relação à produção de metabólitos secundários, dentre os quais, destacam-se as micotoxinas. Este termo refere-se a um grupo de moléculas tóxicas naturais, de baixo peso molecular e de diferentes estruturas químicas. Sabe-se atualmente que dentre os “taxa” do agregado *A. niger*, a espécie *Aspergillus niger sensu stricto*, mas não outras, possui a habilidade de produzir a micotoxina denominada ocratoxina A (OTA). Mais recentemente também foi descrita a capacidade de *A. niger sensu stricto* produzir micotoxinas da classe das fumonisinas (FB<sub>2</sub> e FB<sub>4</sub>). O potencial de outras espécies da seção *Nigri* para produzir fumonisinas ainda está em fase de investigação por diferentes grupos de pesquisadores.

A produção de metabólitos secundários é um processo complexo que requer várias etapas enzimáticas. Os genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo secundário não são expressos constitutivamente e geralmente encontram-se organizados um ao lado do outro, ou seja, em *clusters*. Este agrupamento gênico comumente contém genes que codificam hidrolases, oxidases, metilases, proteínas reguladoras e proteínas de transporte que estão adjacentes a genes que codificam para policetídeos sintases (PKS) e peptídeos não-ribossomais sintases (NRPS). Devido os genes *pks* e *nrps* serem característicos de metabolismo secundário, um método conveniente para encontrar *clusters* associados a este processo, é primeiramente buscar estes genes típicos e depois examinar as adjacências.

O marcante desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento e comparação de genomas inteiros têm permitido elucidar peculiaridades do metabolismo secundário de espécies fúngicas, inclusive de *A. niger*. Os projetos genomas de diferentes espécies de *Aspergillus* já revelaram que estes micro-organismos possuem um grande número

de genes característicos da biossíntese de metabólitos secundários, muitos deles ainda por serem desvendados. Dentre os fungos filamentosos, *A. niger* é uma das poucas espécies que já teve o genoma completo sequenciado para mais de uma linhagem. Até o momento, foram sequenciadas três linhagens desta espécie, e as sequências obtidas para duas delas foram disponibilizadas aos pesquisadores por meio do depósito das sequências de nucleotídeos em banco de dados públicos. Este fato tem permitido a realização de estudos comparativos *in silico* com vistas à melhor compreensão da biossíntese de metabólitos secundários em *A. niger*. Apesar disso, dados experimentais *in vivo* estabelecendo associações entre genes preditos do metabolismo secundário e fenótipos, ainda são limitados.

Em *A. niger*, a capacidade de produzir a ocratoxina A é variável entre os isolados. Estima-se que somente de 2-10% dos isolados desta espécie apresentam o fenótipo ocratoxina A positivo, mas até o momento, não se conhece a causa genética desta variação fenotípica.

Neste trabalho procedeu-se a análise comparativa *in silico* dos genes que codificam para PKSs presentes nas linhagens CBS 513.88 e ATCC 1015. Três genes putativos para a codificação de PKSs foram encontrados exclusivamente na linhagem CBS 513.88, e defende-se a tese de que um deles está associado com a produção de ocratoxina A.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *ASPERGILLUS NIGER*

*Aspergillus* pertencentes à seção *Nigri* (*Aspergillus* negros) são fungos de ampla distribuição na natureza e considerados comuns em alimentos deteriorados. No âmbito da biotecnologia microbiana, estes micro-organismos se configuram como um dos mais importantes, uma vez que contemplam linhagens domesticadas aptas à produção de metabólitos relevantes para a indústria, especialmente do segmento alimentício. Ácido cítrico, amilases, celulasas, lipases e proteases, são exemplos de produtos obtidos em escala industrial a partir desta classe de fungos, que são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) pelo *United States Food and Drug Administration* (FDA – Código 21 da Resolução Federal 173.120).

A importância biotecnológica destes fungos data do ano de 1913, quando Zahorsky descreveu sua notável capacidade de produzir ácido cítrico (citado por BENNETT e LASURE, 1985). O ácido cítrico é o principal acidulante utilizado na indústria de alimentos e bebidas como, por exemplo, em refrigerantes, sucos de frutas, geléias, doces e vinhos sendo também empregado nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de higiene pessoal. Embora este ácido possa ser produzido por outras espécies fúngicas, *A. niger*, no sentido amplo, é genericamente aceito como o produtor mais rentável e com pouca formação de produtos secundários indesejáveis (SCHUSTER et al., 2002).

Os fungos pertencentes à seção *Nigri* se caracterizam por apresentar conídios de coloração marrom-escuro a negra medindo de 3,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro, conidióforos uniseriados ou bisseriados, vesículas esféricas e hifas hialinas ou levemente pigmentadas no ápice (KLICH e PITT, 1998). A taxonomia desta seção é complexa e dinâmica, de forma que mudanças de nomenclaturas têm ocorrido com frequência. Os primeiros estudos relacionados à seção *Nigri* descreviam um número de 12 espécies e duas variedades (RAPER e FENNELL, 1965). Anos depois, Al-Musallam (1980), revisou a taxonomia deste grupo baseando-se em caracteres morfológicos, tendo reconhecido apenas 5 espécies. Dentre elas, *A. niger* é descrito como um agregado constituído de sete variedades e duas formas. Em seguida, Kozakiewicz (1989), sugeriu 16 “taxa” para esta seção. Estas revisões citadas estão em desuso atualmente.

Aliada aos dados de morfologia, a sistemática atual destes *Aspergillus* é enormemente influenciada por dados de sequências de nucleotídeos e de perfil de extrólitos

(FRISVAD e SAMSON, 2004). O uso conjunto destes três tipos de dados para resolução de problemas taxonômicos tem sido designado de “taxonomia polifásica”. Atualmente, 17 espécies são reconhecidas na seção *Nigri*: *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger*, *A. turingensis* (revisado por SAMSON et al., 2004) e *A. vadensis*, *A. ibericus* e *A. uvarum* (de VRIES et al., 2005; SERRA et al., 2006; PERRONE et al., 2008, respectivamente).

As diferenças entre algumas espécies desta seção são extremamente sutis e sua discriminação requer a análise molecular. *Aspergillus niger sensu stricto*, *A. turingensis*, *A. foetidus* e *A. brasiliensis* são morfologicamente idênticos e coletivamente são chamados de “agregado *A. niger*” (PARENICOVÁ et al., 2001). Embora os “taxa” incluídos no agregado *A. niger* sejam morfologicamente indistinguíveis, estes podem diferir com relação à capacidade de produção de alguns metabólitos secundários, inclusive de uma micotoxina denominada ocratoxina A (OTA). A título de exemplo, dentre as espécies do agregado, somente a espécie *A. niger sensu stricto* é reconhecida como produtora desta micotoxina.

Considerando que a correta identificação destes fungos é de fundamental relevância para fins diversos, vários pesquisadores dedicaram esforços em descrever metodologias moleculares para fácil e rápida identificação de alguns membros da seção *Nigri* (FUNGARO et al., 2004; PERRONE et al., 2004; SCHIMIDT et al., 2004; SARTORI et al., 2006).

A longa trajetória do uso seguro de *A. niger* na indústria induziu a utilização desta espécie como hospedeiro de expressão de proteínas heterólogas. Segundo dados da AMFEP (2009), algumas enzimas como aminopeptidase, arabinanase, arabinofuranosidade, catalase, glicose-oxidase, entre outras, são comumente expressas nesta espécie.

A descoberta de que *A. niger* é capaz de produzir a micotoxina OTA ocorreu em 1994 (ABARCA et al., 1994), e despertou certa surpresa e apreensão aos pesquisadores. Infelizmente, vários trabalhos posteriores vieram para confirmar a capacidade desta espécie em produzir este metabólito secundário (ACCENSI et al., 2001; TANIWAKI et al., 2003; FRISVAD et al., 2007). Em *A. niger*, a capacidade de produzir a OTA é variável entre os isolados. Estima-se que somente entre 2 e 10% dos isolados apresentam o fenótipo OTA positivo. Apesar disso, há de se reconhecer *A. niger* como importante fonte de OTA em função da alta frequência com que esta espécie é encontrada na natureza. Contudo, até o momento, não se conhece a causa genética desta intrigante variação fenotípica.

Igualmente preocupante, Frisvad et al. (2007) relataram a produção de

fumonisina por esta espécie. Apesar de ser uma descoberta recente e existir um número relativamente pequeno de publicações a respeito, há indícios de que a frequência de linhagens de *A. niger* produtoras de fumonisina seja maior do que a descrita para a produção de OTA (MOGENSEN et al., 2010a). De tal modo, a presença desta micotoxina, assim como a ocratoxina A em produtos consumíveis, apresenta impactos relevantes para a saúde e para a economia mundial.

## 2.2 GENÔMICA DE *ASPERGILLUS NIGER*

Apesar da importância biotecnológica dos fungos filamentosos, até muito recentemente pouco se conhecia sobre a estrutura, função e expressão dos genes destes microorganismos. O sequenciamento do genoma de *Neurospora crassa*, descrito em 2003 por Galagan e colaboradores, se configurou como marco inicial nos estudos genômicos de fungos filamentosos (GALAGAN et al., 2003). Poucos anos depois, foram sequenciados os primeiros genomas de espécies do gênero *Aspergillus*. Em 2005, foram publicados os dados do sequenciamento dos genomas de *A. nidulans*, *A. fumigatus* e *A. oryzae* (GALAGAN et al., 2005a; NIERMAN et al., 2005; MACHIDA et al., 2005, respectivamente), e no ano seguinte, o de *A. flavus*. (PAYNE et al., 2006). Desde então, o número de projetos com o objetivo de sequenciar genomas fúngicos cresceu, porém incremento significativo foi observado somente nos anos mais recentes, ou seja, após o advento das técnicas de sequenciamento ditas de segunda e terceira geração. No Quadro 1, apresenta-se uma lista de espécies de *Aspergillus* para as quais o sequenciamento completo dos genomas já foi realizado.

**Quadro 1** - Espécies e linhagens de *Aspergillus* que possuem o genoma sequenciado.

<b>Espécie</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Banco de Dados Disponível</b>
<i>A. aculeatus</i>	ATCC 16873	-
<i>A. carbonarius</i>	IMI 388653	-
<i>A. clavatus</i>	NRRL 1	J. Craig Venter Institute; NCBI

**Quadro 1** -Espécies e linhagens de *Aspergillus* que possuem o genoma sequenciado(conclusão)

<i>A. fischeri</i>	NRRL 181	-
<i>A. flavus</i>	NRRL3357	-
<i>A. fumigatus</i>	Af293	NCBI; Integr8; Sanger Institute; GeneDB; Institut Pasteur
<i>A. fumigatus</i>	A1163	J. Craig Venter Institute
<i>A. nidulans</i>	FGSC A4	NCBI; Broad Institute
<i>A. niger</i>	CBS 513.88	NCBI; Integr8
<i>A. niger</i>	NRRL3	-
<i>A. niger</i>	ATCC 1015	-
<i>A. oryzae</i>	RIB40	NCBI; NITE
<i>A. parasiticus</i>	-	Univ. de Oklahoma; NCBI
<i>A. terreus</i>	ATCC 20542	NCBI
<i>A. terreus</i>	NIH2624	NCBI; Broad Institute

**Fonte:** Genome OnLine Database (GOLD): <http://www.genomesonline.org/>

(-) dados não informados pelo programa GOLD.

Considerando a importância industrial de *A. niger*, torna-se de alta relevância o conhecimento de seu genoma, tanto em nível estrutural como funcional, para que se possa aprofundar o conhecimento de seu potencial metabólico e aplicar modernas tecnologias para aproveitamento e/ou melhoramento de propriedades desejadas (SUN et al., 2007). É provavelmente decorrente deste fato que *A. niger* é uma das poucas espécies de fungos filamentosos que já teve o genoma de três linhagens sequenciado.

A linhagem CBS 513.88 foi a primeira delas, por iniciativa da empresa holandesa DSM em colaboração com a *Gene Alliance* (PEL et al., 2007). *Aspergillus niger* CBS 513.88 é um mutante derivado da linhagem NRRL 3122 (também catalogada como ATCC 22343 e CBS 115989), desenvolvido através do processo de mutação-seleção recorrente para a produção comercial de glicoamilase.

O genoma da linhagem NRRL 3 (também cadastrada como ATCC 9029, CBS 120.49 e N400) foi sequenciado pela *Integrated Genomics*, mas, conforme citado por Sun et al. (2007), não apresenta suas sequências disponibilizadas em banco de dados públicos.

Uma terceira linhagem de *A. niger*, a ATCC 1015 (também catalogada como NRRL 328 e CBS 113.46) teve seu genoma sequenciado através da colaboração entre

U.S. Department of Energy (DOE) e Joint Genome Institute (JGI). O início da anotação do genoma desta linhagem ocorreu em 2006 e as sequências obtidas (ainda que incompletas) foram disponibilizadas no site <http://www.jgi.doe.gov/aspergillus> (segundo BAKER, 2006). Muito recentemente, em maio de 2011, Andersen e colaboradores obtiveram uma versão mais completa do genoma de ATCC 1015 e a disponibilização dos novos dados no NCBI está prestes a ocorrer. É importante ressaltar que as sequências adicionais da linhagem ATCC 1015 também foram utilizados para melhorar as informações do genoma da linhagem CBS 513.88 (ANDERSEN et al., 2011).

No trabalho de Pel e colaboradores (2007), se apresenta o sequenciamento de 33,9 megabases (Mb) do genoma de *A. niger* CBS 513.88, organizadas em 8 cromossomos. Um total de 14.165 ORFs foi identificado, dentre as quais 6.506 com funções preditas. Segundo a análise destes pesquisadores, 8.695 ORFs são ortólogas a *A. nidulans*, *A. fumigatus* ou *A. oryzae*, e dentre estas 78% (6.755), apresentam sintenia em pelo menos uma destas três espécies. Além disso, 48% (4.189) das ORFs são sintênicas nestas quatro espécies de *Aspergillus*, evidenciando que grande parte do genoma de *A. niger* apresenta conservação gênica em relação às demais espécies deste gênero até o momento sequenciadas. Após recente revisão do genoma da linhagem CBS 513.88 (ANDERSEN et al., 2011), o tamanho do genoma sequenciado passou para 34,02 Mb e o número de ORFs para 14.042. Isso significa que na primeira anotação, houve uma superestimativa do número de ORFs.

Conforme já mencionado, dados do sequenciamento do genoma da linhagem ATCC 1015 estão disponibilizados no site [www.jgi.doe.gov/Aspergillus](http://www.jgi.doe.gov/Aspergillus). Embora não haja uma divulgação formal do sequenciamento do genoma da linhagem ATCC 1015, a publicação de Baker (2006), se caracterizou como o primeiro relato que apresenta e discute aspectos do sequenciamento desta linhagem. Para esta linhagem tem-se 34,85 Mb sequenciados, com 11.200 ORFs, distribuídas em 8 cromossomos (BAKER, 2006; ANDERSEN et al., 2011). Segundo Baker (2006), uma das descobertas mais intrigantes deste genoma, é a presença de genes relacionados ao *cluster* da biossíntese de uma classe de micotoxinas denominadas fumonisinas.

Ferramentas de bioinformática já estão disponíveis para a reconstrução e comparação de genomas entre espécies relacionadas, a fim de elucidar suas peculiaridades metabólicas (SUN et al., 2007). De acordo com estes autores, a comparação do genoma de *A. niger* com o genoma de outras espécies fúngicas revelou que mais de 4.000 CDSs são exclusivos desta espécie. No mesmo estudo, discute-se que *A. niger* possui uma elevada especificidade metabólica, visto que foram identificados mais de 1.100 genes (codificadores



de enzimas) característicos da espécie. Muitos destes genes podem ser cópias adicionais de genes comuns aos fungos, trazendo a hipótese que a multiplicidade genética seja uma estratégia de *A. niger* para manter sua versatilidade metabólica e sua capacidade de adaptação em ambientes adversos. Ressalta-se que 9 genes que codificam enzimas que participam da biossíntese de metabólitos secundários e da degradação de compostos aromáticos foram encontrados exclusivamente nesta espécie.

O sequenciamento de genomas de diversas espécies de *Aspergillus* promete, cada vez mais, contribuir para a identificação de elementos que definam cada uma das espécies, colaborando com a elucidação de mecanismos de patogenicidade, potencial biotecnológico e particularidades da fisiologia deste importante gênero fúngico (ANDERSEN e NIELSEN, 2009).

O fato de existir pelo menos três genomas completos de *A. niger* possibilita a realização de estudos com vistas à melhor compreensão sobre a biologia da espécie. Considerando que as sequências destes genomas são provenientes de linhagens distintas, é possível, através da realização de análises comparativas entre genomas (Genômica Comparativa), desvendar alguma diversidade intra-específica.

O sequenciamento de genomas tem se tornado cada vez mais fácil e acessível. Para organismos procarióticos estudos que relatam a comparação de genomas de diferentes linhagens de uma mesma espécie são cada vez mais frequentes. É decorrente desta possibilidade que surgiu, recentemente, o termo pan-genoma. Este termo refere-se à soma de todos os genes encontrados em um dado “taxa”. Dentro deste contexto, uma espécie pode ser descrita pelo seu pan-genoma, que é composto de um “genoma core” contendo os genes presentes em todas as linhagens da referida espécie e um “genoma dispensável” que contém genes presentes em duas ou mais linhagens, bem como genes únicos a uma linhagem. Considerando que o número de genes dispensáveis é grande, o pan-genoma de uma espécie pode ser em várias ordens de magnitude, maior que qualquer genoma único (TETTELIN et al., 2008).

Ao contrário das bactérias, este tipo de abordagem é incipiente para fungos filamentosos, fruto de que ainda são raras as sequências de genomas de diferentes linhagens de uma mesma espécie. Apesar disso, acredita-se que as tecnologias de sequenciamento de genomas de terceira geração (“FLX 454”, “Illumina” e “SOLID”) aliadas ao desenvolvimento de métodos computacionais para a comparação de genomas, permitirão, em futuro muito próximo, o estabelecimento de pan-genomas para espécies fúngicas. Assim sendo, comparado a outras espécies de fungos, até o momento, *A. niger* ocupa um panorama privilegiado uma

vez que três genomas desta espécie já foram sequenciados.

Uma análise comparativa dos genomas das linhagens CBS 513.88 e ATCC 9029 realizada por Sun e colaboradores (2007), demonstrou que aproximadamente 600 genes são particulares de cada linhagem.

A comparação do genoma da linhagem ATCC 1015 com o genoma da linhagem CBS 513.88, realizada por Andersen et al. (2011), revelou que cerca de 400-500 genes são únicos a uma ou outra linhagem. Estes genes únicos estão distribuídos ao longo dos oito cromossomos de *A. niger* indicando um processo evolutivo com alta frequência de perdas ou aquisições de fragmentos gênicos.

Uma análise do número de genes provavelmente envolvidos com a biossíntese de metabólitos secundários, permitiu a identificação de genes codificadores de 33 policetídeos sintases (PKS), 15 peptídeos não-ribossomais sintases (NRPS) e 9 híbridos de PKS e NRPS (HPN), distribuídos no genoma da linhagem ATCC 1015 de *A. niger* (FISCH et al., 2009), contrapondo-se ao genoma da linhagem CBS 513.88 de *A. niger* (PEL et al., 2007), para o qual foram identificados genes codificadores de 34 PKS, 17 NRPS e 7 HPN. Por meio do uso da ferramenta BLASTP, Fisch et al. (2009), detectaram que genes codificadores de 4 PKSs, 1 NRPS e 2 HPNs são exclusivos da linhagem ATCC 1015. Em contrapartida, segundo os autores, a linhagem CBS 513.88 possui 7 genes que codificam PKSs para os quais não foram identificados homólogos em ATCC 1015. É de nosso entendimento que dados experimentais *in vivo*, utilizando-se de um número considerável de linhagens não domesticadas, são necessários para que se possam caracterizar estes genes como “dispensáveis” e estabelecer associações com fenótipos.

### 2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E POLICETÍDEOS FÚNGICOS

Metabólitos secundários são compostos que não apresentam função essencial para a sobrevivência e crescimento dos organismos que os produzem (BETINA, 1994), mas que podem estar associados a atividades relevantes, como por exemplo, na competitividade com outros seres vivos e na sobrevivência em ambientes inóspitos. Enquanto o metabolismo primário é comum a todas as espécies, visto que é necessário para a síntese e catabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, o metabolismo secundário é específico para uma determinada espécie ou linhagem. Apesar de não ser associada ao crescimento das células, a biossíntese dos metabólitos secundários é influenciada por sinais do ambiente (STEYN, 1998).

De acordo com Galagan et al. (2005b), os projetos genomas de diferentes espécies de *Aspergillus*, revelaram que estes micro-organismos possuem um grande número de genes característicos da biossíntese de metabólitos secundários, muitos deles ainda por serem desvendados. Antibióticos, fitotoxinas, pigmentos e micotoxinas, são alguns destes produtos naturais sintetizados por fungos filamentosos. Tais como muitos dos produtos provenientes do metabolismo primário, alguns metabólitos secundários de fungos são explorados industrialmente.

A produção destes metabólitos é um processo complexo que requer várias etapas enzimáticas. Normalmente está associada ao desenvolvimento morfológico do fungo, ao processo de esporulação, e com a fase estacionária de crescimento (BENNETT, 1995; CALVO et al., 2002).

Conforme revisto por Turner (2010), os genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo secundário não são expressos constitutivamente e geralmente encontram-se agrupados um ao lado do outro, ou seja, em *clusters*. Supõe-se que este agrupamento físico permita que os genes sejam co-regulados por meio da alteração da cromatina e que, além disso, facilite a transferência horizontal entre espécies. Estes *clusters* gênicos do metabolismo secundário usualmente contêm genes que codificam hidrolases, oxidases, metilases, proteínas reguladoras e proteínas de transporte que estão adjacentes a genes que codificam para policetídeos sintases (PKS) e peptídeos não-ribossomais sintases (NRPS). Pelo fato dos genes *pks* e *nrps* estarem associados somente com o metabolismo secundário, um método conveniente para encontrar *clusters* associados a este processo, é primeiramente buscar estes genes típicos e depois examinar as adjacências.

Os metabólitos secundários são classificados de muitas maneiras, de acordo com suas características químicas ou propriedades fisiológicas. Keller et al. (2005), classificaram estes compostos baseando-se nas classes de enzimas envolvidas na sua biossíntese. São quatro grupos descritos: “peptídeos não ribossomais”, “alcalóides indólicos”, “terpenos” e “policetídeos”. Dentre estes grupos de metabólitos secundários de fungos, os policetídeos são os mais abundantes e diversos com relação à estrutura química (O'HAGAN, 1991). Alguns policetídeos possuem propriedades agroquímicas e importância farmacológica por apresentarem atividades antimicrobianas, antiparasitária e antitumoral, despertando o interesse da indústria em sua exploração. Por outro lado, alguns policetídeos se caracterizam como toxinas que contaminam produtos destinados à alimentação humana. A diversidade e importância dos policetídeos promovem, cada vez mais, o interesse de grupos de pesquisadores em descobrirem novas estruturas de moléculas, novas funções, regulação

genética da produção, dentre outros.

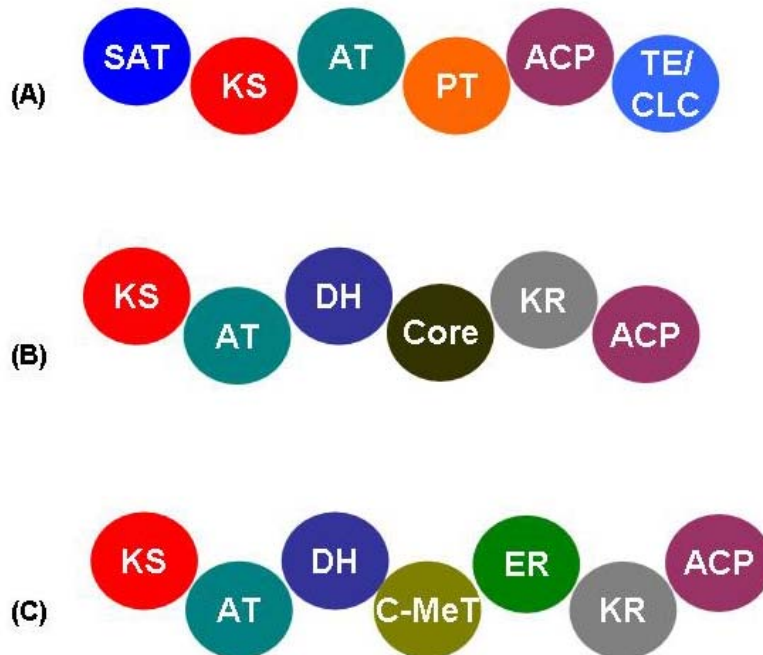
Os policetídeos (PK) são sintetizados através da intervenção das enzimas policetídeos sintases (PKSs). Estas enzimas são divididas em tipos I, II e III, de acordo com a quantidade de subunidades estruturais e com o modo de síntese dos policetídeos. As PKSs tipo I são proteínas multifuncionais, formadas por domínios funcionais individuais e são encontradas em bactérias e fungos. Esse tipo de PKS sintetiza os policetídeos mediante via modular ou interativa. Na via modular, a proteína é dividida em módulos consecutivos que são utilizados uma única vez. Na via interativa, a enzima é multifuncional constituída de uma única cópia de domínios que são utilizados repetidamente para a síntese do policetídeo. As PKSs tipo II consistem de proteínas individuais e são restritas a bactérias ao passo que as PKSs tipo III são mais simples estruturalmente e são encontradas em plantas, bactérias e fungos (COX, 2007).

Os policetídeos fúngicos são sintetizados por PKSs tipo I interativa as quais são compostas por pelo menos três domínios essenciais:  $\beta$ -cetoacilsintase (KS), proteína carreadora de acil (ACP) e acil transferase (AT). A síntese de policetídeos fúngicos é iniciada quando uma unidade de acetil-CoA ou malonil-CoA na forma de tioéster é transportada pelo domínio AT para a 4'-fosfopantoteína do domínio ACP (KELLER et al., 2005). Este conjunto protéico denominado de 4'-fosfopantoteína presente no domínio ACP, funciona como um “guindaste” utilizado no transporte de substratos e outros produtos intermediários dos diferentes sítios ativos presentes neste tipo de PKS (NELSON e COX, 2005). Em seguida, ocorre a condensação de outro tioéster vinculado ao domínio KS e a descarboxilação do domínio ACP (KELLER et al., 2005). Esse processo ocorre repetidas vezes e a cadeia policetídica formada é então liberada mediante catálise realizada pela tioesterase (domínio TE) (HENDRICKSON et al., 1999). Outros domínios ou enzimas podem estar acoplados aos já mencionados para executarem modificações específicas da molécula policetídica.

Neste contexto, a presença e/ou ausência de domínios redutores (cetoreductase (KR), desidratase (DH) e enoil redutase (ER)) na PKS, permite subdividir os policetídeos que dela se originam em: policetídeos não reduzidos (NR-PK), policetídeos parcialmente reduzidos (PR-PK) e policetídeos altamente reduzidos (HR-PK). O primeiro é decorrente da ausência, na PKS, dos domínios redutores, enquanto o segundo é decorrente de apenas dois domínios redutores (KR e DH) e o terceiro se caracteriza pela presença de todos os domínios redutores (KR, DH e ER) e processadores  $\beta$ -cetônicos (SCHÜMANN e HERTWECK, 2006). Algumas PKS apresentam ainda domínios de modificação, tais como de metiltransferase (C-MeT), de adenilação (AMP) e de condensação (CON) (KROKEN et al.,

2003; AMNUAYKANJANASIN et al., 2005). A título de ilustração, a Figura 1 mostra uma organização geral dos domínios das PKSs não redutora, parcialmente redutora e altamente redutora (HUFFMAN, et al., 2010).

**Figura 1** - Organização geral dos domínios de: (A) NR-PKS; (B) PR-PKS e (C) HR-PKS



**Fonte:** HUFFMAN et al. (2010), adaptação.

SAT: unidade de partida; ACP: transacilase; KS:  $\beta$ -cetoacilsintase; AT: aciltransferase; PT: modelo de produto (*product template*); ACP: proteína carreadora de acil; TE/CLC: tioesterase/Claisen ciclase; DH: desidratase; Core: domínio central de PR-PKS; KR: cetoreductase; C-MeT: C-metiltransferase; ER: enoilreductase.

O envolvimento de PKS na produção de micotoxinas tem sido relatado por vários autores (FENG e LEONARD, 1995; PROCTOR et al. 1999; O'CALLAGHAN et al., 2003; KIM et al., 2005). No contexto desta tese, apresentam-se nos próximos itens considerações gerais sobre a ocratoxina A e fumonisina, bem como alguns processos envolvidos na biossíntese destas micotoxinas. Na discussão da biossíntese da OTA e fumonisina, as PKS e os genes a elas associadas, serão analisados.

## 2.4 MICOTOXINAS

Micotoxina é uma denominação genérica designada a um grande grupo de moléculas tóxicas naturais de baixo peso molecular, de diferentes estruturas químicas, e provenientes do metabolismo secundário de algumas espécies fúngicas. São compostos que podem se acumular em esporos fúngicos, em fragmentos celulares, ou serem excretados no

substrato no qual o fungo está em crescimento, de modo que a sua ingestão, inalação ou absorção podem acarretar em prejuízo à saúde humana e animal.

Conforme revisto por Brase et al. (2009), as funções das micotoxinas não são conhecidas, mas acredita-se que estas desempenham papel importante na eliminação de outros micro-organismos concorrentes em um determinado ambiente. Dependendo de sua natureza química, as micotoxinas podem ser carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas, estrogênicas, neurotóxicas e imunotóxicas (YIANNIKOURIS e JOUANY, 2002).

As micotoxinas têm sido detectadas em vários produtos alimentares, porém sua presença em cereais se constitui em um dos maiores agravos à saúde humana e à economia mundial. Este fato é decorrente da quantidade com que estes produtos são ingeridos pelo homem e também pelos animais. Uma estimativa feita há alguns anos atrás revelou que de 25 a 40% dos cereais produzidos no mundo são contaminados por micotoxinas (PITTET, 1998; PFOHL-LESZKOWICZ, 2000). Além dos cereais, micotoxinas também vem sendo detectadas em grãos de café (LEVI et al., 1980, BOKHARI e ALY, 2009), em especiarias (FLANNINGAN e LLEWELLYN, 1986; VRABCHEVA, 2000; ZINEDINE et al., 2006), em frutas *in natura* (SWANSON, 1987; DRUSCH e RAGAB, 2003; MOSS, 2008; CRUZ-FERNÁNDEZ et al., 2010), em frutas secas (ZOHRI e ABDEL-GAWAD, 1993; DRUSCH e RAGAB, 2003), dentre outros produtos primários. Além disso, micotoxinas não são totalmente decompostas durante os estágios de processamento (lavagem, moagem, cozimento, fermentação, dentre outros) dos produtos *in natura*, e conseqüentemente, podem ser detectadas em alimentos processados, tais como pães (SCUDAMORE et al., 2009), cervejas (SCOTT, 1996), vinhos (DELAGE et al., 2003), chocolate (KUMAGAI et al., 2008), entre outros.

A literatura aponta que mais de 300 compostos são reconhecidos como pertencentes à classe das micotoxinas (COLE e COX, 1981), a qual está sub-dividida em grupos relacionados quimicamente. Até o momento, as micotoxinas reconhecidas por apresentarem maiores danos à saúde humana e animal pertencem à classe das aflatoxinas, dos tricotecenos, das fumonisinas, das zearalenonas, dos alcalóides do Ergot, e das ocratoxinas (CAST, 2003). Já as outras micotoxinas descritas, de acordo com Serra et al. (2005), são consideradas de menor importância devido à sua ocorrência limitada ou pela falta de evidência da sua toxicidade em humanos. De uma maneira geral, uma ampla gama de espécies fúngicas podem produzir micotoxinas, porém, as de maior relevância são produzidas principalmente por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (CAST, 2003). A presença de fungos em alimentos, não indica necessariamente a presença de micotoxinas,

pois a produção das mesmas depende de condições ambientais favoráveis, podendo ser formadas em várias fases da produção vegetal, como cultivo, colheita, secagem e armazenamento (CAST, 2003). Uma única espécie de fungo pode sintetizar mais de uma micotoxina. Por outro lado, uma espécie toxigênica nem sempre possui a totalidade dos isolados capaz de produzir uma toxina em questão. Abarca (2000), reforça que a produção de um determinado metabólito secundário depende do genótipo do fungo e de um conjunto de fatores ambientais que irão influenciar no crescimento e metabolismo da cepa.

Dependendo das condições de crescimento, *A. niger* pode produzir uma série de micotoxinas que variam com relação ao grau de toxicidade. No entanto, até o momento, somente as ocratoxinas e fumonisinas têm sido consideradas de relevância para a saúde pública dada às suas potencialidades tóxicas. Diante deste contexto, nos próximos itens desta revisão, serão enfatizados apenas estas duas classes de micotoxinas.

## 2.5 OCRATOXINA A

A ocratoxina A (OTA) foi isolada e descrita inicialmente como um metabólito secundário de *A. ochraceus* (van der MERWE et al., 1965a). Depois de sua descoberta em 1965, a produção desta micotoxina também tem sido associada a várias outras espécies, como por exemplo, espécies de *Penicillium*, que são as principais responsáveis pela contaminação de OTA em cereais e outros produtos vegetais em regiões de clima temperado, e *Aspergillus* spp. que têm maior ocorrência em regiões de clima tropical.

A OTA é classificada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), como um possível carcinógeno humano do grupo 2B (IARC, 1993). Mais tarde, a *European Food Safety Authority* (EFSA), elaborou um parecer com o objetivo de atualizar a avaliação de risco da OTA, considerando novos dados científicos. Consta neste parecer, que esta micotoxina é nefrotóxica a todas as espécies de animais estudadas e ainda exerce efeitos imunotóxicos, neurotóxicos e teratogênicos em doses elevadas (EFSA, 2006).

Segundo Ringot et al. (2006), a toxicidade da OTA está provavelmente relacionada com a sua capacidade de interagir com certas macromoléculas para formar espécies reativas, inibindo a respiração mitocondrial e para formar aductos com o DNA. Várias nefropatias afetando animais foram atribuídas à OTA, sendo que os suínos são os mais sensíveis à toxicidade desta micotoxina (EFSA, 2006). Em humanos, este metabólito secundário de fungos é associado a doenças renais, ao desenvolvimento de tumores no trato urinário e frequentemente citado como possível agente causador da Nefropatia Endêmica dos

Balcãs (BEN), uma síndrome que ocorreu em algumas áreas do sudeste da Europa e que se caracteriza pela contração dos rins devido à degeneração tubular, fibrose intersticial e hialinização dos glomérulos (KROGH et al., 1977; CASTEGNARO et al., 1991).

A exposição humana à OTA vem da contaminação de uma grande variedade de produtos alimentícios. Há uma lista imensa de trabalhos que relatam a presença de OTA em produtos destinados à alimentação humana. A título de exemplo destacam-se os seguintes produtos: grãos de café (MICCO et al., 1989; STUDER-ROHR et al., 1995; TANIWAKI et al., 2003; PARDO et al., 2004), figos (ÖZAY et al., 1995), uvas (MAJERUS e OTTENEDER, 1996; ZIMMERLI e DICK, 1996; MAFF, 1997; BURDASPAL e LEGARDA, 1999; BATTILANI e PETRI, 2002; BELLÍ et al., 2004a; 2004b; SERRA et al., 2005; BATTILANI et al., 2006; VARGA e KOZAKIEWICZ, 2006; LASRAM et al., 2007), frutas secas (MACDONALD et al., 1999; OSTRY et al., 2002; ABARCA et al., 2003; STEFANAKI et al., 2003; LOMBAERT et al., 2004; MAGNOLI et al., 2004; IAMANAKA et al., 2005; ZINEDINE et al., 2007), cereais, como trigo, milho e cevada (JØRGENSEN et al., 1996; PUNTARIC et al., 2001; YAZDANPANAH et al., 2001; RIZZO et al., 2002), feijão (DOMIJAN et al., 2005), cacau (MATISSEK e RATERS, 2000; BONVEHÍ, 2004; AMEZQUETA et al., 2005; MOUNJOUENPOU et al., 2008), amendoim (SANGARE-TIGORI et al., 2006; ZINEDINE et al., 2007), especiarias (THIRUMALA-DEVI et al., 2001, FAZEKAS et al., 2005) e legumes (JØRGENSEN, 1998). Além disso, esta toxina também tem sido detectada em produtos derivados de fontes vegetal e animal. Dentre os quais estão: leite (BOUDRA et al., 2007), vinho (BATTILANI e PIETRI, 2002; CHULZE et al., 2006), cerveja (SCOTT e KANHERE, 1995; VISCONTI et al., 2000), chocolate (TURCOTTE e SCOTT, 2011), salsicha e chouriço (GAREIS e SCHEUER, 2000) e vinagre (MAJERUS et al., 2000).

Frente ao conhecimento dos danos que a OTA pode causar à saúde humana e animal, alguns países estabeleceram limites máximos de tolerância à OTA. A União Européia, por exemplo, estabeleceu limite máximo de tolerância a esta micotoxina em alguns gêneros alimentícios: 5 µg/kg para grãos de cereais; 3 µg/kg para cereais destinados ao consumo humano e cereais processados; 10 µg/kg para frutas secas como groselhas e uvas passas; 2 µg/L para vinhos e outras bebidas a base de uvas; 5 µg/kg para café torrado; 10 µg/kg para café solúvel; 0,5 µg/kg para alimentos destinados a fins medicinais específicos e para alimentos para bebês; e 30 µg/kg para especiarias como por exemplo, pimenta, noz-moscada e gengibre (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2006).



No Brasil, somente em fevereiro de 2011 a ANVISA publicou no diário oficial, um Regulamento Técnico sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para ocratoxina A em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias primas. Ficaram estabelecidos para atendimento imediato, limites que variam de 2 a 30 µg/kg, dependendo do produto: 10 µg/kg para cereais e derivados; 10 µg/kg para café torrado, moído ou em grão, e café solúvel; 2µg/kg para sucos de uva, vinhos e derivados; 5 µg/kg para cacau e chocolate; 10 µg/kg para frutas secas e desidratadas e 30 µg/kg para especiarias (D.O.U., 2011).

É consagrado na literatura que algumas espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* são produtoras de OTA. Ueno e colaboradores (1991), foram os pioneiros em descrever uma linhagem de *Aspergillus* negro (*A. foetidus* CBS 618.78) como ocratoxigênica. Logo em seguida, Abarca et al. (1994), descreveram a habilidade de *A. niger* produzir esta micotoxina. Essa informação provocou preocupação na comunidade científica uma vez que esta espécie é amplamente utilizada na indústria e seus produtos são geralmente reconhecidos como seguros para a saúde. Curiosamente, atualmente sabe-se que a linhagem CBS 618.78 erroneamente identificada por Ueno et al. (1991), como *A. foetidus*, pertence à espécie *A. niger* (SAMSON et al., 2004). Embora a espécie *A. niger* se caracterize como produtora de OTA, é importante mencionar que para esta espécie, no máximo 10% de isolados são produtores da micotoxina (ABARCA et al., 1994; TÉREN et al., 1996).

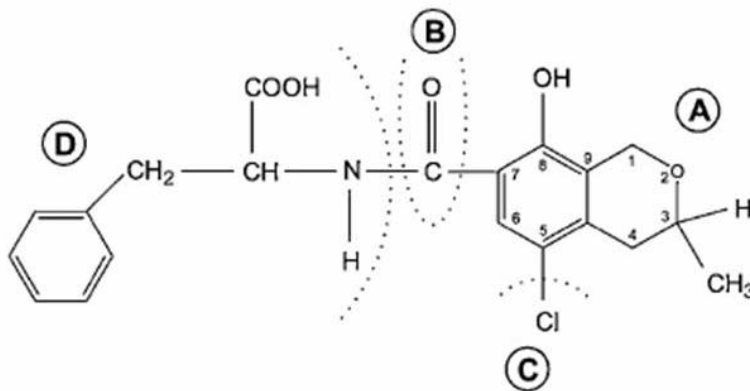
Em contrapartida, *A. carbonarius*, também membro da seção *Nigri*, se caracteriza como potente produtor de OTA e cerca de 90-100% dos isolados desta espécie são ocratoxigênicos positivos (ABARCA et al., 2003; PERRONE et al., 2006). Esta espécie descrita como produtora de OTA, em 1995 por Horie et al. (1995), tem sido apontada como uma das principais fontes desta micotoxina em alimentos derivados da uva (BATTILANI et al., 2003a; PERRONE et al., 2006). *Aspergillus sclerotioniger* e *A. laticoffeatus* são outras espécies que compõem a seção *Nigri* e que foram descritas como ocratoxigênicas (SAMSON et al., 2004).

A capacidade de *A. tubingensis* em produzir OTA (MEDINA et al., 2005; PERRONE et al., 2006), assim como as espécies uniseriadas da seção *Nigri*, *A. japonicus* e *A. aculeatus* (DALCERO et al., 2002; BATTILANI et al., 2003b; PONSONE et al., 2007), foi mencionada na literatura, embora haja controvérsia entre pesquisadores. Dados gerados pelo nosso grupo de pesquisa, não evidenciaram *A. tubingensis* como uma espécie produtora de OTA (FERRACIN et al., 2009).

## 2.6 ASPECTOS GENÉTICOS DA BIOSÍNTESE DE OCRATOXINA A

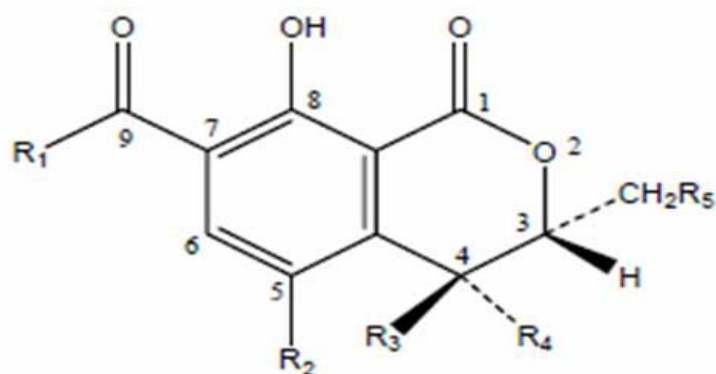
Os compostos pertencentes à classe das ocratoxinas diferem ligeiramente uns dos outros em suas estruturas químicas, resultando em seus respectivos potenciais tóxicos (van der MERWE et al., 1965a). Dentre esta classe de micotoxinas, a ocratoxina A (OTA) é a mais tóxica e frequente sendo, portanto, considerada a mais importante dentre as demais moléculas da família das ocratoxinas. A OTA é composta de um 7-carboxi-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3-*R*-metilisocumarina e de uma molécula de L-β-fenilalanina, unidas pelo grupo 7-carboxi, mediante uma ligação amida (citado por STOEV, 2008) (Figura 2).

**Figura 2** - Fórmula estrutural da OTA. (A) policetídeo diidroisocumarina; (B) grupo carboxila; (C) molécula de cloro; (D) fenilalanina



**Fonte:** FÄRBER e GEISEN, 2004.

As demais ocratoxinas (Figura 3), com exceção das ocratoxinas  $\alpha$  e  $\beta$ , que não apresentam a molécula de fenilalanina (COLE e COX, 1981), também são pentacetídeos cíclicos, consistindo de uma diidroisocumarina ligada a uma molécula de L-fenilalanina (van der MERWE et al., 1965b). A ocratoxina B (OTB) é o análogo decloro da OTA, ou seja, apresenta em sua estrutura química a substituição da molécula de cloro por um átomo de hidrogênio. A ocratoxina C (OTC) se constitui em um éster etílico da OTA. A ocratoxina  $\alpha$  (OT $\alpha$ ), é um derivado isocumárico da OTA e seu análogo declorado é a ocratoxina  $\beta$  (OT $\beta$ ). Outros compostos como, por exemplo, as (4-*R*) e (4-*S*) hidroxi-ocratoxina A (4-(*R/S*)OH OTA) e as 10-hidroxi-ocratoxina A (10-OH OTA) também são descritos como pertencentes à classe das ocratoxinas, conforme apresentado no Quadro 2 (ABRUNHOSA et al., 2010; EL KHOURY e ATOUI, 2010).

**Figura 3** - Estrutura geral das ocratoxinas

Fonte: EL KHOURY e ATOUI, 2010.

**Quadro 2** - Composição característica de ocratoxina A e metabólitos derivados:

Composto	R1	R2	R3	R4	R5
Ocratoxina A (OTA)	Fenilalanina	Cl	H	H	H
Ocratoxina B (OTB)	Fenilalanina	H	H	H	H
Ocratoxina C (OTC)	Etil-éster, fenilalanina	Cl	H	H	H
Ocratoxina $\alpha$ (OT $\alpha$ )	OH	Cl	H	H	H
Ocratoxina $\beta$ (OT $\beta$ )	OH	H	H	H	H

**Quadro 2** - Composição característica de ocratoxina A e metabólitos derivados: conclusão

4-S-hidroxi-ocratoxina A (4S-OH OTA)	Fenilalanina	Cl	OH	H	H
4-R-hidroxi-ocratoxina A (4R-OH OTA)	Fenilalanina	Cl	H	OH	H
10-hidroxi-ocratoxina A (10-OH OTA)	Fenilalanina	Cl	H	H	OH

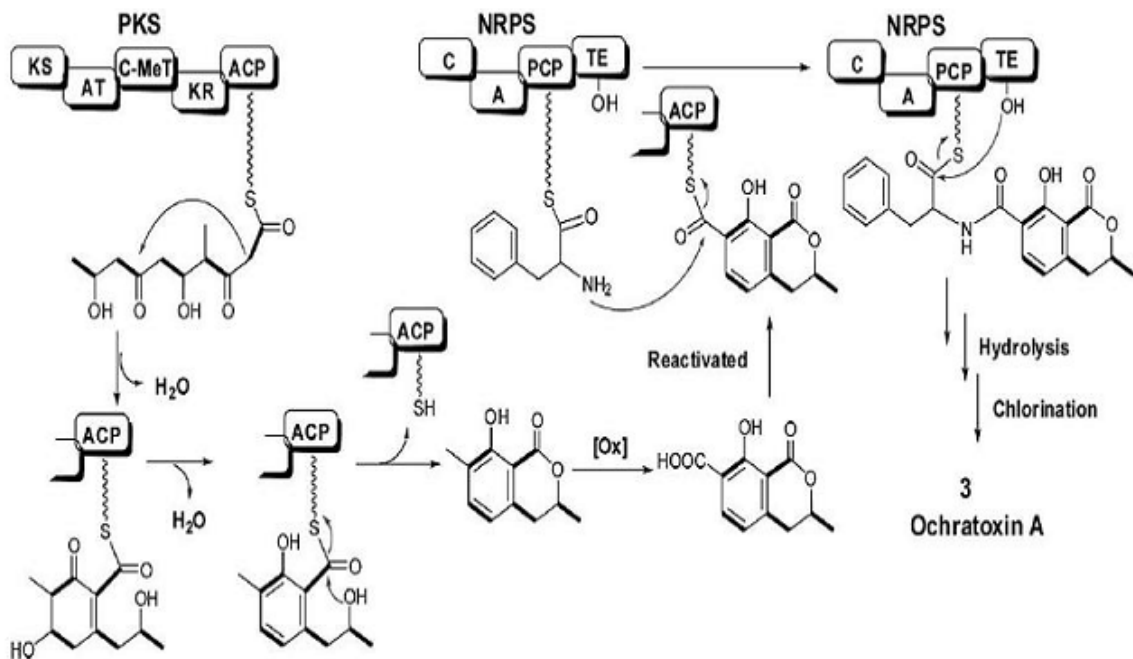
Fonte: ABRUNHOSA et al., 2010; EL KHOURY e ATOUI, 2010.

A via biossintética da OTA ainda não foi completamente estabelecida. Baseando-se em sua estrutura, Huff e Hamilton (1979), propuseram o primeiro modelo de biossíntese desta micotoxina. No referido modelo, a biossíntese da OTA ocorreria em 3 passos, sendo que no primeiro deles haveria o envolvimento de meleína como um dos precursores da OTA. O modelo proposto por estes autores passou a não ser aceito, na medida em que experimentos realizados por Harris e Mantle (2001), através da utilização de precursores marcados com  $^{14}\text{C}$ , não suportaram o papel da meleína como intermediário na biossíntese de OTA. Ainda baseando-se na estrutura química da OTA, Färber e Geisen (2004), postularam que o requisito genético mínimo necessário para a biossíntese de OTA é a

presença de genes que codificam para as seguintes enzimas: policetídeo sintase, necessária para a síntese do policetídeo diidroisocumarina; metilase, requerida para a formação do grupo carboxila; peptídeo sintase, responsável pela ligação do aminoácido fenilalanina ao policetídeo; e uma cloroperoxidase ou halogenase, necessária para a introdução do átomo de cloro à molécula.

A hipótese mais atual para a biossíntese de OTA é apresentada na revisão de Huffman et al. (2010), a qual está em concordância com o que postulam Färber e Geisen (2004). Essa hipótese inclui uma PKS para a síntese do PK diidroisocumarina, uma metiltransferase (ou um domínio C-MeT na PKS), uma enzima oxidativa do tipo P450 para a formação do grupo carboxil C<sub>7</sub>, uma NRPS para catalisar a ligação da fenilalanina com o PK, e uma halogenase (cloroperoxidase) para incorporar o átomo de cloro (Figura 4). Conforme mencionam os autores, apesar dos vários anos de estudo das ocratoxinas, nenhum destes passos foram geneticamente ou bioquimicamente estabelecidos (HUFFMAN et al., 2010).

**Figura 4** - Representação esquemática da via biossintética de OTA



**Figura 4** - Representação esquemática da via biossintética de OTA, proposta por Huffman et al. (2010).

Conforme já descrito em itens anteriores, frequentemente os genes envolvidos na biossíntese de uma dada toxina estão dispostos em *clusters*. Especialmente na última década, quando foram sequenciados os primeiros genomas fúngicos, este fato tem contribuído nas estratégias de investigação de genes que codificam proteínas envolvidas na

biossíntese de micotoxinas. O número de genes que se organiza em um *cluster* é variável entre as micotoxinas. Sabe-se que o *cluster* de biossíntese de aflatoxina em *A. flavus*, ocupa uma região genômica de 70 Kb que está próxima ao telômero do cromossomo 3 (YU et al., 2004). Outros exemplos são encontrados nas enzimas envolvidas na biossíntese da esterigmatocistina em *A. nidulans* formando um *cluster* gênico de 60 Kb (BROWN et al., 1996), e os *clusters* gênicos de 26 Kb para a biossíntese de tricoteceno em *Fusarium sporotrichioides* e *F. graminearum* (BROWN et al., 2002; KIMURA et al., 2003).

As análises genômicas comparativas de espécies de *Aspergillus* indicam que as regiões telômero-proximais apresentam alta diversidade de rearranjos não somente entre espécies de *Aspergillus*, mas também entre diferentes linhagens de uma mesma espécie (NIERMAN et al., 2005; RONNING et al., 2005), fato este que poderia explicar diferenças que fazem com que determinada linhagem de uma espécie seja produtora de uma referida micotoxina, enquanto outra não a produz.

O conhecimento de regiões codificadoras de proteínas envolvidas na biossíntese de ocratoxinas está muito aquém daqueles já obtidos para fumonisinas e aflatoxinas. O'Callaghan et al. (2003), foram os primeiros a identificar uma porção de um gene codificador de uma PKS (*pks*) envolvida na biossíntese de OTA. Apesar do pioneirismo, os dados obtidos pelo grupo de O'Callaghan são até hoje dos mais completos. Para chegar a esta descrição, os autores realizaram experimentos de hibridação subtrativa (SSH). Foi detectada uma sequência de 1,4 Kb incorporando um domínio AT de uma PKS, que era expressa em condições permissivas à produção de OTA (meios de cultura YES ou MC contendo extrato de levedura e ácido casamino), mas não em condições ditas restritivas (meios de cultura PDA ou ME). Após o nocaute deste gene, a linhagem mutante de *A. ochraceus* se tornou incapaz de produzir a OTA. Anos após, os autores quantificaram a expressão do gene *pks* de *A. ochraceus*, sob diferentes condições nutricionais e observaram estreita correlação com a quantidade de OTA produzida (O'CALLAGHAN et al., 2006).

O sequenciamento do genoma de *A. niger* CBS 513.88 (PEL et al., 2007) revelou que o gene An15g07920, que codifica uma enzima PKS, apresenta alto grau de similaridade com a sequência do gene *pks* envolvido com a biossíntese de OTA em *A. ochraceus*. Em vista disso, o gene An15g07920 foi hipoteticamente relacionado com a biossíntese de OTA em *A. niger*, entretanto, nenhuma evidência experimental desta relação foi obtida até o momento.

Logo após a publicação pioneira de O'Callaghan e colaboradores, um trabalho realizado com *Penicillium nordicum* permitiu a identificação, através de expressão

diferencial, de um conjunto de fragmentos de DNA homólogos a genes codificadores de enzimas potencialmente envolvidas na biossíntese de OTA. Dentre estas se destacam PKS, NRPS, halogenase, fenilalanina t-RNA sintetase, metilase e transportador do tipo ABC (FÄRBER e GEISEN, 2004). Posteriormente, este grupo sequenciou um fragmento de 10 Kb de *P. nordicum* contendo 3 ORFs: uma sequência parcial de *pks* (*otapksPN*), sequência completa de uma NRPS (*npsPN*) e a sequência completa de uma serino-protease alcalina (*aspPN*). Um mutante com o gene *otapksPN* interrompido por nocaute deixou de produzir a OTA. Além disso, os autores demonstraram que o nível de expressão deste gene em *P. nordicum* é correlacionado com a quantidade de OTA produzida (KAROLEWIEZ e GEISEN 2005; GEISEN et al., 2006).

Em 2009, foi identificado um gene *pks* (*aoksI*) de *A. westerdijkiae*. A obtenção de uma linhagem mutante para este gene demonstrou o envolvimento da proteína codificada por *aoksI* na biossíntese de OTA em *A. westerdijkiae* (BACHA et al., 2009). Considerando que *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus* são espécies altamente relacionadas e que os genes *pks* identificados como envolvidos na biossíntese desta micotoxina, não eram os mesmos, Bacha e colaboradores ousaram sugerir que duas PKSs estão envolvidas na biossíntese de OTA.

Para *A. carbonarius* também já foi relatado um gene que codifica para PKS (denominado como *ACpks*) que demonstra níveis de expressão gênica correlacionados com níveis de biossíntese de OTA (GALLO et al., 2009). O envolvimento deste gene na biossíntese de OTA não está absolutamente provado uma vez que os autores não realizaram o nocaute gênico. Pesquisa semelhante também foi realizada por Atoui et al. (2006).

Genes que expressam outras enzimas que não policetídeos sintases e que participam da biossíntese da OTA, também já foram descritos. O'Callaghan et al. (2006), por exemplo, identificaram dois genes distintos que expressam monooxigenases P450 em *A. ochraceus*. Em *P. nordicum*, foi identificada uma peptídeo não-ribossomal sintase (*otanpsPN*), previamente caracterizada por Karolewicz e Geisen (2005), juntamente com dois genes que possivelmente codificam uma proteína de transporte (*otatraPN*) e uma cloroperoxidase (*otachIPN*) (GEISEN et al., 2006).

Esta revisão bibliográfica demonstra que a comprovação, via nocaute gênico, do envolvimento de uma dada PKS na biossíntese de OTA é realidade apenas para *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* e *P. nordicum*. Para as espécies *A. niger* e *A. carbonarius*, a associação entre genes nocauteados e fenótipo negativo para ocratoxina ainda não foi descrita. Conclui-se que o conhecimento dos genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese

da OTA é ainda bastante limitado, especialmente para *A. niger*, em que as predições são baseadas apenas em resultados obtidos *in silico*.

## 2.7 FUMONISINA

As fumonisinas se constituem em um grupo de micotoxinas estruturalmente relacionadas, derivadas de policetídeos, que se caracterizam quimicamente por apresentarem um aminopolihidroxialquil de cadeia longa (com 19 ou 20 carbonos), diesterificado no C<sub>14</sub> e C<sub>15</sub>, com dois grupos de ácidos tricarbóxicos (NELSON et al., 1993; SEO e LEE, 1999).

Não faz muito tempo que a primeira fumonisina foi descoberta (GELDERBLOM et al., 1988), mas conforme revisto por Huffman et al. (2010), atualmente pelo menos 28 fumonisinas já foram isoladas de fungos.

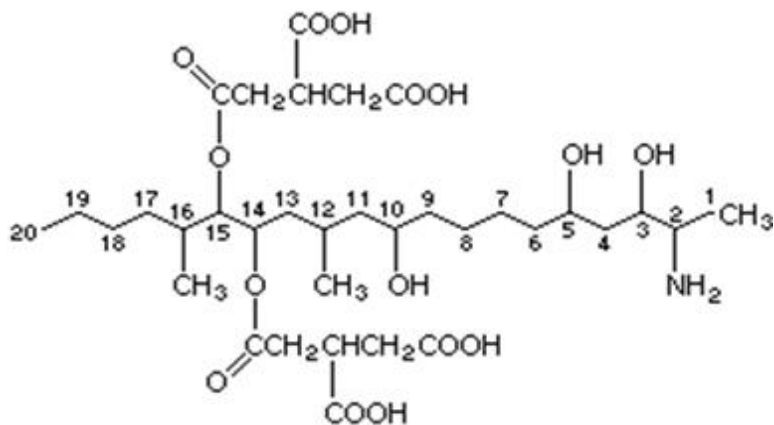
Em função de que são produzidas principalmente por algumas espécies do complexo *Gibberella fujikuroi*, (*Gibberella* é a forma teleomórfica do gênero *Fusarium*) tradicionalmente as fumonisinas são denominadas como família das micotoxinas dos *Fusarium*. Algumas destas espécies, com destaque para *F. verticillioides*, são contaminantes muito comuns de produtos da agricultura, principalmente do milho (*Zea mays*) e perdas econômicas imensas têm sido relatadas devido à presença de fumonisinas. Provavelmente este tenha sido um fator marcante que desencadeou um grande volume de pesquisas no sentido de compreender suas estruturas, ocorrências, vias de biossínteses, mecanismos pelos quais causam danos à saúde humana e animal, e evidentemente, pesquisas visando o desenvolvimento de estratégias de controle da contaminação dos produtos agrícolas.

Frente às diferenças estruturais das moléculas, as fumonisinas são categorizadas em 4 principais séries: séries A, B, C e P (RHEEDER et al., 2002). A série A é estruturalmente semelhante à série B, com exceção da presença de um grupamento C<sub>2</sub> amino acetilado. A série P tem uma molécula de 3-hidroxipiridina na posição C<sub>2</sub> em contraste ao grupo amino livre encontrado nas séries B e C. Segundo Huffman et al. (2010), a série C de fumonisina, difere das séries A, B e P por terem um esqueleto C<sub>19</sub> resultante da condensação de uma cadeia de acil com glicina em oposição a um resíduo de alanina presente nas outras séries.

Logo após a descoberta da produção da fumonisina por *Fusarium moniliforme*, esta toxina foi isolada por Gelderblom e colaboradores (1988), e quimicamente caracterizada por Bezuidenhout et al. (1988). A fumonisina B<sub>1</sub> juntamente com B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub> e B<sub>6</sub> compreendem a série B. Esta série de micotoxinas é considerada a mais importante em

função da alta toxicidade e ocorrência (MARASAS, 1996). Em produtos naturalmente contaminados com fumonisinas, a tipo B<sub>1</sub>, por exemplo, representa cerca de 70 a 80% do total de fumonisinas presentes (KRSKA et al., 2007). A fumonisina B<sub>1</sub> é um diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico e 2S-amino-12S,16R-dimetilo-3S, 5R, 10R, 14S, 15R-pentahidroieicoisano, em que os grupos hidroxilas em C<sub>14</sub> e C<sub>15</sub> são esterificados com um grupo carboxila terminal do ácido tricarbóxico (Figura 5). As demais fumonisinas da série B apresentam padrões diferentes de hidroxilação (SYDENHAM et al., 1995; BEZUIDENHOUT et al., 1998; KIM et al., 2003). Apesar deste conhecimento acumulado acerca das fumonisinas, de acordo com Proctor et al. (2008), as bases genéticas dessas diferenças estruturais ainda estão por serem elucidadas.

**Figura 5** - Estrutura química da Fumonissina B<sub>1</sub>



Fonte: IPCS: INCHEM, 2000.

As fumonisinas afetam plantas, causando danos fisiológicos, inibição do crescimento e morte (ABBAS e OCAMB, 1995), assim como animais, principalmente suínos, aves e cavalos, de diversas maneiras. Normalmente, causam lesões profundas no fígado, trato gastrintestinal, sistema nervoso e pulmões. Doses agudas desta micotoxina podem inibir a atividade de macrófagos responsáveis pela eliminação de patógenos, provocando edema pulmonar em suínos. Os equinos são os mais sensíveis à toxicidade das fumonisinas. Elas causam a doença chamada leucoencefalomalácia equina (ELEM) que se caracteriza por danos ao sistema nervoso central. Os primeiros sintomas são a redução de ingestão de alimentos, seguida de letargia e convulsões até a morte (RILEY, 1998). Em seres humanos, há uma provável associação com câncer de esôfago (SYDENHAM et al., 1991) e problemas neurológicos (HENDRICKS, 1999). É proposto que um dos mecanismos de toxicidade da



fumonissina deve-se a inibição da esfinganina N-acetiltransferase, resultando na destruição de esfingolipídios e na ruptura das membranas biológicas (RILEY et al., 1994). A FB<sub>1</sub> é considerada pela IARC como um possível carcinógeno do grupo 2B em humanos (IARC, 2002).

Devido à ocorrência de fumonisinas em produtos a base de milho ser predominante, a União Européia estabeleceu um limite regulatório que estabelece como máximo de tolerância valores entre 0,2-2 ppm em produtos de milho. Nos Estados Unidos há uma recomendação do FDA que o milho não deva ser usado para consumo humano quando níveis acima de 2-4 ppm de fumonisinas total forem detectados na amostra. No Brasil, o recente Regulamento Técnico sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para fumonisinas (FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub>), determinou para atendimento imediato limite de 2 ppm para milho pipoca e 0,2 ppm para alimentos a base de milho destinados à alimentação infantil. Para milho em grão, o limite máximo de tolerância será na ordem de 5 ppm, porém a contar de 2014 para que o setor produtivo tenha tempo de fazer as adequações necessárias. Ressalta-se que outros produtos além do milho e derivados, também podem se apresentar contaminados com fumonisinas, como por exemplo café, uvas, vinhos, e uvas passas, conforme citado por Frisvad et al. (2007).

Outras espécies fúngicas, além daquelas do gênero *Fusarium*, foram mais recentemente descritas como capazes de produzir fumonisinas. Dentre os relatos que mais nos surpreendem são aqueles relacionados à espécie *Aspergillus niger* (FRISVAD et al., 2007) e *Tolyocladium inflatum* (MOGENSEN et al., 2010b), ambas de grande importância biotecnológica. *T. inflatum* tem importância industrial pela capacidade de produzir ciclosporinas, que são utilizadas mundialmente como droga imunossupressora em receptores de órgãos transplantados.

Durante 2006 e 2007, um total de 64 amostras de grãos de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) obtidos da Tailândia foi investigado quanto à contaminação com fumonissina proveniente de *A. niger*. Os autores demonstraram que 67% dos isolados de *A. niger* foram capazes de produzir FB<sub>2</sub> e FB<sub>4</sub> quando crescido em meio de cultura apropriado. A análise das amostras de café quanto à presença de fumonissina, permitiu aos autores reportarem pela primeira vez na literatura a ocorrência de FB<sub>2</sub> e FB<sub>4</sub> nesta *commodity*, decorrente da presença de *A. niger*. As quantidades de FB<sub>2</sub> obtidas variaram de 1-9,7 ng/g (NOONIM et al., 2009).

De 86 *Aspergillus niger* analisados por Mogensen e colaboradores (2010a), obtidos de uvas (*in natura* ou passas), 66 foram identificados como *A. niger*. Dentre

estes, segundo os autores, 77% dos isolados produziram fumonisina. Nesse mesmo estudo, os autores avaliaram a porcentagem de isolados de *A. niger* capazes de produzir a ocratoxina A. Considerando que esta última porcentagem foi significativamente menor, os autores alertam que a capacidade de *A. niger* produzir fumonisina é um problema de segurança alimentar ainda maior do que aqueles decorrentes da capacidade de produzir ocratoxina A. Recentemente, Palumbo et al. (2011), analisaram 197 isolados de *A. niger* coletados em vinhedos da Califórnia e detectaram que dentre estes, 131 produziram FB<sub>2</sub> com concentrações variando de 1,2 a 27 µg/ml da toxina em cultura. Os autores sugerem uma avaliação urgente da presença de FB<sub>2</sub> nos referidos vinhedos. Abrunhosa et al. (2011), avaliaram 681 isolados de *Aspergillus* negros coletados de vinhedos de Portugal quanto à capacidade de produzir FB<sub>2</sub>. Os resultados obtidos demonstraram que 29% dos isolados pertencentes ao agregado *A. niger* foram produtores de FB<sub>2</sub>, variando de 0,003 a 6,0 mg/kg. Para os isolados de *A. carbonarius* (n=75) e *A. ibericus* (n=9) não foram detectadas produção da referida micotoxina.

## 2.8 ASPECTOS GENÉTICOS DA BIOSÍNTESE DE FUMONISINA

Durante esta última década, significativos avanços ocorreram na compreensão da genética e bioquímica da síntese de fumonisinas. Inicialmente, Proctor e colaboradores (1999), propuseram que as fumonisinas são produtos de policetídeos, baseados na redução da produção de fumonisinas por *G. fujikuroi* (*F. verticillioides*) em virtude do bloqueio de um gene, denominado *FUM5*, que codifica para uma policetídeo sintase (PKS). Posteriormente, Seo et al. (2001), identificaram mais quatro genes (*FUM6*, *FUM7*, *FUM8* e *FUM9*) relacionados com a produção de fumonisinas, sugerindo um *cluster* de biossíntese desta micotoxina.

Após o mapeamento e caracterização destes genes, Proctor et al. (2003), identificaram outros dez genes co-expressos (*FUM10-FUM19*), propondo a constituição de uma complexa via biossintética de quinze genes correlacionados e envolvidos com a produção de fumonisinas. Posteriormente, mais dois genes (*FUM20* e *FUM21*) foram identificados como pertencentes ao *cluster* da fumonisina em *F. verticillioides* (BROWN et al., 2005; 2007). Segundo revisão de Huffman et al. (2010), os genes envolvidos na biossíntese desta micotoxina estão agrupados em uma região de 75 Kb do genoma de *F. verticillioides*.

Embora a sequência dos eventos bioquímicos da síntese da fumonisina não seja totalmente conhecida, sabe-se que o *cluster* gênico de biossíntese desta micotoxina inclui genes que codificam para policetídeo sintase, citocromo P450 monooxigenase,

aminotransferase, desidrogenase, dioxigenase, ácidos graxos sintase, peptídeo sintase, dentre outros. Na Figura 6, apresenta-se uma representação esquemática do *cluster* gênico de fumonisina e seus genes flanqueadores descrito para *F. verticillioides* (KHALDI e WOLFE, 2011). Destaca-se que há um grande número de genes no *cluster FUM* (*FUM15*, *FUM16*, *FUM17*, *FUM18*, *FUM19* e *FUM20*) em que a função permanece desconhecida. Apesar disso, supõe-se que tenham alguma função relacionada à produção de fumonisina devido estarem alocados no *cluster* e serem co-regulados com os genes já descritos como essenciais.

**Figura 6** - Representação esquemática do *cluster* gênico de fumonisina e seus genes flanqueadores descrito para *F. verticillioides*

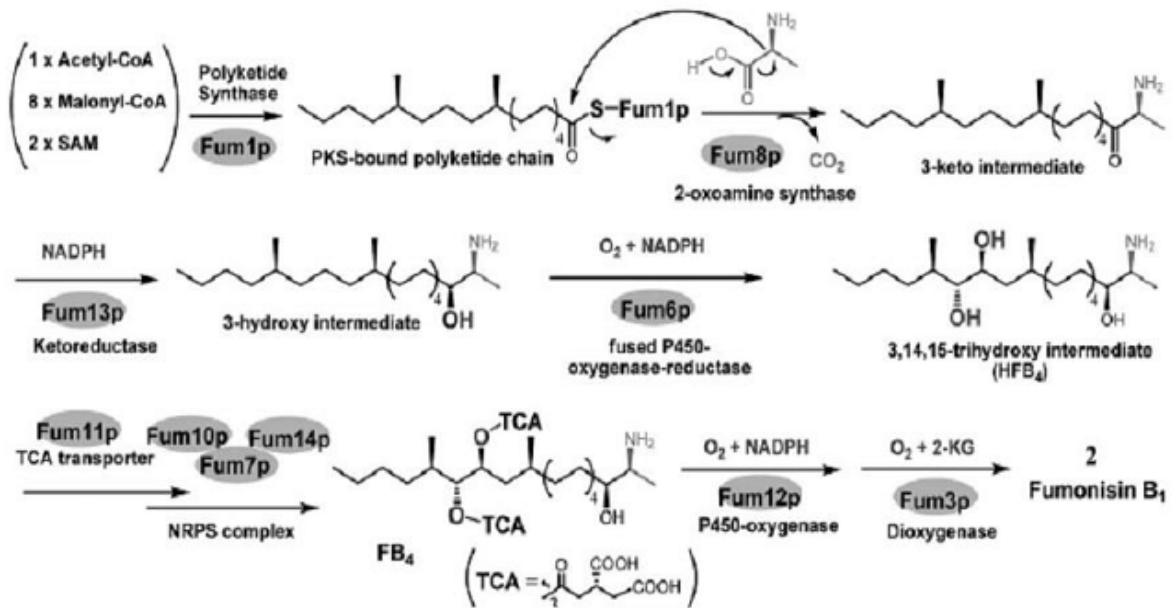


Fonte: KHALDI e WOLFE, 2011, adaptação.

A recente revisão de Huffman et al. (2010), apresenta o que se conhece até o momento sobre o mecanismo biossintético da fumonisina (Figura 7). Resumidamente, o gene denominado *FUM1* codifica uma enzima PKS que contém os domínios KS, AT, DH, C-MeT, ER, KR, característicos das enzimas envolvidas na formação de policetídeos altamente reduzidos. Evidências suportam que o produto deste gene é responsável por montar uma cadeia de 18 carbonos ( $C_{3-20}$ ) da fumonisina a partir de uma molécula de acetil-CoA, oito moléculas de malonil-CoA e duas moléculas de S-adenosil metionina. Interessantemente, Fum1p não contém o domínio TE que normalmente é requerido para a liberação da cadeia de acil do braço fosfopantoteínico do domínio ACP da PKS. O próximo gene do *cluster* é *FUM8*, que codifica uma aminotransferase que catalisa a condensação descarboxilativa entre aminoácidos e substratos tioésteres de acil-CoA. A disrupção deste gene elimina a capacidade de uma linhagem produzir fumonisinas, indicando sua essencialidade no processo de biossíntese. Atribui-se a Fum8p a função de “desligar” a cadeia de acil do domínio ACP e nela incorporar dois carbonos e um grupo amino para dar origem a um intermediário da fumonisina, denominado 3-ceto fumonisina. O gene *FUM13* codifica uma cetoreductase dependente de NADPH. A disrupção deste gene leva à produção da forma 3-ceto de FB<sub>3</sub> e FB<sub>4</sub>. O gene *FUM6* codifica uma monooxigenase do tipo P450 responsável pela hidroxilação de C<sub>14</sub> e C<sub>15</sub>. Mutantes com disrupção de *FUM6* não produzem quantidades de fumonisinas detectáveis. As fumonisinas possuem dois ésteres tricarbálicos em C<sub>14</sub> e C<sub>15</sub>. Supõe-se que os genes *FUM11*, *FUM10*, *FUM14* e *FUM7* estejam envolvidos na esterificação de C<sub>14</sub> e C<sub>15</sub>

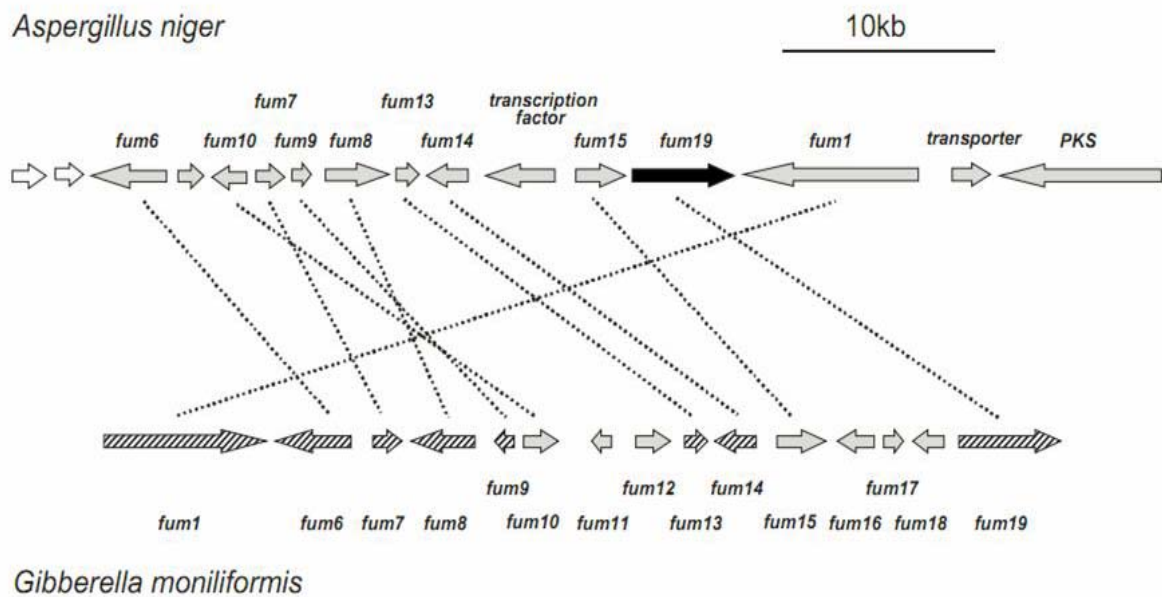
produzindo FB<sub>4</sub>. Ressalta-se que *FUM14*, codifica uma enzima com domínios carreadores de peptidil e de condensação, assemelhando-se às NRPS, porém ausentes de domínios de adenilação. Por fim, FB<sub>4</sub> é oxidada através de oxigenases (codificadas por *FUM12* e *FUM3*) à FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub> e FB<sub>1</sub>.

**Figura 7** – Representação esquemática da via biossintética de fumonisina B1



Baseando-se em análises de genômica comparativa, um *cluster* de biossíntese de fumonisina em *A. niger* foi sugerido (PEL et al., 2007), como apresentado na Figura 8. Considerando que *A. niger* e *F. verticillioides* (*G. moniliformis*) são espécies filogeneticamente distantes, é possível que a regulação gênica e o perfil de produção de fumonisinas ocorram de forma distintas. Dentre os 15 ortólogos encontrados em *A. niger*, estão *FUM1* que codifica uma PKS e *FUM14* que codifica uma proteína similar à NRPS.

**Figura 8** - Genes do *cluster* da biossíntese de fumonisina em *G. moniliformis* que são ortólogos a um conjunto de genes em *A. niger*



Fonte: Pel et al. 2007.

Embora este *cluster* de *A. niger* ainda não tenha sido alvo de experimentação *in vivo* para definição de sua função, dados experimentais de toxicidade e transcriptoma sugerem que este *cluster* não é expresso em níveis significantes em *A. niger* CBS 513.88 (PEL et al., 2007). No entanto, conforme já comentado no item anterior desta revisão, a capacidade de *A. niger* CBS 513.88 e várias outras linhagens desta espécie produzirem FB<sub>2</sub> e FB<sub>4</sub> é concreta (FRISVAD et al., 2007, NOONIM et al., 2009, PALUMBO et al., 2011, ABRUNHOSA et al., 2011). Muito recentemente, Khaldi e Wolfe (2011), propuseram que o *cluster FUM* em *A. niger* seja decorrente da transferência horizontal de espécies de Sordariomicetos.

Os trabalhos apresentados, nestes dois últimos itens da revisão, demonstram que está suficientemente provada a capacidade de *A. niger* produzir fumonisina. Tem-se para os próximos anos um novo desafio a ser enfrentado para minimizar danos econômicos e à saúde pública decorrente desta recente descoberta.

### 3 OBJETIVOS

Considerando que os trabalhos de sequenciamento de genomas de três linhagens de *Aspergillus niger* já revelaram que esta espécie possui um grande número de genes característicos da biossíntese de metabólitos secundários (*pks*) e que dados experimentais estabelecendo associações entre genes preditos e fenótipos ainda são muito limitados, o presente trabalho teve por objetivo:

- Realizar uma análise comparativa *in silico* de genes *pks* presentes nos genomas das linhagens CBS 513.88 e ATCC 1015 de *Aspergillus niger*, visando à identificação de *clusters* gênicos de metabolismo secundário linhagem-específicos;
- Analisar *in vivo* a presença dos genes *pks*, detectados unicamente na linhagem CBS 513.88, em um grande número de isolados de *A. niger* provenientes de diferentes substratos e localidades;
- Buscar associação entre a presença do gene *pks* An15g07920 e produção da ocratoxina A (OTA).

## REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L. et al. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2650-2652, 1994.
- ABARCA, M. L. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 79-84, 2000.
- 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, p. 504-506, 2003.
- ABBAS, H. K.; OCAMB, C. M. First report of production of fumonisin B<sub>1</sub> by *Fusarium polyphialidicum* collected from seeds of *Pinus strobus*. **Plant Disease**, v. 79, p. 642, 1995.
- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. **Toxins**, v. 2, p. 1078-1099, 2010.
- ABRUNHOSA, L.; CALADO, T.; VENÂNCIO, A. Incidence of fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger* in Portuguese wine regions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 7514-7518, 2011.
- ACCENSI, F. et al. Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 365-370, 2001.
- AL-MUSALLAM, 1980 apud ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 33-49, 2004.
- AMÉZQUETA, S. et al. Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans: effect of shelling. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 590-595, 2005.
- AMFEP – ASSOCIATION OF MANUFACTURES AND FORMULATORS OF ENZYMES PRODUCTS. 2009. Disponível em: <<http://www.amfep.org/list.html>> Acesso em: 13 jun. 2011.
- AMNUAYKANJANASIN, A. et al. Diversity of type I polyketide synthase genes in the wood-decay fungus *Xylaria* sp. BCC 1067. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, p.125-136, 2005.
- ANDERSEN, M. R.; NIELSEN, J. Current status of systems biology in Aspergilli. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 180-190, 2009.
- ANDERSEN, M. R. et al. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. **Genome Research**, v.21, p. 885-897. 2011.
- ATOUI, A. et al. Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, p. 488-493, 2006.

- BACHA, N. et al. *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene “aoks1” is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 77–84, 2009.
- BAKER, S. E. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. **Medical Mycology**, v. 44, p. S17–S21, 2006.
- BATTILANI, P.; PIETRI, A. Ochratoxin A in grapes and wine. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 639-643, 2002.
- BATTILANI, P.; GIORNI, P.; PIETRI, A. Epidemiology of toxin producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 715-722, 2003a.
- BATTILANI, P et al. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 633–636, 2003b.
- BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. S2-S4, 2006.
- BELLÍ, N. et al. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 591–594, 2004a.
- BELLÍ, N. et al. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 541–546, 2004b.
- BENNETT, J. W.; LASURE L. L. **Gene Manipulations in Fungi**. Academic Press, New York, INC. 560 p., 1985.
- BENNETT, J. W. From molecular genetics and secondary metabolism to molecular metabolites and secondary genetics. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. S917-S924, 1995.
- BETINA, V. Physiological regulation of secondary metabolism. *In*: BETINA, V. (Ed.), **Bioactive secondary metabolite of microorganisms** (Process in industrial microbiology), Elsevier Science, Amsterdam and New York, v. 30, p. 66-80, 1994.
- BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communication**, p.743-745, 1988.
- BOKHARI, F. M.; ALY, M. M. Evolution of traditional means of roasting and mycotoxins contaminated coffee beans in Saudi Arabia. **Advances in Biological Research**, v. 1, p. 71-78, 2009.
- BONVEHÍ, S. J. Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6347-6352, 2004.
- BOUDRA, H. et al. Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3197-3201, 2007.
- BRASE, S.; ENCINAS, A.; KECK, J.; NISING, C. F. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 3903-3990, 2009.



- BROWN, D. W. et al. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 93, p. 1418–1422, 1996.
- BROWN, D. W. et al. E. Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. **Fungal Genetics and Biology**, v. 36, p. 224–233, 2002.
- BROWN, D. W. et al. Comparative analysis of 87,000 expressed sequence tags from the fumonisin-producing fungus *Fusarium verticillioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 848-861, 2005.
- BROWN, D. W. et al. The *Fusarium verticillioides* *FUM* gene cluster encodes a Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> protein that affects *FUM* gene expression and fumonisin production. **Eukaryotic Cell**, v. 6, p. 1210–1218, 2007.
- BURDASPAL, P. A.; LEGARDA, T. M. Ochratoxin A in wines and grape products originating from Spain and other European countries. **Alimentaria**, v. 36, p. 107-114, 1999.
- CALVO, A. M. et al. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 447-459, 2002.
- CAST - Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems**. Report n.º 139, CAST, Ames, 217 p., 2003.
- CASTEGNARO, M. et al. **Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumours**. IARC Scientific Publication, n.115, 340p., 1991.
- 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 Suppl 1, p.S5-S9, 2006.
- COLE, R.; COX, R. H. Ochratoxins. In: COLE, R. J.; COX, R. H. (Eds.). **Handbook of toxic fungal metabolites**. Academic Press, New York, p. 128-151, 1981.
- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, No 1881/2006 of 19 December 2006. **Official Journal of the European Union**, Bruxelles, v.L364, p.5-24, 2006.
- COX, R. J. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 5, p. 2010-2026, 2007.
- CRUZ-FERNÁNDEZ, M. L.; MANSILLA, M. L.; TADEO, J. L. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. **Journal of Advanced Research**, v. 1, p. 113-122, 2010.
- D.O.U. – DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Resolução nº 7 de 18/02/2011 / ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (D.O.U. 22/02/2011). Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/media/IN07-2011-Ocratoxina.pdf>> Acesso em: 15 jun. 2011.

- DALCERO, A. et al. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p.1065-1072, 2002.
- DE VRIES, R. P. et al. *Aspergillus vadensis*, a new specie of the group of black *Aspergilli*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 87, p. 195-203, 2005.
- DELAGE, N. et al. Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine. **Food Control**, v. 14, p. 225-227, 2003.
- DOMIJAN, A.-M. et al. Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Republic of Croatia. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 427-432, 2005.
- DRUSCH, S.; RAGAB, W. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 1514-1527, 2003.
- EFSA - European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in Food. **The EFSA Journal**, v. 365, p. 1–56, 2006.
- EL KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. **Toxins**, v. 2, p. 461-493, 2010.
- FÄRBER, P.; GEISEN, R. Analysis of differentially-expressed ochratoxin A biosynthesis genes of *Penicillium nordicum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 661-669, 2004.
- FAZEKAS, B.; TAR, A.; KOVÁČZ, M. Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 856–863, 2005.
- FENG, G. H.; LEONARD, T. J. Characterization of the polyketide synthase gene (*pksLI*) required for aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 6246-6254, 1995.
- FERRACIN, L. M. et al. Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* Aggregate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 241-248, 2009.
- FISCH, K. M. et al. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1199-1213, 2009.
- FLANNIGAN, B.; LLEWELLYN, G. C. The microbiology and mycotoxicology of spices: A review. In: BARRY, S.; HOUGHTON, D. R.; LLEWEUYN, G. C.; O'REAR, C. E. **Biodeterioration**, 6<sup>a</sup> ed. Commonwealth Agriculture Bureau, International Mycological Institute, London, p. 273-9, 1986.
- FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1-174, 2004.
- FRISVAD, J. C. et al. Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger*. **Journal of**

**Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9727-9732, 2007.

FUNGARO, M. H. P. et al. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. **Current Microbiology**, v. 49, p.123–127, 2004.

GALAGAN, J. E. et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**, v. 422, p. 859–868, 2003.

GALAGAN, J. E. et al. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, v. 438, p. 1105-1115, 2005a.

GALAGAN, J. E. et al. Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology. **Genome Research**, v. 15, p. 1620-1631, 2005b.

GALLO, A. et al. Characterisation of a *pks* gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 8–15, 2009.

GAREIS, M.; SCHEUER, R. Ochratoxin A in meat and meat products. **Archiv für Lebensmittelhygiene**, v. 51, p. 102–104, 2000.

GEISEN, R.; SCHMIDT-HEYDT, M.; KAROLEWIEZ, A. A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium*. **Mycotoxin Research**, v. 22, p. 134-141, 2006.

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

GOLD – GENOMES ONLINE DATABASE v. 3.0. Disponível em: <  
<http://www.genomesonline.org/>> Acesso em 12 jun. 2011.

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

HENDRICKS, K. Fumonisin and neural tube defects in south Texas. **Epidemiology**, v. 10, p.198–200, 1999.

HENDRICKSON, L. et al. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. **Chemical Biology**, v. 6, p. 429-439, 1999.

HORIE, Y. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. **Nippon Kin Gakkai Kaiho**, v. 36, p. 73-76, 1995.

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

HUFFMAN, J.; GERBER, R.; DU, L. Recent Advancements in the Biosynthetic Mechanisms for Polyketide-Derived Mycotoxins. **Biopolymers**, v. 93, p. 764-766, 2010.

IAMANAKA, B. T. et al. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. **Food Additives Contaminants**, v. 22, p. 258-1263, 2005.

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, vol. 56. **IARC**, Lyon, France, p. 489–521, 1993.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. *In: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, v. 82. **IARC**, Lyon, France, p. 301-345, 2002.

IPCS-INCHEM – INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY.  
Fumonisin B<sub>1</sub>. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc219.htm>>  
Acesso em: 05 mai. 2011.

JØRGENSEN, K.; RASMUSSEN, G.; THORUP, I. Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danish population. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 95-104, 1996.

JØRGENSEN, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. **Food Additives Contaminants**, v. 15, p. 550-555, 1998.

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

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

KHALDI, N.; WOLFE, K. H. Evolutionary Origins of the Fumonisin Secondary Metabolite Gene Cluster in *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus niger*. **International Journal of Evolutionary Biology**, v. 2011, id. 423821, 2011.

KIM, E.-K., SCOTT, P.M. E LAU, B.P.-Y. Hidden fumonisin in corn-flakes. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, p. 161-169, 2003.

KIM, Y.-T. et al. Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. **Molecular Microbiology**, v. 58, p. 1102-1113, 2005.

KIMURA, M. et al. The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. **FEBS Letters**, v. 539, p. 105–110, 2003.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and Their Teleomorphs. **CSIRO Division of Food Science and Technology**, North Ryde, New South Wales, Australia, p. 164, 1988.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. **Mycological Papers**, v. 161, p. 1-188, 1989.

- KROGH, P. et al. Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica [B]**, v. 85, p. 238-240, 1977.
- KROKEN, S. et al. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 100, p. 15670-15675, 2003.
- KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of Fusarium toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 241-264, 2007.
- KUMAGAI, S. et al. Aflatoxin and Ochratoxin A contamination of retail foods and intake of these mycotoxins in Japan. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, p. 1101-1106, 2008.
- LASRAM, S. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 376-379, 2007.
- LEVI, C. Mycotoxins in coffee. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 63, p. 1282-1285, 1980.
- LOMBAERT, G. A. et al. Ochratoxin A in dried vine fruits on the Canadian retail market. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, p. 578-585, 2004.
- MACDONALD, S. et al. Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, p. 253-260, 1999.
- MACHIDA, M. et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, p. 1157-1161, 2005.
- MAFF - MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. Survey of aflatoxins and ochratoxin A in cereals and retail products. **Food Safety Information Bulletin n°. 130**, United Kingdom, 1997.
- MAGNOLI, C. et al. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 326-331, 2004.
- MAJERUS, P.; OTTENEDER, H. Nachweis und vorkommen von ochratoxin A in wein und traubensaft. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 92, p. 338-390, 1996.
- MAJERUS, P.; BRESCH, H.; OTTENEDER, H. Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. **Archiv für Lebensmittelhygiene**, v. 51, p. 95-97, 2000.
- MARASAS, W. F. Fumonisin: history, world-wide occurrence and impact. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 392, 1-17, 1996.
- MATISSEK, R.; RATERS, M. Ochratoxin A in cocoa and human health aspects. **13th International Cocoa Research Conference**, Kota Kinabalu, Malaysia, 14 October, 2000.
- MEDINA, A. et al. Study of Spanish Grape Mycobiota and Ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4696-4702, 2005.

- MICCO, C. et al. A study the contamination by ochratoxin a of green and roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, v. 6, p. 333-339, 1989.
- MOGENSEN, J. M. et al. Production of Fumonisin B<sub>2</sub> and B<sub>4</sub> by *Aspergillus niger* on Grapes and Raisins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 954-958, 2010a.
- MOGENSEN, J. M. et al. Production of fumonisins B<sub>2</sub> and B<sub>4</sub> in *Tolypocladium* species. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2010b. [Epub ahead of print].
- MOSS, M. O. Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1239-1243, 2008.
- MOUNJOUENPOU, P. et al. Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 234-241, 2008.
- NELSON, P. E.; DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D. Fumonisin mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, 233-252, 1993.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**, 4. ed. W. H. FREEMAN: New York, 1.119p., 2005.
- NIERMAN, W. C. et al. Genome sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, p. 1151-1156, 2005.
- NOONIM, P. et al. Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger* from in Thai coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, p. 94-100, 2009.
- O'CALLAGHAN, J.; CADDICK, M. X.; DOBSON, A. D. W. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. **Microbiology**, v. 149, p. 3485-3491, 2003.
- O'CALLAGHAN, J.; STAPLETON, P. C.; DOBSON, A. D. W. Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, p. 213-221, 2006.
- O'HAGAN, D. Fungal and plant polyketides. In: O'HAGAN, D. (Ed.). **The polyketide Metabolites**. New York: Ellis Horwood, pp. 65-110, 1991.
- OSTRY, V.; RUPRICH, J.; SKARKOVA, J. Raisins, ochratoxin A and human health. **Mycotoxin Research**, v. 18, p. 178-182, 2002.
- ÖZAY, G., ARAN, N., PALA, M. Influence of harvest and drying techniques on microflora and mycotoxin contamination of figs. **Die Nahrung**, v. 39, p. 156-165, 1995.
- PALUMBO, J. D.; O'KEEFFE, T. L.; MCGARVEY, J. A. Incidence of fumonisin B<sub>2</sub> production within *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from California raisins. **Journal of Food Protection**, v. 74, p. 672-675, 2011.

- PARDO, E. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **Food Science Technology International**, v. 10, p. 45-49, 2004.
- PARENICOVÁ, L. et al. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 521-527, 2001.
- PAYNE, G. A. et al. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. **Medical Mycology**, v. 44, p. 9–11, 2006.
- PEL, H. A et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 221–231, 2007.
- PERRONE, G. et al. PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 641–649, 2004.
- PERRONE G. et al. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 680-685, 2006.
- 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, p. 1032-1039, 2008.
- PFOHL-LESKOWICZ, A. Mycotoxicological risks for the health of animals and man. **Cahiers de Nutrition et de Diététique**, v. 35, p. 389-397, 2000.
- PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an update review, **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 149, p. 479–492, 1998.
- PONSONE, M. L. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 131-135, 2007.
- PROCTOR, R. H. et al. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 100-112, 1999.
- PROCTOR, R. H. et al. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 237-249, 2003.
- PROCTOR, R. H. et al. A fumonisin biosynthetic gene cluster in *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetics basis for B versus C fumonisin production. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, p. 1016-1026, 2008.
- PUNTARIC, D. et al. Ochratoxin A in corn and wheat: Geographical association with Endemic Nephropathy. **Croatian Medical Journal**, v. 42, p. 175–180, 2001.
- RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. (Ed). **The genus *Aspergillus***. Willians and Wilkins Company, Baltimore, Md. USA, p. 686, 1965.

- RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2101–2105, 2002.
- RILEY, R. T. et al. Dietary fumonisin B1 induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: A new mechanism of nephrotoxicity. **Journal of Nutrition**, v. 124, p. 594–603, 1994.
- RILEY, R. T. Mechanistic interactions of mycotoxins: theoretical considerations. In: SINHA K. K.; BHATNAGAR D. (Eds.). **Mycotoxins in Agriculture and Food Safety**, Marcel Dekker Inc., pp. 227–253, 1998.
- RINGOT, D. et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, p. 18-46, 2006.
- RIZZO, A.; ESKOLA, M.; ATROSHI, F. Ochratoxin A in cereals, foodstuffs and human plasma. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 631–637, 2002.
- RONNING, C. M. et al. Genomics of *Aspergillus fumigatus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 22, p. 223-228, 2005.
- SAMSON, R. A. et al. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Microbiology**, v. 50, p. 45-61, 2004.
- SANGARE-TIGORI, B. et al. Preliminary survey of ochratoxin A in millet, maize, rice, and peanuts in Côte d'Ivoire from 1998 to 2002. **Human and Experimental Toxicology**, v. 25, p. 211–216, 2006.
- SARTORI, D. et al. PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 350–354, 2006.
- SCHIMIDT, H. et al. Utilization of AFLP markers for PCR based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 899-909, 2004.
- SCHÜMANN, J.; HERTWECK, C. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. **Journal of Biotechnology**, v. 124, p. 690-703, 2006.
- SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426-435, 2002.
- SCOTT, P. M.; KANHERE, S. R. Determination of ochratoxin A in beer. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, p. 591-598, 1995.
- SCOTT, P. M. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. **Journal of AOAC International**, v. 79, p. 875–882, 1996.
- SCUDAMORE, K. A. et al. Deoxynivalenol and other *Fusarium* mycotoxins in bread, cake and biscuits produced from UK-grown wheat under commercial and pilot scale conditions. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, p. 1191-1198, 2009.



SEO, J. A.; LEE, Y. W. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy Corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1331-1334, 1999.

SEO, J. A.; PROCTOR, R. H.; PLATTNER, R. D. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 34, p. 155-165, 2001.

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

SERRA, R. et al. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. **Mycologia**, v. 98, p. 295-306, 2006.

STEFANAKI, I. et al. Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried vine fruits. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, p. 74-83, 2003.

STEYN, P. S. The biosynthesis of mycotoxins. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 149, p. 469-478, 1998.

STOEV, S. D. Complex etiology, prophylaxis and hygiene control in mycotoxic nephropathies in farm animals and humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 578-605, 2008.

STUDER-ROHR, I. et al. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 341-355, 2005.

SUN, J. et al. Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. **Genome Biology**, v. 8, p. R182, 2007.

SWANSON, B. G. Mycotoxins on fruits and vegetables. **Acta Horticulturae**, v. 207, p. 49-61, 1987.

SYDENHAM, E. W. et al. Fumonsin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 2014-2018, 1991.

SYDENHAM, E. W. et al. Potential of alkaline hydrolysis for the removal of fumonisins from contaminated corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1198-1201, 1995.

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

TÉREN, J. et al. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v. 134, p. 171-176, 1996.

TETTELIN, H. et al. Comparative genomics: the bacterial pan-genome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 472-477, 2008.

THIRUMALA-DEVI, K. et al. Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, p.830-835, 2001.

- TURCOTTE, A. M.; SCOTT, P. M. Ochratoxin A in cocoa and chocolate sampled in Canada. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, p. 762-766, 2011.
- TURNER, G. Genomics and Secondary Metabolism in *Aspergillus*. In: MACHIDA, M., GOMI, K. (Eds.), *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 139-155, 2010.
- UENO, Y. et al. Use of monoclonal antibodies enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera coffee products and toxin-producing fungi. In: CASTAGNERO, M.; PLESTINA, R.; DIRHEIMER, G.; CHERNOZEMSKY, I. N.; BARTSCH, H. (Eds.), **Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours**, IARC – Sci. – Publ., Lyon, France, p. 71-75, 1991.
- VAN DER MERWE, K. J. et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, p. 1112-1113, 1965a.
- VAN DER MERWE, K. J. et al. Part II. The constitution of ochratoxin A, B, C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Journal of the Chemical Society**, p. 7083-7088, 1965b.
- VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 72-81, 2006.
- VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTONZE, G. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 888, p. 321-326, 2000.
- VRABCHEVA, T. M. Mycotoxins in spices. **Voprosy Pitannia**, v. 69, p. 40-43, 2000.
- YAZDANPANAHI, H. et al. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in corn and barley from Mazandaran and Golestan in north provinces of Iran. **Mycotoxin Research**, v. 17, p. 21-30, 2001.
- YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J. P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Research**, v. 51, p. 81-99, 2002.
- YU, J. et al. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1253-1262, 2004.
- ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochratoxin A in table wines and grape-juice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 655-668, 1996.
- ZINEDINE, A. et al. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. **Food Control**, v. 17, p. 868-874, 2006.
- ZINEDINE, A. et al. Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, p. 285-291, 2007.
- ZOHRI, A. A.; ABDEL-GAWAD, K. M. Survey of mycoflora and mycotoxins of some dried fruits in Egypt. **Journal of Basic Microbiology**, v. 4, p. 279-288, 2003.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho serão apresentados na forma de artigo científico.

### 5.1 ARTIGO: STRAIN-SPECIFIC POLYKETIDE SYNTHASE GENES (*PKS*) OF *ASPERGILLUS NIGER STRICTO SENSU*

Artigo científico submetido ao periódico *International Journal of Food Microbiology*.

#### ABSTRACT

*In silico* comparison of 34 putative *pks* genes in *Aspergillus niger* CBS 513.88 versus *A. niger* ATCC 1015 genome revealed significant nucleotide identity (> 95% covering a minimum of 99% of the gene sequence) for 31 of the genes (approximately 91%). *A. niger* CBS 513.88 harbors three putative *pks* genes (An01g01130, An11g05940, and An15g07920), for which nucleotide identity was not found in *A. niger* ATCC 1015. To compare the results of the *in silico* analysis with the *in vivo* situation, experimental data were obtained for a large number of *A. niger* strains obtained from different substrates and geographical regions. Three putative *pks* genes that were found to be variable between the two *A. niger* strains using bioinformatics tools were in fact strain-specific genes based on experimental data. The PCR amplification signal for the An01g01130, An11g05940, and An15g07920 *pks* genes were detected in only 97%, 71%, and 26% of the strains, respectively. Southern blot analyses confirmed the PCR data. Because one of the strain-specific *pks* genes (An15g07920) is located in a putative ochratoxin cluster, we focused our investigation on that region. We assessed the ochratoxin production capability of the 119 *A. niger* strains and found a positive association between the presence of this *pks* gene and the capability of the respective strain to produce ochratoxin.

**Keywords:** *A. niger*. Strain-specific polyketide synthase. Ochratoxin. Secondary metabolites. Mycotoxin.

## 1 INTRODUCTION

Filamentous fungi are a well-known source of several small molecules derived from secondary metabolism. These small molecules range from beneficial antibiotics to harmful toxins (Palmer and Keller, 2010). Genes associated with secondary metabolite biosynthesis are often found physically linked or clustered within a given region of a genome, and most of the time they are near telomeric regions. These clusters usually harbor genes encoding polyketide synthases (PKS) and nonribosomal peptide synthetases (NRPS), which are adjacent to genes encoding hydrolases, oxidases, methylases, transporters, and regulatory

proteins. Because PKS and NRPS are typically associated with secondary metabolism, a convenient approach to find a new biosynthetic pathway is to search genome sequences for those genes first, and subsequently examine adjacent regions (Turner, 2010). The recent availability of the complete sequences of several genomes from filamentous fungi has revealed a surprisingly large number of PKS and NRPS genes, indicating there are a number of secondary metabolites that have yet to be discovered and structurally elucidated (von Döhren, 2009).

*Aspergillus niger* is one of the most important microorganisms used for biotechnological purposes. For many decades, it has been used to produce citric acid as well as for a source of extracellular enzymes and in the traditional process of oriental food manufacturing. This species has been labeled with generally recognized as safe (GRAS) status from the US Food and Drug Administration; however, it may also produce metabolites that are harmful to humans (as reviewed by Gautam et al., 2011). Some isolates of *A. niger* are able to produce ochratoxin A and/or fumonisin, and the current general consensus within the research community is that new and unknown isolates of fungi should be carefully checked for mycotoxin production before their use in industrial applications (Abarca et al., 1994; Frisvad et al., 2007).

Analysis of multiple genome sequences from a single species is an exciting field of biological research, which provides new ways to understand evolution, adaptation, and population structure. In addition, these studies can be used for more applied research, such as the discovery of new gene products. This type of analysis is currently available for several bacteria, but is very limited for fungi, since few strains within the same species have had their genomes completely sequenced.

To date, only three strains of *A. niger* (CBS 513.88, ATCC 1015, and ATCC 9029) have had their genome sequences determined; however, public genome websites are only available for CBS 513.88 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomeprj/19263>) and ATCC 1015 (<http://genome.jgi-psf.org/Aspni5/Aspni5.home.html>) strains. The ATCC 1015 strain is used for industrial production of citric acid, and CBS 513.88 is an early ancestor of ATCC 1015. A total of 33 PKS, 15 NRPS, and 9 hybrid PKS/NRPS genes have been identified throughout the genome of *A. niger* ATCC 1015 (Fisch et al., 2009). In the CBS 513.88 strain, 34 PKS, 14 NRPS, and 7 hybrid PKS/NRPS genes have been found, and most of them are located in clusters (Pel et al., 2007). Although comparative analyses among genomes of *Aspergillus* species have suggested that some secondary metabolism gene clusters are species-specific (i.e. no orthologs in other species (as reviewed by Fedorova and Nierman,

2010)), studies that aim to identify intraspecific variation in the context of genes involved in secondary metabolism have only just begun (Sun et al., 2007; Fedorova et al., 2008; Fisch et al., 2009; Andersen et al., 2011).

In this study, bioinformatics approaches were applied to the *pks* gene inventory of two *A. niger* genomes (CBS 513.88 and ATCC 1015) in order to identify strain-specific gene clusters for secondary metabolism pathways. To compare results of the *in silico* analysis with the *in vivo* situation, experimental data were collected from a large number of *A. niger* strains obtained from different substrates and geographical regions.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 STRAINS

We analyzed a total of 119 *Aspergillus niger* isolates. The isolates were provided by two Brazilian institutions: 87 from Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Campinas) and 32 from Universidade Estadual de Londrina (UEL, Londrina). Of them, 35 were collected from dry fruits (black sultanas, dates, prunes, and dried figs), 22 were collected from Brazil nuts, and 62 were isolated from coffee beans.

### 2.2 OCHRATOXIN A PRODUCTION

The ochratoxin A (OTA) production of each isolate was assessed using the method described by Filtenborg et al. (1983). Briefly, isolates were three-point inoculated into Yeast Extract Sucrose Agar (YES Agar) and incubated at 25°C for 7 d. Three agar plugs were removed from the central area of the colony, weighed, and introduced into a small vial. Methanol (0.5 mL) was then added to the vial. After 60 min, the extracts were filtered (Millex-Millipore) and injected into a high performance liquid chromatography (HPLC) system (Shimadzu 10VP). This system has a fluorescence detector that was operated at an excitation wavelength of 333 nm and an emission wavelength of 477 nm. The HPLC was fitted with a Shimadzu CLC G-ODS (4 x 10 mm) guard column and a Shimadzu Shimpack CLC-ODS (4.6 x 250 mm) column. The mobile phase was methanol:acetonitrile:water:acetic acid (35:35:29:1), and the flow rate was 0.8 mL min<sup>-1</sup>, according to Vargas et al. (1995). An OTA standard (Sigma) was used for the construction of a five-point calibration curve, peak area versus mass (ng). The OTA concentration in the sample extract was determined by

interpolation of the resulting peak areas from the calibration graph.

### 2.3 DNA EXTRACTION AND RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) ANALYSIS

Conidia of each isolate were inoculated into liquid minimal medium (Pontecorvo et al., 1953) and incubated at 28°C for 24 h at 180 rpm. Genomic DNA was extracted according to Azevedo et al. (2000) and quantified using a fluorimetric method (Dyna Quant, Pharmacia). RAPD analysis was performed as described by Fungaro et al. (1996). In brief, fungal DNA sequences were amplified with the primer OPX-7 (Qiagen Operon). PCR reactions were prepared in a final volume of 25 µL and contained 0.25 µM primer, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 U of native Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies), 0.25 mM of each dNTP, and 25 ng of template DNA. The amplifications were carried out in a PTC 100 thermal cycler (MJ Research Inc.) using the following parameters: 3 min at 92°C, followed by 40 cycles of 40 s at 92°C, 1 min 30 s at 40°C, and 2 min at 72°C, with a final cycle for 5 min at 72°C. The amplification products were resolved by electrophoresis on 1.4% agarose gels and visualized under an ultraviolet light source after ethidium bromide staining.

### 2.4 PARTIAL B-TUBULIN GENE SEQUENCE ANALYSES

Amplification of a β-tubulin gene region was performed using the following primer pair: Bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT TTC 3') and Bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3'), as described by Glass and Donaldson (1995). Standard amplification reactions and cycling protocols were adopted, and amplicons submitted to direct sequencing in both directions (forward and reverse) in a MegaBace™ 1000 Molecular Dynamics system (Amersham, Pharmacia Biotech). The quality of the sequences was examined using the software package Phred/Phrap/Consed. Phylogenetic analysis was performed by using CLUSTAL W multiple-sequence alignment program version 1.6 (Thompson et al. 1994).

### 2.5 SURVEY OF POLYKETIDE SYNTHASE GENES BY PCR

Based on the nucleotide sequence from *A. niger* CBS 513.88 deposited in the NCBI database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), six primer pairs (Table 1) were designed and

used in an attempt to amplify regions of the polyketide synthase genes (*pks*) from 119 wild-type strains. Amplifications were performed in a PTC 100 thermal cycler (MJ Research Inc.) using a 25  $\mu$ L reaction volume containing 5 ng of DNA template, 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.4  $\mu$ M of each PCR primer, and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies). To confirm the presence of PCR-compatible DNA, amplification of the  $\beta$ t2 region of the  $\beta$ -tubulin gene was carried out using the primer pair described by Glass and Donaldson (1995).

## 2.6 CLONING AND SEQUENCING

PCR products were cloned using the TOPO TA Cloning Kit for sequencing (Invitrogen Life Technologies). The recombinant plasmids were purified using the PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen Life Technologies). The inserts and PCR products were sequenced as described by Sanger et al. (1977) using the DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) on a MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences). The quality of the sequences was examined using the Phred/Phrap/Consed package.

## 2.7 SOUTHERN BLOT ANALYSIS

For each strain, 4  $\mu$ g of genomic DNA was digested with *Hind*III, electrophoresed, and transferred to a nylon membrane, as described by Sambrook and Russell (2001). A 556 bp fragment of the CMeT domain from the *pks* gene was obtained by PCR from genomic DNA using the sequences 5'TCCTACGACTTCACCGACAT and 5'CATTTCGTTGATCCCATCG as forward and reverse primers, respectively. The fragment was radioactively labelled by random priming with the Random-Priming DNA Labelling System Kit (Invitrogen Life Technologies) and used as a probe. Blots were hybridized at 65°C. Two high stringency washes were done at 65°C with 0.5X SSC and 0.1% (w/v) SDS each for 30 min, followed by two washes with 0.1X SSC and 0.1% (w/v) SDS each for 30 min. The results were visualized by autoradiography.

## 2.8 BIOINFORMATIC ANALYSES

The secondary metabolite gene clusters, in which most of the *pks* genes are contained (Pel et al., 2007), were annotated using the Secondary Metabolite Unique Regions Finder (SMURF) tool. This web-based software systematically predicts clustered secondary metabolite genes based on their genomic context and domain content ([www.jcvi.org/smurf/](http://www.jcvi.org/smurf/)). The sequences of 34 *pks* genes identified in the genome of the CBS 513.88 strain of *A. niger* (Pel et al., 2007) were confronted with the genome of the ATCC 1015 strain of *A. niger* and *A. carbonarius* ITEM 5010 v3 by searches (BlastN) within the JGI database (<http://genome.jgi-psf.org/Aspni5/Aspni5.home.html>).

The *pks* gene distribution along *A. niger* chromosomes and distances to either centromere or telomere were accessed using Ensembl Genome Browser (<http://fungi.ensembl.org/index.html>). Conserved domains were identified using the InterProScan sequence search tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>). In addition, proteins within clusters were functionally annotated by searches in public databases, including UniProt and GenBank.

## 3 RESULTS

### 3.1 SCREENING OF PKS GENES

Using SMURF, 67 putative clusters involved in secondary metabolite biosynthesis were predicted in *A. niger* CBS 513.88. At least 34 of these clusters harbor one or two putative *pks* genes. Among these, one gene (3%) is located at the end of the chromosome (< 3Kb), two (6%) are subtelomeric (< 90 kb), and thirty-one (91%) are located away from subtelomeric regions.

*In silico* comparison of the 34 DNA sequences of *A. niger* CBS 513.88 to the *A. niger* ATCC 1015 genome revealed significant nucleotide identity (> 95% covering a minimum of 99% of the gene sequences) for 31 of the sequences (approximately 91%). Three putative *pks* genes (An01g01130, An11g05940, and An15g07920) were unique to *A. niger* CBS 513.88 (Table 2). The upstream and downstream regions of the three unique *pks* genes in the ATCC 1015 and CBS 513.88 strains were compared. An01g01130 was found to be located in a 22 Kb cluster positioned in a region on chromosome II that was far from the telomeric region (~1.2 Mb from the chromosome end). This CBS 513.88 cluster contains five



putative ORFs. Of these, only An01g01130 is missing in ATCC 1015, which is a gene annotated similar to a *pks* gene from *Gibberella moniliformis*. This missing region is 9 Kb in size.

The second missing *pks* gene (An11g05940) is located in a cluster positioned on the middle of the left arm of chromosome VII. The predicted cluster has a size of 48 Kb and harbors 14 putative ORFs, of which three are missing in ATCC 1015: An11g05940, An11g05950, and An11g05960. This missing region is 20 Kb long. The third unique *pks* gene (An15g07920) is located on the extremity of chromosome III of *A. niger* in a 31 Kb cluster that harbors 10 putative genes, which has been annotated as a putative ochratoxin cluster by Pel et al. (2007). Five missing ORFs were detected in ATCC 1015: An15g07880, a putative FAD-binding oxidoreductase; An15g07890, a putative transcription factor; An15g07900, a putative cytochrome P450; An15g07910, a putative NRPS, and An15g07920, which is evidently a PKS. This missing region is approximately 22 Kb in size. Very recently, the genome sequences of the CBS 513.88 strain were improved and a re-annotation is in progress. Therefore, we re-analyzed this region containing the ORF An15g07920 based on the NCBI annotation updated on 31-May-2011 (Figure 1). The most significant difference between the first and the last version was the abolishment of ORF An15g07890. Because *A. carbonarius* is an important OTA-producer and belongs to section *Nigri*, we also included in our analysis an equivalent genomic region in our studies (Figure 1).

We also attempted to compare the strain-specific *pks* gene with others that have been previously described and are possibly involved in known pathways. As shown in Figure 2, we found that the putative An15g07920 product grouped together with an *A. ochraceus* PKS previously described as involved in the biosynthesis of OTA (O'Callaghan et al., 2003, Dao et al., 2005) and with an *A. carbonarius* putative product (scaffold 12) (<http://genome.jgi-psf.org>, as of 31-May-2011).

### 3.2 SURVEY OF PKS GENES IN VIVO

To compare the results of the *in silico* analyses with the *in vivo* situation, PCR was conducted on a large number of *A. niger* strains obtained from different substrates and geographical regions. Firstly, because of the taxonomy of *A. niger* aggregate is not very clear and species identification remains problematic, we confirmed the taxonomic status of each strain by morphological and molecular data. Evidence of morphology and  *$\beta$ -tub2* sequences were complementary and indicated that all strains were in fact *A. niger sensu*

*stricto*. For instance, *A. lacticoffeatus* and *A. niger sensu stricto* could not be separated based on the  $\beta$ -tub2 sequences; however, there are clear differences in their colony color (Samson et al., 2004). As expected for a unique species, the strains shared a significant number of RAPD bands, and some variability was found, which confirmed that they were not clones (Figure 3).

When we investigated a large number of wild-type *A. niger* using PCR tools, we detected the *pks* genes (An01g01130, An11g05940, and An15g07920) that were absent in ATCC 1015 were in fact strain-specific genes. Amplification signals for An01g01130, An11g05940, and An15g07920 genes were detected in only 97%, 71%, and 26% of the strains, respectively (data not shown). These results suggest that differences in *pks* gene content of the two fully sequenced genomes of *A. niger* can not be merely attributed to the classical strain improvement programs they were submitted in the past.

### 3.3 ASSOCIATION BETWEEN AN15G07920 AND STRAIN CAPABILITY OF OTA PRODUCTION

Because the cluster in which An15g07920 *pks* is located was annotated as a putative ochratoxin cluster, we focused our investigation on assessing the OTA production capability of each of the strains in this study. In our sample, 26% (31/119) of the strains were able to produce OTA. Our goal was to examine the possible association between the presence of the *pks* locus and the capability of the respective strain to produce OTA. The predicted domains of  $\beta$ -ketoacyl synthase (KS), acyl transferase (AT), dehydratase (DH), methyltransferase (CMeT), enoylreductase (ER), ketoreductase (KR), and acyl carrier protein (ACP) were found in the hypothetical protein encoded by An15g07920 (Figure 4). When a primer pair (PKS15CMeT) was used to amplify a DNA fragment corresponding to the methyltransferase PKS domain, a single 998 bp band was detected in all strains that produced OTA (31); this band was not detected in any of the non-producing strains (88). Equally, when a primer pair (PKS15KS) was used to amplify a DNA fragment corresponding to the  $\beta$ -ketoacyl synthase domain, which is another PKS domain, a single 766 bp band was only detected in the OTA producing strains (Figure 5). Sequencing analysis of both amplicons confirmed their *pks* identity.

Finally, to prove that the An15g07920 is a strain-specific locus, a DNA segment of the corresponding methyltransferase domain (556 bp) was used as a probe in a Southern blot analysis. In agreement with the abovementioned PCR data, hybridization signals were only detected in OTA producing strains (Figure 6).

## 4 DISCUSSION

The *in silico* analysis in this study showed that the CBS 513.88 genome harbors three putative *pks* genes (An01g01130, An11g05940, and An15g07920), which are not present in ATCC 1015. These differences cannot be associated with low-coverage genome sequencing, since the ATCC 1015 genome was sequenced with a higher coverage than that of CBS 513.88. Although the studies that have sought to identify variation in gene content within fungal species are very restricted, some interesting information is already available in the literature. In *A. niger*, it has been previously demonstrated that the nucleotide sequence identity between strains CBS 513.88 and ATCC 1015 is 99.3% (Rokas et al., 2007). Similarly, the comparative genomic analysis of *A. niger* ATCC 9029 and CBS 513.88 showed that approximately 600 CDSs of CBS 513.88 have no orthologs in ATCC 9029 (Sun et al., 2007). Among these CBS 513.88 unique genes, some encode enzymes of secondary metabolism.

According to Turner (2010), some secondary metabolite gene clusters are located near chromosome ends, which are sites of the most frequent rearrangements in many eukaryotic genomes. This is the case for the *pks* gene An15g07920, which has no orthologs in ATCC 1015 and was found positioned in a subtelomeric region ( $\leq 3$  Kb). However, the two other *pks* missing genes in ATCC 1015 (An01g01130 and An11g05940) are distant from the telomere ( $> 1$  Mb), meaning that the deletion cannot only be explained by subtelomeric rearrangements. Rokas et al. (2007) stated that variable loci are randomly distributed along the chromosomes of *A. fumigatus*, although they display a clear subtelomeric bias.

When annotating the *A. niger* CBS 513.88 genome, Pel et al. (2007) did not suggest any function for the clusters that harbor the genes An01g01130 and An11g05940. However, for the cluster where An15g07920 is located, an ochratoxin biosynthesis putative function was predicted. When comparing the three CBS 513.88 *pks* products, which do not have orthologs in ATCC 1015, to others products previously reported to be involved in known pathways, we observed that the products of the An01g01130 and An11g05940 genes were not sufficiently related in phylogenetic terms to those with functions already specified. In contrast, the An15g07920 product is closely related to the PKS involved in OTA biosynthesis described by O'Callaghan et al. (2003) and with a PKS from *A. carbonarius*.

Chemically, OTA is a 2-(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-isochroman-7-yl) carbonylamino-3-phenyl-propanoic acid that was classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993) as a possible human carcinogen (group 2B). It was

isolated in 1965 from a culture of *A. ochraceus* (van der Merwe et al., 1965), but subsequent studies have revealed that some other fungal species, including *A. niger sensu stricto*, are able to produce this toxin as well (reviewed by EL Khoury and Atoui, 2010).

Very recently, Huffman et al. (2010) proposed a biosynthetic pathway for OTA. Their hypothesis includes a PKS involved in the synthesis of the PK dihydroisocoumarin, a methyltransferase (or a C-MeT domain within the PKS), and a P450-type oxidation enzyme for the formation of the carboxyl group at C7. In addition, they hypothesize that an NRPS catalyzes the ligation of phenylalanine with the PK, and a halogenase (chloroperoxidase) incorporates the chlorine atom. However, none of the biosynthetic steps have been genetically or biochemically established. In our study, we found that all of the genes included in the 22 Kb region, which is present in CBS 513.88 and absent in ATCC1015, have a predicted function that is expected in the OTA synthesis mechanism: PKS (An15g07920), NRPS (An15g07910), cytochrome P450 (An15g07900), and FAD-binding oxidoreductase (An15g07880). However, a gene encoding the enzyme responsible for the chlorination of OTA was not identified in this cluster.

The predicted PKS enzymatic domains:  $\beta$ -ketoacyl synthase (KS), acyl transferase (AT), dehydratase (DH), methyltransferase (CMeT), enoylreductase (ER), ketoreductase (KR), and acyl carrier protein (ACP) were found in the hypothetical protein encoded by An15g07920 suggesting that it yields products that are highly reduced. Interestingly, a C-MeT domain is within the putative PKS encoded by An15g07920, which is important for OTA biosynthesis. *A. carbonarius* is an important ochratoxigenic species that is closely related to *A. niger*. In general, this species produces larger amounts of OTA than *A. niger*, and most *A. carbonarius* strains have the ability to produce the toxin. A comparison of the gene cluster that contains the PKS An15g07920 in *A. niger* CBS 513.88 against the strain ITEM 5010 of *A. carbonarius* revealed the same organization of ORFs, high sequence similarity, but in a different genomic context.

It is important to note that when the annotation of the CBS 513.88 genome was completed, descriptions of gene involvement in OTA biosynthesis were only available for *A. ochraceus* and *Penicillium nordicum* (Karolewicz and Geisen, 2005; O'Callaghan et al., 2003). Based on the sequence identity of An15g07920 with the *A. ochraceus* *pks* gene product reported by O'Callaghan et al. (2003), a putative ochratoxin biosynthesis function was predicted for this ORF. Additional evidence of the involvement of certain genes involved in OTA biosynthesis was later discovered. Bacha et al. (2009) reported that a disruption of the gene *awks1* (GeneBank Accession Number: AY583209) inhibited the biosynthesis of OTA in

*A. westerdijkiae* (a recently dismembered species of *A. ochraceus*). Given that *awks1* is different from the *pks* gene described by O'Callaghan et al. (2003), the authors concluded that two PKS proteins may be involved in OTA biosynthesis in *A. westerdijkiae*. In fact, two groups of PKS enzymes that are hypothesized to be involved in OTA biosynthesis can be observed in our phylogenetic analyses (Figure 2).

The Blast comparisons showed that among all *pks* predicted for the *A. niger* CBS 513.88 genome, the best match (54% identity at the deduced amino acid level) to that described by Bacha et al. (2009) was the putative product of *pks* gene An04g04340. This gene was detected *in silico* in both *A. niger* genomes (CBS 513.88 and ATCC 1015), and was detected in 96% of the strains analyzed in the present study. Moreover, an association between the PCR profile and OTA production was not detected (data not shown). In *A. carbonarius*, a correlation between the expression of the *ACpks* gene and OTA production was reported by Gallo et al. (2009), suggesting that this gene product is involved in OTA biosynthesis. The Blast comparisons showed that among all the predicted *pks* genes in the *A. niger* CBS 513.88 genome, the best match (86% identity at the deduced amino acid level) to that described by Gallo et al. was the putative *pks* gene An18g00520. Similarly, this gene was detected *in silico* in both *A. niger* genomes (CBS 513.88 and ATCC 1015), and was detected in 100% of the strains analyzed in the present study (data not shown).

Additional data showed that one *A. ochraceus* putative P450-type monooxygenase gene (P450-B03) has an expression profile that is very similar to that of the *pks* involved in OTA biosynthesis (O'Callaghan et al., 2006), suggesting that these genes may be clustered in the *A. ochraceus* genome. Based on the Blast analysis, we observed that among all P450 genes predicted in the *A. niger* CBS 513.88 genome, the most similar (with 61% identity) to *A. ochraceus* P450-B03 was the putative P450 gene An15g07900, which was located adjacent to An15g07920 but also absent in the ATCC 1015 genome.

OTA production in *A. niger sensu stricto* was previously found to be restricted to only 3-10% of the strains (Taniwaki et al., 2003), and the cause of this variation was unknown until now. Our PCR-based experimental data showed that the putative *pks* gene annotated as An15g07920 in *A. niger* CBS 513.88 exists in only 26% of the wild-type *A. niger* strains analyzed in this study. Interestingly, this gene was exclusively detected in OTA producing strains, which suggests a clear association between the molecular profiles and OTA phenotype. Andersen et al. (2011) examined the exo-metabolomic profiles of 11 *A. niger* strains, including CBS 513.88 and ATCC 1015. Among several secondary metabolites analyzed, only ochratoxin and nigragillin were produced by the CBS 513.88 strain but not the

ATCC 1015 strain. These findings provide additional evidence of the association between the presence of An15g07920 and the capability of OTA production.

In conclusion, based on the structural complexity of PKS family proteins, functional studies remain a necessity to elucidate OTA biosynthetic steps in *A. niger* in both genetic and biochemical terms. However, we expect that our results showing a clear association between the gene An15g07920 and an OTA positive phenotype can leverage the characterization of the OTA biosynthetic process. We also demonstrated that two additional *pks* genes (An01g01130 and An11g05940), which until now have not had an identified function, are strain-specific genes. This information possibly will provide clues for designing and building future studies.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the following Brazilian institutions: Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), and Fundação Araucária.

## REFERENCES

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G., Cabañes, F.J., 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2650–2652.
- Andersen, M.R., Salazar, M.P., Schaap, P.J., van de Vondervoort, P.J.I., Culley, D., Thykaer, J., Frisvad, J.C., Nielsen, K.F., Albang, R., Albermann, K., Berka, R.M., Braus, G.H., Braus-Stromeyer, S.A., Corrochano, L.M., Dai, Z., van Dijck, P.W.M., Hofmann, G., Lasure, L.L., Magnuson, J.K., Menke, H., Meijer, M., Meijer, S.L., Nielsen, J.B., Nielsen, M.L., van Ooyen, A.J.J., Pel, H.J., Poulsen, L., Samson, R.A., Stam, H., Tsang, A., van den Brink, J.M., Atkins, A., Aerts, A., Shapiro, H., Pangilinan, J., Salamov, A., Lou, Y., Lindquist, E., Lucas, S., Grimwood, J., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P., Martinez, D., van Peij, N.N.M.E., Roubos, J.A., Nielsen, J., Baker, S.E., 2011. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Research* 21, 885-897.

- Azevedo, A.C.S., Furlaneto, M.C., Souza-Gomes, D.R., Fungaro, M.H.P., 2000. Molecular characterization of *Paecilomyces fumoroseus* (*Deuteromycotina Hyphomycetes*) isolates. *Scientia Agricola* 57, 729–732.
- Bacha, N., Atoui, A., Mathieu, F., Liboz, T., Lebrihi, A., 2009. *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene “aoks1” is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. *Fungal Genetics and Biology* 46, 77–84.
- Dao, H.P., Mathieu, F., Lebrihi, A., 2005. Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *International Journal of Food Microbiology* 104, 61–67.
- EL Khoury, A., Atoui, A., 2010. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins* 2, 461-493.
- Fedorova, N.D., Khaldi, N., Joardar, V.S., Maiti, R., Amedeo, P., Anderson, M.J., Crabtree, J., Silva, J.C., Badger, J.H., Albarraq, A., Angiuoli, S., Bussey, H., Bowyer, P., Cotty, P.J., Dyer, P.S., Egan, A., Galens, K., Liggett-Fraser, C.M., Haas, B.J., Inman, J.M., Kent, R., Lemieux, S., Malavazi, I., Orvis, J., Roemer, T., Ronning, C.M., Sundaram, J.P., Sutton, G., Turner, G., Venter, J.C., White, O.R., Whitty, B.R., Youngman, P., Wolfe, K.H., Goldman, G.H.; Wortman, J.R., Jiang, B., Denning, D.W., Nierman, W.C., 2008. Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet* 4: e1000046. doi: 10.1371/journal.pgen.1000046.
- Fedorova, N.D., Nierman, W.C., 2010. Comparative genomics of *Aspergillus*. In: Machida, M., Gomi, K. (Eds.), *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 41-60.
- Filtborg, O., Frisvald, J.C., Svendensen, J.A. 1983. Simple screening method formolds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 581-585.
- Fisch, K.M., Gillaspay, A.F., Gipson, M., Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Jackson, L., Najar, F.Z., Wägele, H., Cichewicz, R.H., 2009. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36,

1199–1213.

Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larse, T.O., Thrane U., 2007. Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 9727-9732.

Fungaro, M.H.P., Vieira, M.L.C., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L., 1996. Diversity among soil and insect isolates *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. *Letters and Applied Microbiology* 22, 389–392.

Gallo, A., Perrone, G., Solfrizzo, M., Epifani, F., Abbas, A., Dobson, A.D.W., Mulè, G., 2009. Characterisation of a *pks* gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology* 129, 8–15.

Gautam, A.K., Sharma, S.A., Bhadauria, R., 2011. Diversity, Pathogenicity and Toxicology of *A. niger*: An Important Spoilage Fungi. *Research Journal of Microbiology* 6, 270-280.

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.

Huffman, J., Gerber, R., Du, L., 2010. Recent Advancements in the Biosynthetic Mechanisms for Polyketide-Derived Mycotoxins. *Biopolymers* 93, 764-766.

IARC (International Agency for Research on Cancer) 1993. Ochratoxin A. In: *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 56. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents. Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 489–521.

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

O’Callaghan, J., Caddick, M.X., Dobson, A.D.W., 2003. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology* 149, 3485–3491.

O’Callaghan, J., Stapleton, P.C., Dobson, A.D.W., 2006. Ochratoxin A biosynthetic genes in



*Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics and Biology* 43, 213–221.

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

Palmer, J.M., Keller, N.P., 2010. Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Current Opinion in Microbiology* 13, 431-436.

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

Rokas, A., Payne, G., Fedorova, N.D., Baker, S.E., Machida, M., Yu, J., Ryan Georgiana, D., Dean, R.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Wortman, J.R., Maiti, R., Joardar, V., Amedeo, P., Denning, D.W., Nierman, W.C., 2007. What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*? *Studies in Mycology* 59, 11-17.

Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, third ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Samson, R.A., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M., Frisvad, J.C., 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 50, 45–61.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74, 5463–5467.

Sun, J., Lu, X., Rinas, U., Zeng, A.P., 2007. Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biology* 8, R182.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. (In Press).

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. *International Journal of Food Microbiology* 82, 173–179.

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, 4673-4680.

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

van der MERWE, K.J., STEYN, P.S., FOURIE, L., SCOTT, D.B., THERON, J.J., 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205, 1112-1113.

Vargas, E.A. Santos, E.A., Pittet, A. 2005. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography collaborative study. *Journal of AOAC International* 58, 773-779.

von Döhren, H., 2009. A survey of nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 46, S45-S52.

Web references

<[www.jcvi.org/smurf/](http://www.jcvi.org/smurf/)> Accessed August 2010.

<<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>> Accessed July 2011.

<<http://fungi.ensembl.org/index.html>> Accessed July 2011.

<<http://genome.jgi-psf.org/Aspni5/Aspni5.home.html>> Accessed July 2011.

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomeprj/19263>> Accessed June 2011.

## Figure Legends

**Figure 1.** Comparative sequence analysis of the putative ochratoxin gene cluster harboring PKS An15g07920 of *A. niger* CBS 513.88, and equivalent genomic regions of *A. niger* ATCC 1015 and *A. carbonarius* ITEM 5010 v3. Each line represents the genomic context of equivalent regions. Gray arrows represent genes within the cluster; and black arrows, bordering genes common to all genomes. Annotations ID either from JGI or NCBI are shown inside arrows. Genomic coordinates are depicted along the dotted lines. Amino acid sequence similarities between orthologs are shown within shaded areas as well as similarities in nucleotide sequences of intergenic regions. As indicated, *A. niger* ATCC 1015, carries a truncated version of An15g07920. (Based on the NCBI annotation updated on 31-May-2011).

**Figure 2.** Dendrogram showing amino acid sequence similarity relationships among selected PKSs. Type I PKSs were selected from different organisms and various predicted functions in addition to five PKSs of *A. niger* and two of *A. carbonarius*. Black triangles represent *pks* genes missing in *A. niger* ATCC 1015. The dendrogram was inferred by Neighbor-Joining analysis, with distances computed using the JTT matrix-based method and bootstrap consensus tree from 500 replicates. Analyses were conducted in MEGA5 [Tamura et al., 2011].

**Figure 3.** (A) A phylogenetic tree of *Aspergillus* from section *Nigri* based on  $\beta$ -tubulin gene sequences. Numbers above the branches correspond to bootstrap values generated by CLUSTAL X 1.6. (B) RAPD profiles of 39 *A. niger* strains using the primer OPX-7. M, 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

**Figure 4.** Schematic representation and domain architecture of the PKS An15g07920 (GenBank: CAK42679.1). Horizontal bars in black represent the location of each protein domain identified by INTERPRO (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>); KS(12-434): beta-ketoacyl synthase, AT (572-907): acyl transferase, DH (959-1133): dehydratase, CMeT (1441-1553): methyltransferase type 12, ER (1840-2146): enoyl reductase, KR (2170-2349):  $\beta$ -ketoreductase, and ACP (2456-2534): acyl carrier protein. Vertical dotted lines define the limits of all nine exons. Approximate positions of primers used for PCR are represented as black arrows.

**Figure 5.** Association between An15g07920 and OTA production capability of each strain, as demonstrated by PCR performed with two primer pairs, PKS15CMeT (A) and PKS15KS (B). PCR detected a 998 bp band and a 776 bp band, respectively, in the ochratoxin producing strains only.

**Figure 6.** Association between An15g07920 and OTA production capability of each strain, as demonstrated by Southern blot analysis of randomly selected *A. niger* OTA producing (lanes 1-7) and OTA non-producing strains (lanes 8-12). For hybridization, a fragment of the *pks* gene was labeled with  $^{32}\text{P}$  and used for the assay. Lane 13 shows the plasmid with the probe, which served as the positive control.

Figure 1.

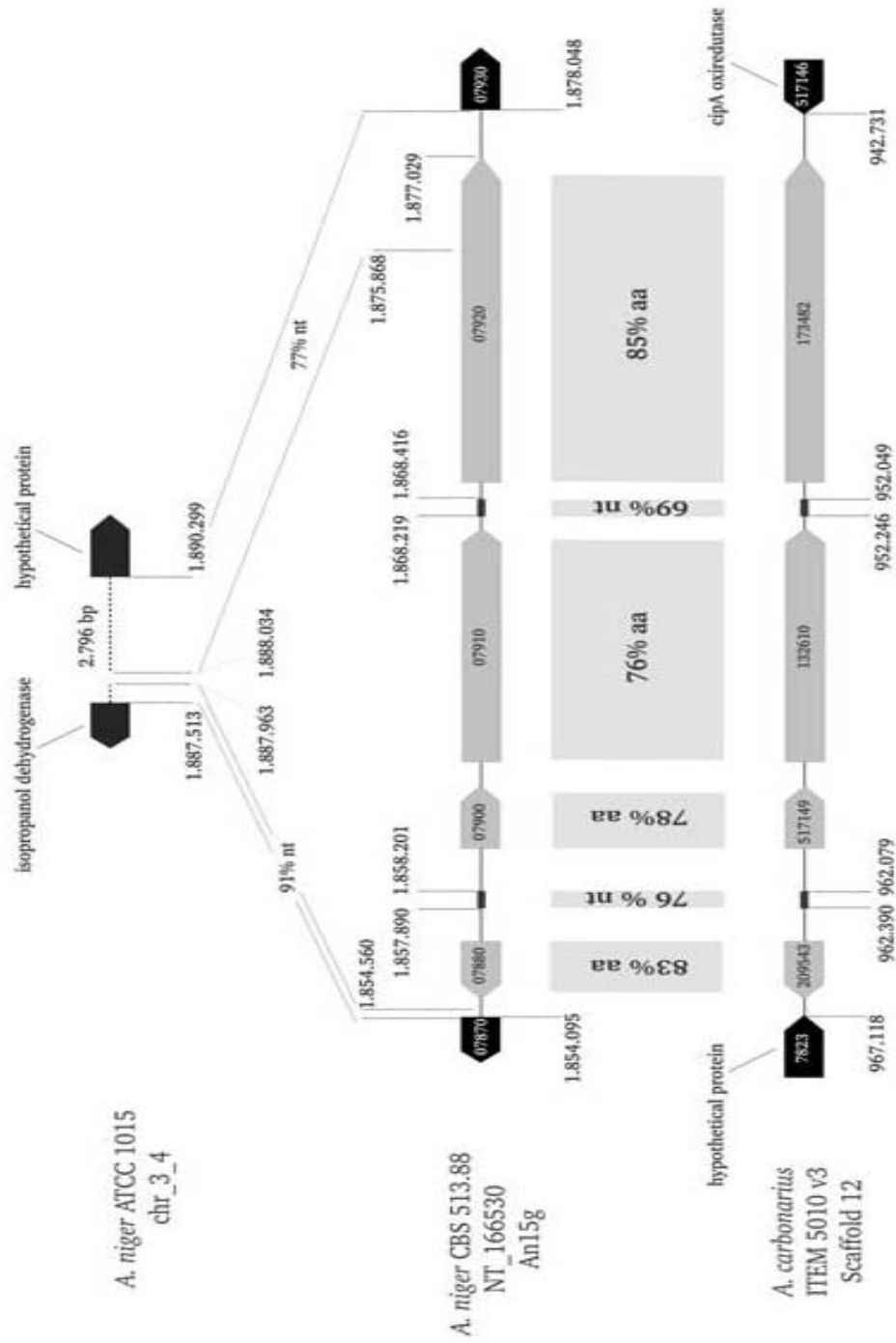


Figure 2.

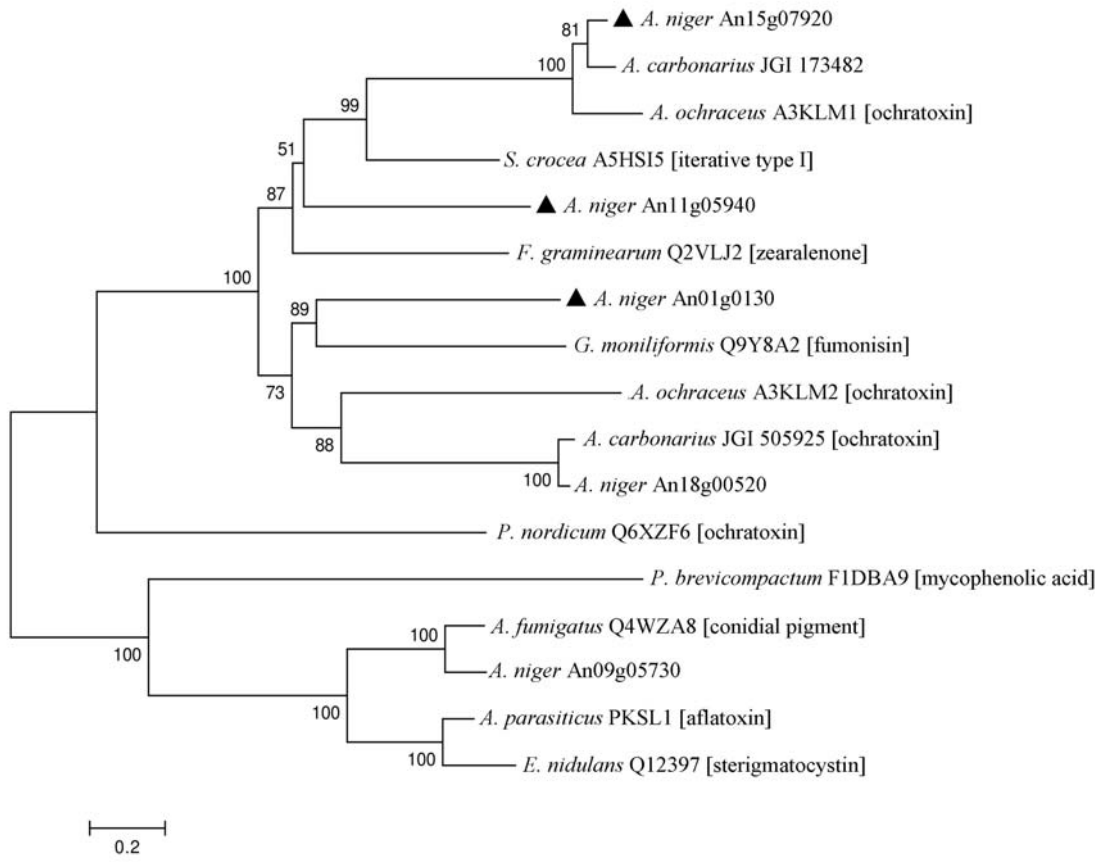


Figure 3.

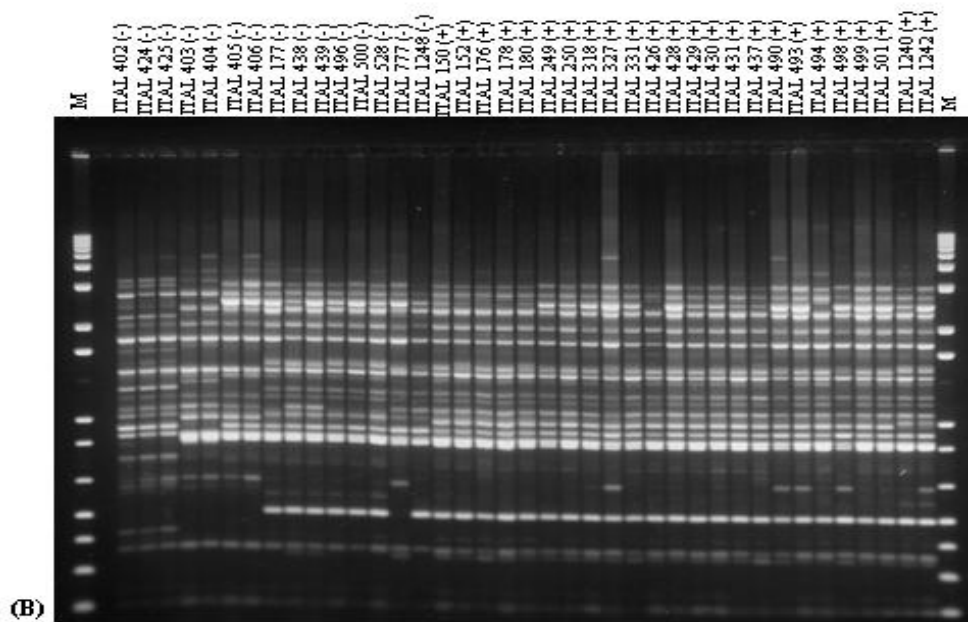
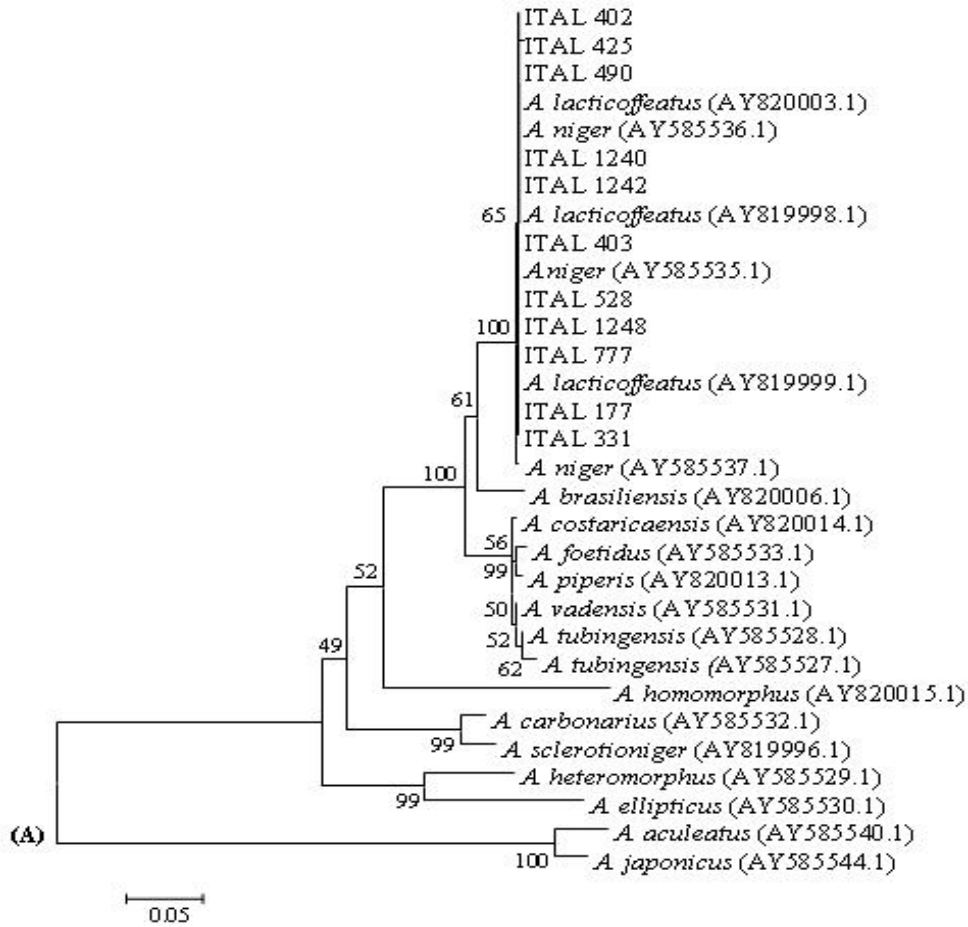




Figure 4.

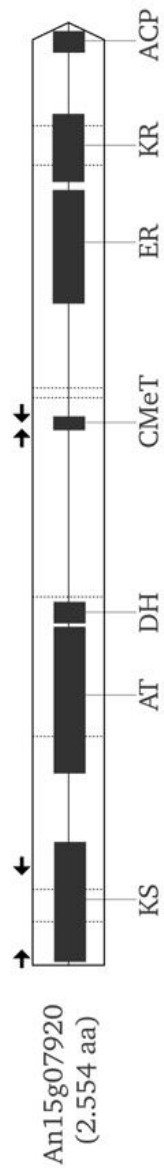




Table 1. Target gene, designation, sequence, annealing temperature, and expected amplicon size, of the primer pairs used in the study.

Gene	Domain	Primer	Sequence	Ta (°C)	Amplicon size (bp)
An01g011 30	KS	PKS01KSF	CACTCCACCTTGCTTGTA	58	536
		PKS01KSR	A GCCCCGTTGCTCTTTGCGA		
An04g043 40	KS	PKS04KSF	GTGATGTAGCGTCCAAG	60	382
		PKS04KSR	CCT GAGAGCCGATTAGCAAG		
An11g059 40	KS	PKS11KSF	TACGAGGCTATGGAAAA	58	863
		PKS11KSR	TG AGAGTGGCTGACCTGGC		
An15g079 20	KS	PKS15KSF	CAATGCCGTCCAACCGT	60	776
		PKS15KSR	ATG CCTTCGCCTCGCCCGTAG		
An15g079 20	CMeT	PKS15CMe	GCTTTCATGGACTGGATG	62	998
		TF	CATTTGTTGATCCCATC		
An18g005 20	AT	PKS15CMe	G	62	440
		TR			
An18g005 20	AT	PKS18ATF	AATCCCCTATCTTCCTCC	62	440
		PKS18ATR	AG GTTTACAGCAGCAATGA CAGC		

Table 2. A comparison of 34 predicted *pks* sequences present in *A. niger* CBS 513.88 against *A. niger* ATCC 1015 genome, performed using JGI BLAST search.

<b>PKS described in the genome of <i>A. niger</i> CBS 513.88</b>	<b>Linear mRNA size (bp)</b>	<b>Chromosome</b>	<b>Nomenclature updated by NCBI</b>	<b>% Coverage over the genome of <i>A. niger</i> ATCC 1015</b>	<b>% Identity over the genome <i>A. niger</i> ATCC 1015</b>
An01g01130	7,191	II	ANI_1_2198014	No homolog	
An01g06930	7,443	II	ANI_1_2672014	100%	99.35%
An01g06950	6,849	II	ANI_1_2676014	99.97%	97.63%
An02g00450	7,491	IV	This record was discontinued.	100%	99.80%
An02g09430	7,390	IV	ANI_1_2894024	100%	99.98%
An03g01820	6,405	VI	ANI_1_1088034	100%	99.81%
An03g05140	7,536	VI	ANI_1_1400034	100%	99.89%
An03g05440	6,429	VI	ANI_1_1430034	99.98%	97.53%
An03g06380	7,563	VI	ANI_1_1546034	100%	99.87%
An04g04340	7,392	VI	ANI_1_1824184	99.92%	99.73%
An04g09530	4,992	VI	ANI_1_2226184	100%	99.94%
An04g10030	7,845	VI	ANI_1_2294184	99.69%	99.35%
An07g01030	3,810	IV	ANI_1_1462064	100%	99.75%
An09g01290	7,365	I	ANI_1_1056084	100%	98.67%
An09g01860	7,854	I	ANI_1_1132084	100%	98.11%
An09g01930	7,677	I	ANI_1_1146084	100%	97.99%
An09g05340	7,314	I	ANI_1_1476084	100%	99.41%
An09g05730	6,462	I	ANI_1_726084	100%	99.98%
An10g00140	5,340	V	ANI_1_136174	99.93%	98.14%
An11g03920	8,247	VII	ANI_1_1892094	99.44%	98.38%
An11g04280	7,026	VII	ANI_1_1948094	100%	95.96%
An11g05570	7,509	VII	ANI_1_2050094	99.97%	98.21%
An11g05940	7,248	VII	ANI_1_2098094	No homolog	
An11g07310	5,382	VII	ANI_1_2242094	100%	98.01%
An11g09720	7,437	VII	This record was discontinued.	100%	98.71%
An12g02050	7,456	III	ANI_1_1474104	99.77%	96.57%
An12g02670	8,496	III	ANI_1_1558104	100%	99.91%
An12g02730	7,059	III	ANI_1_1566104	100%	99.99%
An12g07070	6,714	III	ANI_1_2048104	100%	99.98%
An13g02430	6,810	II	ANI_1_724114	99.94%	99.95%
An13g02960	2,712	II	ANI_1_756114	100%	99.98%
An15g04140	7,698	III	ANI_1_1430134	100%	99.77%
An15g05090	7,425	III	ANI_1_1564134	99.96%	99.91%
An15g07920	7,557	III	ANI_1_1836134	10.24%	89.73%

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Em relação à capacidade de produção de ocratoxina A, os trabalhos da literatura demonstram haver uma visão mais panorâmica para a seção *Nigri*. São várias as espécies suficientemente caracterizadas como produtoras ou não-produtoras desta micotoxina. Para a *A. niger sensu stricto*, tem-se que apenas de 2 a 10% dos isolados da espécie são produtores desta micotoxina. Sabendo-se que esta espécie tem ampla distribuição na natureza, a propriedade de *A. niger sensu stricto* produzir OTA não deve ser desconsiderada;

- Não eram conhecidas as causas pelas quais algumas linhagens de *A. niger sensu stricto* são capazes de produzir a ocratoxina A e outras não. Os resultados obtidos nesta tese, elucidaram que há uma associação positiva entre a presença do gene *pks* (An15g07920) e a habilidade em produzir a OTA. Acredita-se que esta revelação auxiliará na seleção de linhagens para uso industrial;

- *Aspergillus carbonarius* é pertencente à seção *Nigri* e é um importante produtor de OTA. A literatura aponta que cerca de 100% dos isolados desta espécie produz ocratoxina A. Apesar disso, até o momento nenhum gene foi suficientemente provado como envolvido na biossíntese desta micotoxina nesta espécie. Neste trabalho, demonstrou-se que esta espécie possui genes homólogos àqueles de *A. niger* associados à produção de OTA e pressupõe-se que este resultado possa se caracterizar como um ponto inicial para a elucidação de genes envolvidos nas diferentes etapas da biossíntese de ocratoxina A nesta importante espécie;

- Dados obtidos *in silico* e *in vivo* demonstraram que outras duas ORFs (An01g01130 e An11g05940) variam quanto a presença/ausência em linhagens de *A. niger*. A função destas ORFs ainda é desconhecida, mas acredita-se que esta informação possa vir a contribuir para a construção de futuros conhecimentos;

- Deseja-se considerar, por fim, que recentemente o Brasil publicou a legislação que estabelece limites máximos tolerados (LMT) de OTA em alimentos. Os resultados obtidos neste trabalho poderão ser úteis para o monitoramento, por meio de PCR, enfocando o gene An15g07920 de linhagens de *A. niger* produtoras de ocratoxina A.