



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LÍGIA UNO LUNARDI

**IDENTIFICAÇÃO DE UM GENE QUE AFETA A PRODUÇÃO
DE OCRATOXINA A EM *Aspergillus Carbonarius***

Londrina
2009

LÍGIA UNO LUNARDI

**IDENTIFICAÇÃO DE UM GENE QUE AFETA A PRODUÇÃO
DE OCRATOXINA A EM *Aspergillus Carbonarius***

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena P. Fungaro

Londrina
2009

LÍGIA UNO LUNARDI

**IDENTIFICAÇÃO DE UM GENE QUE AFETA A PRODUÇÃO
DE OCRATOXINA A EM *Aspergillus Carbonarius***

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Helena P. Fungaro
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 17 de abril de 2009.

*Aos meus pais, **Claudio e Amélia**,
incentivadores da minha caminhada,
com todo amor e admiração.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de realizar o curso de Pós- Graduação em Microbiologia;

À CAPES pela bolsa de estudo concedida;

À Profa. Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, orientadora deste trabalho, pela seriedade, conhecimento e incentivo ao longo destes anos;

À Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto, pela amizade e por todo o apoio científico durante a realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono, pela amizade e pelas valiosas sugestões sobre o trabalho;

À Profa. Maria Lucia Carneiro Vieira, pela disponibilidade do laboratório e equipamentos e pela grande hospitalidade que teve por mim em seu laboratório. Ao Luiz Ricardo Hanai pela colaboração no trabalho e disponibilidade.

À Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe, pela amizade e incentivo durante a realização deste trabalho;

A minha amiga e colega de curso Carla Beatriz Fier, pela colaboração no trabalho em várias etapas e, principalmente, pelo apoio e grande e sincera amizade em todos os momentos, sejam bons ou ruins, dos quais serão sempre lembrados com muito carinho;

A minha amiga Daniele Sartori, pela amizade durante vários anos, pelo conhecimento, pelo auxílio na realização deste trabalho e pelo carinho que sempre teve por mim;

As minhas amigas Roberta Losi Guembarovski e Lara Munique Ferracin, pelo auxílio para a realização deste trabalho, pela amizade e pelas boas conversas que tivemos;

Aos meus amigos de laboratório Lucas Eduardo e Daniel pelo incentivo e amizade;

A todos os amigos dos laboratórios vizinhos e ao técnico João Pereira dos Santos que muitas vezes me ajudaram, esclarecendo dúvidas e colaborando para a realização deste trabalho; Aos ex-colegas de laboratório (mas sempre amigos) Francine Matias de Paula, Luiz Rodrigo Morioka, Luis Gustavo Morello, Fernando Yuldi Ashikaga, Eber de Carvalho Paiva, Andréia Bogas, Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira, Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas-Boas. Grandes foram as amizades construídas;

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Microbiologia que muito

contribuíram para minha formação, em especial à Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta;

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação por compartilharem conhecimento e pela amizade, apesar do curto tempo de convivência;

Ao Danilo de Cuffa, pelo incansável amor e por todo auxílio, força, carinho, incentivo, compreensão e atenção que foram essenciais, principalmente nas horas mais difíceis, e pelos bons e verdadeiros momentos que compartilhamos. Faltam-me palavras para dizer o quanto sou grata;

Aos meus pais, Claudio Lunardi e Amélia Ayako Uno Lunardi, e a minha irmã, Vivian Uno Lunardi, pelo incentivo, compreensão e apoio incondicionais durante toda a minha vida;

A Deus por colocar as pessoas certas a cada passo da minha caminhada;

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho porque sem a ajuda das pessoas não construímos nada.

Meus sinceros agradecimentos.

O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele; destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.

Thomas Huxley

LUNARDI, Lígia Uno. **Identificação de um gene que afeta a produção de ocratoxina a em *Aspergillus Carbonarius***. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

A ocratoxina A é uma micotoxina produzida principalmente por espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, conhecida por apresentar efeitos nefrotóxicos e potencial carcinogênico. Com relação ao gênero *Aspergillus*, a espécie *A. carbonarius* é apontada como uma das maiores fontes de produção de ocratoxina A em alimentos como frutas secas, uvas, vinho e grãos de café. Genes envolvidos na via de biossíntese da ocratoxina A já foram identificados em algumas espécies produtoras. Em *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae* e espécies de *Penicillium* foi descrito um gene que codifica para a policetídeo sintase, uma enzima envolvida nos primeiros passos da biossíntese dessa micotoxina. Entretanto, para *A. carbonarius* ainda são poucos os estudos que visam identificar estes genes. O uso de mutantes insercionais para a identificação de genes associados a determinadas propriedades tem sido cada vez mais frequente na literatura. Neste trabalho foi investigada a região de integração do T-DNA em um mutante de *A. carbonarius*, previamente obtido por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, com o objetivo de encontrar uma associação entre o gene interrompido e a biossíntese de ocratoxina A. Este mutante apresentou baixa produção de ocratoxina A quando comparado com a linhagem selvagem. A integração do T-DNA ocorreu em um gene que possivelmente codifica uma proteína coativadora de *splicing*. Esta integração resultou na interrupção do gene e, além disso, causou uma deleção de 727pb. A deleção inclui a parte final do gene *coativador de splicing* e a uma região não-codificante entre esse gene e o gene *F-actina*. A análise da expressão relativa do gene *coativador de splicing* na linhagem selvagem cultivada em quatro diferentes meios que induzem ou reprimem a produção de ocratoxina A, mostrou uma associação entre o nível dos transcritos e a produção da toxina.

Palavras-chave: *Aspergillus carbonarius*. Ocratoxina A. PCR em tempo real. Proteína coativadora de *splicing*.

LUNARDI, Lígia Uno. **Identificação de um gene que afeta a produção de ocratoxina a em *Aspergillus Carbonarius***. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Ochratoxin A is a mycotoxin produced mainly by species belonging to the *Aspergillus* and *Penicillium* genera, known to have nephrotoxic effects and carcinogenic potential. With respect to the genus *Aspergillus*, *A. carbonarius* is the major source of ochratoxin A production in foods such as dried fruits, grapes, wine and coffee beans. Genes involved in the ochratoxin A biosynthesis pathway have been identified in some producers species. In *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae* and *Penicillium* species was described a gene that encodes a polyketide synthase, an enzyme involved in the early steps of the biosynthesis of this mycotoxin. However, there are few studies which purpose to identify these genes in *A. carbonarius*. The use of insertion mutants in order to identify genes associated with certain properties have been increasingly in the literature. In this work, the region of T-DNA integration was investigated in one *A. carbonarius* mutant previously obtained by the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, in order to find an association between interrupted gene and the biosynthesis of ochratoxin A. This mutant showed reduced ochratoxin A production when compared with the wild strain. The T-DNA integration occurred in a gene that possibly encodes a splicing coactivator protein. This integration resulted in the interruption of the gene and, furthermore, provoked a deletion length of 727bp. The deletion includes a final portion of a *splicing coactivator* gene and a non-coding region between this gene and the *F-actin* gene. The analysis of the relative expression of the *splicing coactivator* gene from *A. carbonarius* wild type strain in four different media that induce or repress the ochratoxin A production, showed an association between the transcript levels and the toxin production.

Keywords: *Aspergillus carbonarius*. Ochratoxin A. Real time PCR. Splicing coactivator protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferentes estruturas pertencentes ao grupo das ocratoxinas.....	20
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 METABOLISMO SECUNDÁRIO: PRODUÇÃO E REGULAÇÃO	13
2.2 MICOTOXINAS	16
2.3 PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A POR FUNGOS - DESTAQUE PARA <i>Aspergillus carbonarius</i>	18
2.4 VIA DE BIOSÍNTESE DA OCRATOXINA A	19
2.4.1 Estrutura e síntese	19
2.4.2 Genes que participam da biossíntese da ocratoxina A e outras micotoxinas	21
2.5 <i>Splicing</i> E REGULAÇÃO	25
2.6 BIOSÍNTESE DA OCRATOXINA A EM <i>Aspergillus carbonarius</i> E IDENTIFICAÇÃO DE GENES	27
3 OBJETIVOS	30
REFERÊNCIAS	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
ARTIGO – Identification of a gene that affects the production of ochratoxin A in <i>Aspergillus carbonarius</i>	46

1 INTRODUÇÃO

Os fungos estão entre os organismos de maior importância, não somente por atuarem como decompositores em vários ecossistemas, reciclando a matéria orgânica, mas também pelo impacto que causam nas atividades humanas (ROHLFS *et al.*, 2007). Muitas espécies são empregadas nas indústrias para a produção de enzimas e ácidos orgânicos, produtos farmacêuticos e alimentícios (KOBAYASHI *et al.*, 2007). Entretanto, os fungos também são vistos como organismos indesejáveis principalmente por causarem danos aos alimentos, alterando suas características organolépticas originais e comprometendo a qualidade do produto final. A ocorrência de fungos nos alimentos pode muitas vezes resultar na produção de micotoxinas (PITT, 2000).

As micotoxinas são moléculas orgânicas de baixa massa molecular provenientes do metabolismo secundário e frequentemente são detectadas em alimentos de origem vegetal, como cereais e sementes oleaginosas (BENNETT; KLICH, 2003). Entre os fatores ambientais que determinam a contaminação dos alimentos pelos fungos (e consequente produção de micotoxinas) destacam-se o excesso de umidade no campo e no armazenamento, temperaturas extremas, estiagem, práticas de colheita e infestação por insetos (revisado por YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002).

Uma diversidade de estruturas químicas é apresentada pelas micotoxinas e estão associadas com seus diferentes efeitos biológicos. Dependendo de sua natureza, estas micotoxinas podem ser carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas, neurotóxicas ou imunotóxicas. Os principais gêneros fúngicos associados à produção de micotoxinas em alimentos são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (FRISVAD, 1995; VARGA *et al.*, 1996).

Entre as várias micotoxinas existentes, a ocratoxina A tem despertado atenção por apresentar muitos efeitos adversos (CREPPY *et al.*, 2005) e estar presente em muitos alimentos, como cevada, milho, trigo, grãos de café, especiarias, uvas, frutas secas e outros. Espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Petromyces*, *Neopetromyces* e *Penicillium* já foram descritas como capazes de produzir ocratoxina A (PERRONE *et al.*, 2006; FRISVAD; THRANE; SAMSON, 2007). Entre as espécies do gênero *Aspergillus*, *A. carbonarius* tem se destacado por ser considerada uma das maiores fontes de produção de ocratoxina A em frutas secas, uvas e café (PARDO *et al.*, 2004; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006; SELMA; MARTÍNEZ-CULEBRAS; AZNAR, 2008).

A estrutura química da ocratoxina A já é conhecida. Esta toxina é

constituída de um pentacetídeo dihidroisocumarina ligado a um grupo L-fenilalanina por meio de uma ligação amida (HARRIS; MANTLE, 2001) e apresenta uma molécula de cloro em sua estrutura responsável pelo seu caráter tóxico que a difere das outras ocratoxinas (BAYMAN; BAKER, 2006). Entretanto, a via biossintética da ocratoxina A, bem como sua regulação, está longe de ser totalmente elucidada. Sabe-se que o esqueleto de pentacetídeo é formado pela condensação de acetato e malonato através da via de síntese de policetídeos e a L-fenilalanina é proveniente da via do ácido shikímico (MOSS, 1996 e 1998).

A maioria dos estudos que visam identificar genes envolvidos na biossíntese da ocratoxina A é focada em espécies de *Penicillium* (GEISEN *et al.*, 2004) e *Aspergillus ochraceus* (O'CALLAGHAN; CADDICK; DOBSON, 2003). Para *A. carbonarius*, alguns estudos têm surgido com o objetivo de identificar possíveis genes relacionados com a síntese desta toxina.

Atoui *et al.* (2006 e 2007) identificaram parte de um gene que codifica para uma policetídeo sintase em *A. carbonarius* e mostraram uma correlação positiva entre a quantidade de cópias deste gene e a quantidade de ocratoxina A encontrada em uvas. No entanto, esses autores não relataram o real envolvimento deste gene com a biossíntese de ocratoxina A. Em 2008, Botton *et al.* identificaram sequências diferencialmente expressas que supostamente poderiam estar envolvidas na biossíntese e/ou regulação da ocratoxina A em *A. carbonarius*. Apesar destes estudos, para *A. carbonarius* a caracterização de novos genes e a comprovação de sua participação na via biossintética da ocratoxina A ainda faz-se necessária.

Uma estratégia utilizada para a identificação de genes envolvidos em um determinado processo metabólico pode ser através do uso de métodos de transformação que geram mutantes insercionais. O sistema de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* tem se mostrado muito eficiente e vantajoso em relação aos outros métodos de transformação (COMBIER *et al.*, 2003; MORIOKA *et al.*, 2006). Recentemente, mutantes de *A. carbonarius* com alteração na capacidade de produção de ocratoxina A foram obtidos via transformação genética mediada por *A. tumefaciens* e um destes mutantes apresentou considerável redução da capacidade de produzir a micotoxina (LUNARDI *et al.*, 2006). No entanto, a identificação do gene interrompido em decorrência da transformação não foi realizada pelos autores. Dentro deste contexto, pode-se caracterizar esse gene interrompido com vistas a buscar uma associação entre esse gene e o fenótipo redução da produção de ocratoxina A. A identificação desta associação poderá contribuir com a literatura para melhor compreensão da biossíntese desta micotoxina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 METABOLISMO SECUNDÁRIO: PRODUÇÃO E REGULAÇÃO

Os fungos filamentosos utilizam vias bioquímicas únicas e incomuns para sintetizar uma variedade de componentes de baixa massa molecular, agrupados e conhecidos como metabólitos secundários. Embora bioquimicamente diversos todos os metabólitos secundários são produzidos por algumas vias biossintéticas comuns cuja ativação geralmente responde aos sinais provenientes do ambiente e está relacionada a restritas partes do ciclo de vida, acompanhando um específico estágio da diferenciação morfológica (BENNETT; BENTLEY, 1989). Estas correspondem às vias do metabolismo secundário.

O metabolismo secundário difere do primário pela natureza da sua ativação, pela diversidade dos compostos formados e pela especificidade das espécies envolvidas. Enquanto as vias do metabolismo primário são comuns a todas as espécies fúngicas e interage com as vias metabólicas gerais dos carboidratos, lipídeos e proteínas, as vias do metabolismo secundário podem ser específicas a algumas espécies ou mesmo a algumas linhagens (STEYN, 1998).

Em muitos casos, as funções que os produtos do metabolismo secundário desempenham no organismo não são conhecidas. Sabe-se que estes produtos estão associados à diferenciação celular ou desenvolvimento e, de fato, muitos metabólitos secundários são produzidos por organismos que exibem crescimento filamentosos e possuem uma relativa morfologia complexa (CALVO *et al.*, 2002). Alguns destes metabólitos incluem pigmentos (para a coloração dos esporos) e corpos de frutificação (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005).

Além disso, acredita-se que os metabólitos secundários também podem proporcionar uma vantagem para o organismo produtor, permitindo sua sobrevivência em seu nicho ecológico. Como muitos fungos vivem em condições ambientais adversas e são expostos a vários organismos competidores, determinados metabólitos secundários podem atuar como protetores da predação ou garantir uma vantagem competitiva, pois muitos destes componentes possuem efeitos tóxicos ou inibitórios para os outros organismos (FOX; HOWLETT, 2008). A título de exemplo, um mutante de *Aspergillus nidulans* que apresentou baixos níveis da produção de metabólitos secundários foi preferencialmente consumido pelo

artrópode fungívoro *Folsomia candida*, ao contrário da linhagem selvagem. Este fato sugere que a produção de metabólitos secundários pode influenciar a escolha alimentar dos predadores e proporcionar uma vantagem seletiva para o fungo produtor (ROHLFS *et al.*, 2007).

Devido a estas propriedades bioativas, muitos metabólitos secundários fúngicos mostraram-se de grande importância para a humanidade por possuírem naturalmente atividades antimicrobianas e farmacológicas (como a penicilina e a ciclosporina) ou pela possibilidade de serem empregados nas indústrias (como enzimas e vitaminas). Entretanto, outros metabólitos secundários podem apresentar propriedades negativas, como algumas substâncias tóxicas de importância agrícola (micotoxinas) (YU; KELLER, 2005).

Devido ao impacto causado por estes componentes na saúde pública, segurança alimentar, agricultura e economia de vários países, os metabólitos secundários fúngicos têm recebido considerável atenção da comunidade científica e muitos estudos têm surgido nos últimos tempos. Um particular interesse tem sido depositado no estudo da regulação de genes envolvidos na biossíntese destes metabólitos (SHWAB; KELLER, 2008).

A regulação do metabolismo secundário em fungos envolve múltiplas proteínas e complexos enzimáticos que respondem a vários estímulos ambientais e também de outros organismos. Além disso, a regulação parece estar relacionada com a organização cromossomal dos genes biossintéticos. Embora os genes eucarióticos envolvidos em uma via metabólica estão geralmente localizados em vários lugares do genoma, os genes requeridos para a produção de um dado metabólito secundário são frequentemente clusterizados, ou seja, adjacentes uns aos outros no cromossomo (KELLER; HOHN, 1997).

A sequência do genoma de *A. nidulans* e outras quatro espécies de *Aspergillus*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. fumigatus* e *A. niger* (GALAGAN *et al.*, 2005; MACHIDA *et al.*, 2005; NIERMAN *et al.*, 2005; PEL *et al.*, 2007) revelou a potencial existência de aproximadamente 40 clusters gênicos de metabólitos secundários em cada uma destas espécies. Muitos destes clusters identificados codificam metabólitos não conhecidos (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005). A razão pela qual estes clusters são formados e mantidos pelos fungos não é totalmente compreendida. No entanto, sabe-se que a clusterização confere uma vantagem seletiva para os fungos e esta vantagem pode estar relacionada com a eficiência da regulação gênica (SHWAB; KELLER, 2008).

Em geral, os genes presentes no cluster são co-regulados com a transcrição de todos os genes sendo ativada ou reprimida simultaneamente e independentemente dos genes localizados fora do cluster. Os genes do cluster codificam principalmente para enzimas

que catalizam passos no processo biossintético, mas também podem codificar fatores de transcrição necessários para a expressão gênica que atuam de forma específica na transcrição dos genes do cluster (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005).

Além desta regulação específica, a produção de um metabólito secundário também pode ser controlada por genes que codificam fatores de transcrição globais. Estes genes regulam múltiplos processos fisiológicos e geralmente respondem a sinais ambientais como pH, temperatura, luz e fontes de nutrição (YU; KELLER, 2005; HOFFMEISTER; KELLER, 2007). Um exemplo é a regulação nutricional realizada pela proteína AreA, um regulador do metabolismo do nitrogênio requerido para a produção de fumonisina B1 em *Fusarium verticillioides* (KIM, WOLOSHUK, 2008).

A produção de metabólitos secundários é também coordenada com o desenvolvimento geral do fungo. Bem como acontece com as condições ambientais, é vantajoso para o fungo produzir certos metabólitos secundários somente em estágios apropriados do desenvolvimento. Dessa forma, várias vias mediadas por sinais da proteína-G envolvidas com o desenvolvimento também regulam a expressão de clusters de metabólitos secundários (BRODHAGEN; KELLER, 2006).

Além da proteína-G, a proteína VeA, codificada pelo gene *veA* também parece estar relacionada com a morfogênese e metabolismo secundário. VeA positivamente regula a produção de muitos metabólitos secundários de *Aspergillus*, mas não é conhecida a ligação entre os efeitos da interação de VeA e a sinalização da proteína-G (KATO; BROOKS; CALVO, 2003; DURAN; CARY; CALVO, 2007). Em *Acremonium chrysogenum*, um gene com função semelhante ao gene *veA* foi recentemente caracterizado e os estudos indicaram que seu produto regula a expressão dos genes biossintéticos da produção de cefalosporina C e desenvolvimento fúngico dependente de fragmentação da hifa (DREYER *et al.*, 2007). Outros metabólitos secundários regulados por vias de sinalização incluem a produção de pigmentos por *Penicillium marneffei* e *Cryphonectria parasitica* (ZUBER; HYNES; ANDRIANOPOULOS, 2003) e regulação via proteína-G em *Botrytis cinerea* e *Trichoderma atroviride* (GRONOVER; SCHORN; TUDZYNSKI, 2004; REITHNER *et al.*, 2005).

Moléculas sinais tipo hormônio, conhecidas como oxilipinas, também contribuem para a regulação de metabólitos secundários. Estas moléculas estão envolvidas na produção de esporos em *Aspergillus* e são produzidas por oxigenases codificadas por genes *ppo* da via de síntese dos ácidos graxos (TSITSIGIANNIS *et al.*, 2004).

Um mecanismo global de controle da regulação do metabolismo secundário foi recentemente identificado quando a proteína LaeA foi descoberta. A disrupção do gene

que codifica esta proteína (*laeA*) resulta na produção de baixos níveis de muitos metabólitos secundários em espécies de *Aspergillus* (BOK; KELLER, 2004; BOK *et al.*, 2006). Em *A. fumigatus*, um estudo mostrou que *LaeA* controla a transcrição de cerca de 10% dos genes e muitos deles estão em 13 clusters de metabólitos secundários. Sete destes clusters estão em regiões sub-teloméricas, com alto grau de heterocromatina (PERRIN *et al.*, 2007).

O mecanismo pelo qual *LaeA* regula o metabolismo secundário ainda não foi totalmente determinado. Sugere-se que esta proteína pode estar envolvida na modificação da estrutura da cromatina no cluster de síntese do metabólito secundário (BOK *et al.*, 2006). *LaeA* assemelha-se a uma metiltransferase, uma categoria de enzima conhecida pelo seu importante papel na regulação epigenética de genes. Além disso, existe a evidencia de que *LaeA* pode alterar o estado de metilação de certas proteínas nucleares, possivelmente histonas ou outras proteínas associadas a cromatina (SHWAB; KELLER, 2008).

2.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas podem ser definidas como moléculas orgânicas de baixa massa molecular produzidas por fungos filamentosos que “provocam uma resposta tóxica quando introduzidas em baixa concentração em vertebrados superiores e outros animais por uma rota natural” (BENNETT, 1987 apud BRODHAGEN; KELLER, 2006). São produtos do metabolismo secundário produzidos por algumas espécies fúngicas naturalmente presentes no ambiente, no solo e sobre as culturas (YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002). O termo micotoxina vem do grego *mycos* que significa fungo e do latim *toxicum* que significa veneno. O mais antigo exemplo conhecido de envenenamento por micotoxinas é o ergotismo, causado pela ingestão de grãos contaminados com alcalóides produzidos pelo fitopatógeno *Claviceps purpúrea* (BENNETT; KLICH, 2003).

Os fungos podem contaminar os produtos alimentares vegetais em várias etapas: antes da colheita, quando ainda estão no campo, durante a própria colheita e mesmo após serem colhidos, como no armazenamento e transporte. Numerosos produtos agrícolas são afetados, incluindo cereais, frutas secas, nozes, grãos de café, uvas e sementes oleaginosas (D’MELLO; MCDONALD, 1997; SCUDAMORE; LIVESEY, 1998).

Em razão da diversidade de seus efeitos tóxicos (como efeitos carcinógenos e mutagênicos) e suas propriedades sinérgicas, que intensificam estes efeitos tóxicos, as

micotoxinas representam um grave risco para a população que consome os alimentos contaminados (YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002). Esta preocupação tornou-se tão grande que passou a ser alvo de diversas pesquisas no mundo, incluindo o impacto sobre a saúde pública, a segurança alimentar e a economia de números países (PITT, 2000).

Uma série de fatores ambientais é favorável à produção de micotoxinas. Isto inclui a sanidade das plantas antes da colheita, condições climáticas, procedimentos realizados na colheita, condições de armazenamento e transporte dos produtos. Outras condições ambientais como umidade, temperatura, tempo de incubação e tipo de substrato também podem representar importantes variáveis na colonização dos alimentos por fungos e na quantidade de micotoxina produzida (PALACIOS-CABRERA *et al.*, 2004). Em café, por exemplo, a contaminação e conseqüente produção de micotoxinas podem estar relacionadas a práticas de manejo durante a colheita e estocagem (URBANO *et al.*, 2001).

As micotoxinas podem estar contidas no micélio, no interior dos esporos ou serem liberadas no substrato. A atividade tóxica pode persistir nestes substratos por um longo tempo, mesmo após o completo desaparecimento dos fungos que as originaram. Além disso, elas podem ser absorvidas e ser transportadas sobre a forma de aerossóis agregados com partículas minerais ou orgânicas. Esta seria outra via de exposição ao homem por inalação (JARVIS; MILLER, 2005).

Uma vez presente nos alimentos, quando a matéria-prima está contaminada, dificilmente as micotoxinas são degradadas. Os métodos de conservação (esterilização, pasteurização, liofilização, congelamento), agem somente sobre os fungos e pouco destrói a maior parte das micotoxinas (CREPPY, 2002). Como são pouco metabolizadas pelos organismos vivos, as micotoxinas podem transmitir-se através da cadeia alimentar, sendo localizadas não somente em produtos vegetais, mas também em produtos de origem animal, como leite e produtos lácteos. Alimentos contaminados com doses elevadas de micotoxinas, quando ingeridos, podem causar intoxicações de evolução rápida com comprometimento de vários órgãos. Em doses mais baixas, porém frequentes, as micotoxinas podem induzir câncer e diminuir a resistência a doenças (FRISVAD, 1995).

Espécies toxigênicas pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são contaminantes comuns de alimentos e responsáveis pela produção de um considerável número de micotoxinas (CREPPY, 2002). Entre estas, as consideradas de maior dano econômico são as aflatoxinas, produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, tricotecenos (principalmente desoxinivalenol e toxina T-2), fumonisina e zeralenona produzidas por espécies de *Fusarium*, e ocratoxina, produzida por

espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (BRODHAGEN; KELLER, 2006). Dessa forma, a abordagem preventiva em relação às micotoxinas é de suma importância. Procedimentos realizados durante a colheita e estocagem, como controle da umidade e temperatura, podem ser úteis para evitar a contaminação dos alimentos pelos fungos e a consequente produção de micotoxinas.

2.3 PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A POR FUNGOS – DESTAQUE PARA *Aspergillus carbonarius*

A ocratoxina A foi descoberta, em 1965, em linhagens de *Aspergillus ochraceus* provenientes da África do Sul como sendo um dos primeiros grupos de metabólitos secundários fúngicos prejudiciais a animais (VAN DER MERVE *et al.*, 1965). Em anos subsequentes, outras espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram descritas como produtoras desta toxina (VARGA *et al.*, 1996). No gênero *Penicillium*, *P. verrucosum* e *P. nordicum* são as únicas espécies que mostraram ser capazes de produzir esta toxina (GEINSEN *et al.*, 2004). Enquanto estas espécies são responsáveis pela produção de ocratoxina A em cereais (LUND; FRISVAD, 2003), espécies de *Aspergillus* são apontadas como as principais contribuintes para a presença de ocratoxina A em café e uvas (VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

Já foram descritas mais de 20 espécies inclusas em diferentes seções do gênero *Aspergillus* como produtoras de ocratoxina A (FRISVAD *et al.*, 2004; FRISVAD; THRANE; SAMSON, 2007). Entretanto, poucas delas são conhecidas como fontes da contaminação de ocratoxina A nos alimentos. Com relação à seção *Nigri*, as espécies pertencentes ao chamado agregado *A. niger* e *A. carbonarius* são apontadas como as principais fontes de ocratoxina A em alimentos de clima tropical e subtropical (PITT, 2000). Vários estudos destacam *A. carbonarius* como uma das maiores fontes de produção de ocratoxina A em alimentos como frutas secas, uvas, vinho e café (CABAÑES *et al.*, 2002; SERRA *et al.*, 2003; PARDO *et al.*, 2004; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006; SELMA; MARTÍNEZ-CULEBRAS; AZNAR, 2008).

O primeiro relato da produção de ocratoxina A por *A. carbonarius* foi realizado por Horie (1995). Após isto muitos autores também relataram a produção de ocratoxina A por esta espécie. Em 1998, Heenan; Shaw; Pitt examinaram 33 linhagens de *A. carbonarius* e 115 linhagens de *A. niger* originárias da Austrália que foram isoladas de uma

mistura de frutas secas. Usando meio de cultura agar-coco, que fluoresce sob luz ultravioleta na presença da toxina, estes autores mostraram que 91% dos isolados de *A. carbonarius* e somente 2% dos isolados de *A. niger* foram produtores de ocratoxina A. Em outro estudo realizado por Bau *et al.* (2005) com uvas provenientes de diferentes regiões, dos 189 isolados de “*Aspergillus negros*” analisados, 123 foram identificados como *A. carbonarius*, sendo que 119 isolados (96,7%) eram produtores de ocratoxina A (0,1-654,3 µg/g).

Joosten *et al.* (2001) detectaram a produção de ocratoxina A por *A. carbonarius* em café cereja. Quase todos os isolados foram capazes de produzir a micotoxina em laboratório em níveis que variaram de 7 a 4810 µg/Kg quando em condições ótimas de temperatura e umidade (25°C, a_w 0,99). Da mesma forma, Taniwaki *et al.* (2003) investigaram a presença de fungos produtores de ocratoxina A em muitos exemplares de café provenientes de diferentes fazendas do Brasil. Estes autores relataram que 77% de 54 isolados de *A. carbonarius* eram potencialmente ocratoxigênicos (5 a 20 µg/Kg). Em contraste, somente 3% de 549 isolados de *A. niger* possuíam a capacidade de produzir ocratoxina A.

A análise da presença de fungos produtores de ocratoxina A em amostras de uvas portuguesas realizada por Serra *et al.* (2003) revelou que dos 370 isolados de *Aspergillus*, 39 isolados pertenciam a *A. carbonarius* e, destes, 97% eram ocratoxigênicos. Em outro estudo realizado por Battilani *et al.* (2006), a produção de ocratoxina A foi detectada em isolados do agregado *A. niger* e *A. carbonarius* obtidos de amostras de uvas italianas. Ao total foram 384 isolados capazes de produzir ocratoxina A, sendo 8% identificados como pertencentes ao agregado *A. niger* e 90% pertencentes a *A. carbonarius*.

2.4 VIA DE BIOSÍNTESE DA OCRATOXINA A

2.4.1 Estrutura e síntese

A ocratoxina A é uma micotoxina composta, derivada da ocratoxina α , constituída de um pentacetídeo dihidroisocumarina ligado através do grupo carboxil ao aminoácido L-fenilalanina (HARRIS; MANTLE, 2001). No grupo das ocratoxinas, a ocratoxina A é a forma mais encontrada e mais tóxica. Porém, este grupo também inclui outras estruturas, como a ocratoxina B e C, 4-hidroxi-ocratoxina A, metil ester da ocratoxina

A, B e C, e derivados do ácido carboxílico dihidrometil-isocumarina (ocratoxinas α , β , entre outras) (ALMELA *et al.*, 2007). A Figura 1 mostra estas estruturas.

Apesar de existirem informações sobre sua estrutura química, a via biossintética da ocratoxina A não está completamente elucidada (HARRIS; MANTLE, 2001; HUFF; HAMILTON, 1979). Sabe-se que o esqueleto de pentacetídeo é formado pela condensação de acetato e malonato através da via de síntese de policetídeos e a L-fenilalanina é proveniente da via do ácido shikímico (MOSS, 1996 e 1998). A molécula de cloro em sua estrutura, responsável pelo seu caráter tóxico (EDWARDS; O'CALLAGHAN; DOBSON, 2002), é incorporada nos últimos passos da biossíntese por uma cloroperoxidase (HARRIS; MANTLE, 2001).

Em 1979, Huff e Hamilton propuseram uma via hipotética baseada na estrutura da molécula de ocratoxina A. Nesta via, a meleína e a hidroximeleína seriam os prováveis precursores desta toxina. Em estudos mais recentes Harris e Mantle (2001) descreveram experimentos com precursores marcados da ocratoxina A. De acordo com seus resultados, a meleína, que foi proposta como um precursor da ocratoxina A por Huff e Hamilton, não desempenha um papel na via biossintética.

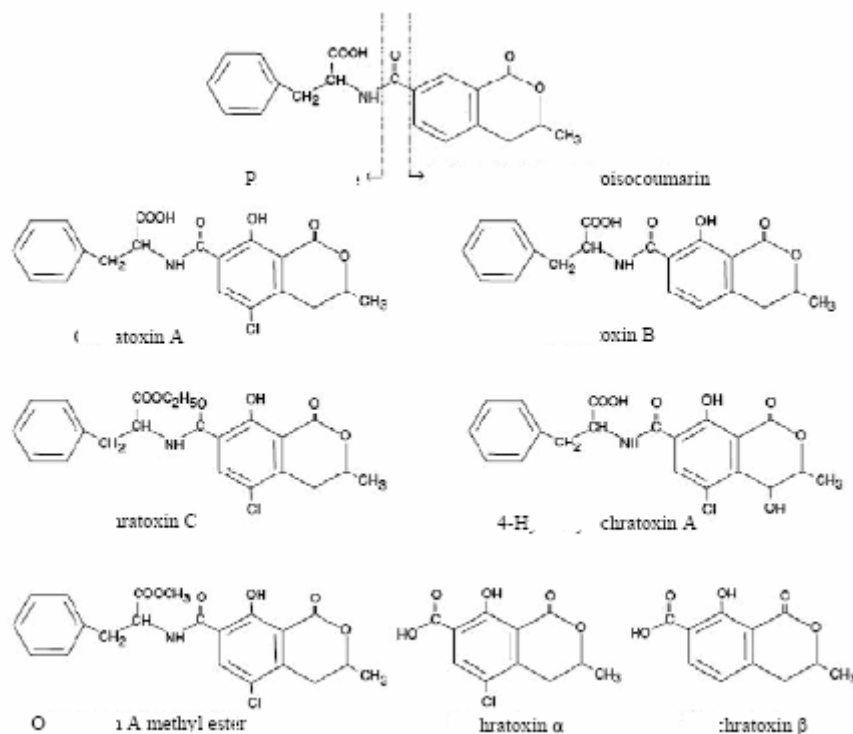


Figura 1 – Diferentes estruturas pertencentes ao grupo das ocratoxinas (ALMELA *et al.*, 2007).

Um estudo da cinética da produção de metabólitos secundários realizado por Bacha *et al.* (2009) com um mutante de *A. westerdijkiae* defectivo para a produção de ocratoxina A, demonstrou que a interrupção da biossíntese desta micotoxina não afetou a produção de meleína. Durante a cinética, os autores observaram uma baixa quantidade de ocratoxina A produzida pelo fungo e um crescente acúmulo de meleína, sugerindo que ambas, meleína e ocratoxina A, podem utilizar o mesmo precursor (como acetil-CoA), mas que a meleína não é um composto intermediário da biossíntese da ocratoxina A.

Muitas enzimas, além da via primária da Biossíntese de fenilalanina, são necessárias para a síntese de ocratoxina A. Estas enzimas são: uma poliketido sintase, responsável pela síntese do poliketido dihidroisocumarina, uma metilase para a formação do grupo carboxil, uma ocratoxina A sintase (peptídeo sintase) para a ligação do aminoácido fenilalanina ao poliketido, e finalmente uma cloroperoxidase ou halogenase para a introdução do átomo de cloro (FÄRBER; GEISEN, 2004).

A etapa central da via de biossíntese da ocratoxina A é a formação do poliketido. Esta formação, que é catalizada pela poliketido sintase, constitui de condensações descaboxilativas sucessivas de unidades de acetato (unidade iniciadora) e malonato (unidade adicionada), em um processo análogo à síntese de ácidos graxos (VARGA *et al.*, 2003). As poliketido sintases representam uma classe de enzimas com multidomínios que utilizam uma estratégia interativa para a construção do poliketido (FUJII *et al.*, 1998). Elas são requeridas para a biossíntese de várias toxinas, antibióticos e outros componentes biologicamente ativos produzidos por fungos (BROWN *et al.*, 2007).

2.4.2 Genes que participam da biossíntese da ocratoxina A e outras micotoxinas

Até o momento, poucos estudos que objetivam a identificação de genes envolvidos com a biossíntese da ocratoxina A têm surgido e a maioria destes estudos é focada em espécies de *Penicillium* e *Aspergillus ochraceus* (O'CALLAGHAN; CADDICK; DOBSON, 2003; GEISEN *et al.*, 2004).

Em *A. ochraceus* foi descrito parte de um gene, denominado *pks*, que codifica uma poliketido sintase similar a poliketido sintases fúngicas envolvidas na biossíntese de micotoxinas, como as fumonisinas e aflatoxinas. O envolvimento deste gene com a biossíntese de ocratoxina A foi confirmado por mutagênese insercional. Mutantes com

o gene *pks* inativado perderam, por consequência, sua habilidade de produzir a toxina (O'CALLAGHAN; CADDICK; DOBSON, 2003). Além disso, através da técnica de RT-PCR em tempo real, verificou-se que existe uma forte relação entre a expressão deste gene e a produção de ocratoxina A por *A. ochraceus* (O'CALLAGHAN; STAPLETON; DOBSON, 2006).

Para *Aspergillus westerdijkiae*, uma espécie recentemente desmembrada de *A. ochraceus* (FRISVAD *et al.*, 2004), dois diferentes genes que codificam para policetídeo sintase foram caracterizados (BACHA *et al.*, 2009). O gene *aoks1* apresentou similaridade com outros genes de policetídeos sintases requeridos para a síntese de metabólitos secundários e o gene *aolc35-12* foi similar ao gene *pks* de *A. ochraceus* caracterizado por O'Callaghan e colaboradores. Também através da mutagênese insercional, além de estudos da produção de outros metabólitos secundários pelo fungo, os autores confirmaram que o gene *aoks1* foi requerido para a biossíntese de ocratoxina A em *A. westerdijkiae*.

Em espécies de *Penicillium* também já foram parcialmente caracterizados genes que codificam para policetídeos sintases. Os genes *otapksPN* e *otapksPV* de *P. nordicum* e *P. verrucosum*, respectivamente, foram identificados e a sua expressão também foi correlacionada com a produção de ocratoxina A (GEISEN *et al.*, 2004; SCHMIDT-HEYDT *et al.*, 2007).

Além dos genes que codificam para policetídeos sintases, outros genes envolvidos com a biossíntese da ocratoxina A também foram descritos. Os genes *p450-H11* e *p450-B03* foram identificados em *A. ochraceus* e codificam monooxigenases do tipo citocromo p450 com alto grau de similaridade com outros genes que codificam monooxigenases envolvidas na biossíntese de micotoxinas, como aflatoxina e tricoteceno. Estes genes foram co-expressos com o gene *pks* durante a produção de ocratoxina A (O'CALLAGHAN; STAPLETON; DOBSON, 2006). Em *P. nordicum* foram identificados genes biossintéticos da ocratoxina A que codificam uma peptídeo sintase não-ribossomal (*otanpsPN*) e uma cloroperoxidase (*otachIPN*) (KAROLEWIEZ; GEISEN, 2005; GEISEN; SCHMIDT-HEYDT; KAROLEWIEZ, 2006).

Assim como para a produção de outros metabólitos secundários, os genes requeridos para as vias de síntese de micotoxinas também são clusterizados (YU; KELLER, 2005). Este fato tem sido demonstrado para as vias biossintéticas de tricoteceno (toxina T-2), zearalenona e fumonisina em espécies de *Fusarium* (HOHN; MCCORMICK; DESJARDINS, 1993; PROCTOR *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2005) e aflatoxina e esterigmatocistina em espécies de *Aspergillus* (YU; KELLER, 2005).

O cluster gênico da síntese de fumonisina já foi descrito em *F. verticillioides* e *Fusarium proliferatum* (PROCTOR *et al.*, 2003; WAALWIJK *et al.*, 2004). Em *F. verticillioides* o cluster consiste de 17 genes regulados coordenadamente, denominados genes *FUM*, que estão localizados em uma região de aproximadamente 45,5-kb do cromossomo 1 (PROCTOR *et al.*, 2008) e codificam enzimas biossintéticas, transportadores, proteínas supostamente envolvidas com a auto-proteção e um fator de transcrição (PROCTOR *et al.*, 2003; BROWN *et al.*, 2007).

Os clusters da aflatoxina em *A. parasiticus* e *A. flavus* contém aproximadamente 25 genes em uma região de 70-kb localizada próxima ao telômero do cromossomo 3, que codificam enzimas biossintéticas, incluindo ácidos graxos sintetases, policetídeo sintase, monooxigenases, redutases, dehidrogenases, metiltransferases, esterase, desaturase, oxidase e proteínas regulatórias (YU *et al.*, 2004). O cluster da esterigmatocistina, o penúltimo precursor da aflatoxina, em *A. nidulans* e os clusters da aflatoxina em *A. flavus* e *A. parasiticus* contém genes homólogos que codificam as mesmas funções enzimáticas, embora a ordem dos genes não seja conservada (BROWN *et al.*, 1996; YU *et al.*, 2004). Em *A. oryzae*, o cluster da aflatoxina é idêntico aos clusters de *A. flavus* e *A. parasiticus* (CARBONE *et al.*, 2007). No entanto, em algumas linhagens desta última espécie já foi relatada a duplicação de uma parte do cluster que inclui sete genes (CHANG; YU, 2002). Com relação à ordem dos genes e ao sentido da transcrição, os genes presentes no cluster da aflatoxina em *A. ochraceoroseus* são muito similares aos genes do cluster da esterigmatocistina de *A. nidulans*, porém são fragmentados em dois clusters (CARY; EHRLICH, 2006).

Em relação ao cluster da ocratoxina A, Geisen; Schmidt-Heydt; Karolewicz (2006) sugerem um possível cluster em *P. nordicum*. A primeira parte do cluster gênico está localizada em um fragmento de DNA de 10kb de comprimento e corresponde a três genes: um codifica uma protease alcalina serina e os outros são *otapksPN* (codifica uma policetídeo sintase) e *otanpsPN* (codifica uma não-ribossomal peptídeo sintase). A segunda parte do cluster está localizada em um fragmento de 4,3kb onde estão presentes o gene *otatraPN*, que codifica um possível transportador responsável por retirar a ocratoxina A da célula, o gene *otachIPN* (codifica uma cloroperoxidase) e um gene que codifica para um transportador de nitrato. Segundo os autores, este cluster gênico está presente somente em *P. verrucosum* e *P. nordicum*. Outras espécies, incluindo as do gênero *Aspergillus*, não apresentam este cluster.

Apesar dos avanços em estudos que objetivam identificar os genes envolvidos diretamente na via de biossíntese da ocratoxina A, pouco se conhece sobre os

mecanismos regulatórios desta via. Muitos dos genes que participam da regulação foram descritos para outras micotoxinas. Entre estes genes estão aqueles que codificam para fatores de transcrição, necessários para a expressão dos genes biossintéticos.

O exemplo típico é o gene *aflR* que está presente no cluster da aflatoxina/esterigmatocistina e codifica para uma proteína zinc binuclear cluster (ou $Zn(II)_2Cys_6$), denominada AflR, requerida para a ativação transcricional de muitos, se não todos, os genes da via (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005). Este tipo de fator de transcrição, exclusivamente encontrado em fungos, ativa a transcrição por se ligar a sequência palindrômica 5'-TCG(N5)GCA-3' encontrada em promotores dos genes do cluster (PAYNE; BROWN, 1998; EHRLICH; MONTALBANO; CARY, 1999). Em *A. flavus* e *A. parasiticus*, este fator de transcrição também se liga a sequência 5'-TTAGGCCTAA-3' em seu próprio promotor, sendo este sítio de regulação considerado importante para sua autorregulação (EHRLICH; MONTALBANO; CARY, 1999). A disrupção de *aflR* resulta na perda da transcrição dos genes estruturais e modificações em sua região promotora altera não somente a sua própria expressão mas também a subsequentemente expressão dos genes do cluster. Como consequência há a redução da produção de aflatoxina/esterigmatocistina (YU *et al.*, 1996; EHRLICH *et al.*, 1998).

Outros fatores de transcrição codificados por genes também presentes no cluster incluem proteínas Cys₂His₂ zinc finger, como Tri6 e MRTRI6, para a produção de tricotecenos por *Fusarium sporotrichioides* (PROCTOR *et al.*, 1995), proteínas *ankyrin-repeat* como a ToxE para a produção de toxina-HC por *Cochliobolus carbonum* (PEDLEY; WALTON, 2001), entre outras.

Embora os genes que codificam fatores de transcrição estejam localizados no cluster da via de biossíntese da micotoxina (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005), alguns genes já descritos que também afetam a biossíntese não estão localizados no cluster gênico, como é o caso de quatro genes de *F. verticillioides* – *FCK1*, *FCCI*, *PAC1* e *ZFR1* – que afetam a biossíntese da fumonisina.

O gene *FCK1*, que codifica uma kinase dependente de ciclina tipo-C, e o gene *FCCI*, que codifica uma proteína similar a ciclinas tipo-C, interagem e são partes de uma via sinal de transdução que afeta tanto a biossíntese de fumonisina quanto a morfogênese (SHIM; WOLOSHUK, 2001; BLUHM; WOLOSHUK, 2006). O gene *PAC1* codifica um fator transcricional que responde a variações do pH do ambiente e atua reprimindo a transcrição dos genes *FUM* em condições alcalinas (FLAHERTY *et al.*, 2003). O gene *ZFR1* codifica uma proteína $Zn(II)_2Cys_6$, Zfr1p, que também afeta a produção de fumonisina.

Estudos sugerem que a proteína codificada pelo gene *FCCI* pode ativar Zfr1p (FLAHERTY; WOLOSHUK 2004).

Assim como para outros metabólitos secundários, a produção de micotoxinas também está relacionada ao desenvolvimento fúngico através da regulação por vias de sinalização da proteína-G. Em *A. nidulans*, a subunidade α da heterotrimérica proteína-G, denominada FadA, promove o crescimento vegetativo e reprime tanto o desenvolvimento sexual/assexual como a produção de esterigmatocistina, bem como a produção de aflatoxina em *A. flavus* e *A. parasiticus* (CALVO *et al.*, 2002). Outro gene necessário para a regulação da síntese de esterigmatocistina é o *flbA*, cujo produto (FlbA) está envolvido com a regulação da proteína-G (YU *et al.*, 1996; HICKS *et al.*, 1997) e também pode atuar na repressão pós-transcricional de *AflR* (SHIMIZU *et al.*, 2003). O gene *fluG* também é requerido para conidiação e produção de esterigmatocistina em *A. nidulans*. O produto deste gene, FluG, é requerido indiretamente para biossíntese de esterigmatocistina, através da ativação de *flbA* e repressão de sinais de FadA (SEO; GUAN; YU, 2003). Outra proteína envolvida na produção de esterigmatocistina é a RasA, uma pequena proteína GTP-binding, cuja ativação inibe a biossíntese desta micotoxina por reprimir a expressão de *aflR* (SHIMIZU *et al.*, 2003).

2.5 *Splicing* E REGULAÇÃO

A expressão gênica em eucariotos, incluindo os fungos, depende do preciso funcionamento do mecanismo de *splicing* através do reconhecimento dos sinais de *splicing* e da formação de um complexo denominado spliceossomo. Os sinais de *splicing* estão presentes no pré-RNA e são: as sequências consensus da junção éxon-íntron denominadas local de corte 5' (do inglês *splice site 5' – 5'ss*) e 3' (3'ss), sítio de ramificação (do inglês *branch site – BS*), sequência localizada a montante do 3'ss, e o traço de polipirimidina localizado entre o 3'ss e o BS (BROW, 2002).

O spliceossomo é formado pela associação entre moléculas de pequenos RNA nucleares (snRNA, do inglês *small nuclear RNA*) e muitas outras proteínas, ambos conhecidos como fatores de *splicing*. Cada um dos snRNAs é capaz de unir-se com proteínas para formar complexos de pequenas ribonucleoproteínas nucleares, denominadas snRNP (do inglês *small nuclear ribonuclear protein*) (JURICA; MOORE, 2003). Os elementos

formadores do spliceossomo são capazes de reconhecer os sinais de *splicing* e quando ocorre sua correta e ordenada ligação, o resultado é a remoção dos íntrons e a ligação dos éxons adjacentes necessário para a obtenção de um RNAm capaz de ser traduzido em uma proteína funcional (MANIATIS; TASIC, 2002).

Uma família de proteínas que são altamente conservadas e estruturalmente e funcionalmente relacionadas a fatores de *splicing* do tipo não-snRNP são denominadas proteínas com domínio rico em serina e arginina (SR *proteins* ou SRp). Estas proteínas possuem um papel duplo no processo de *splicing*, afetando ambos *splicing* constitutivo e alternativo. Elas possuem um domínio constituído de um ou dois sítios de reconhecimento do RNA (RRMs, do inglês *RNA recognition motifs*) e um domínio C-terminal rico em resíduos de arginina e serina, denominado domínio RS (FU, 1995). Também existem proteínas que possuem domínio RS, denominadas SR- *protein-related polypeptides* (SRrp), mas não possuem RRM (BLENCOWE *et al.*, 1999) ou contém uma incomum distribuição dos domínios (TACKE *et al.*, 1998).

As SRp e SRrp participam de múltiplos estágios durante a formação do spliceossomo; elas atuam promovendo o reconhecimento estável dos 5' ss e 3' ss no pré-RNAm e podem modular a seleção dos *splice sites* no caso do *splicing* alternativo, além de facilitar o recrutamento de snRNPs. Portanto, elas possuem um papel chave na expressão gênica ao nível do processamento do RNA (FU, 1995; BLENCOWE *et al.*, 2000). Em alguns grupos de eucariotos, incluindo os fungos, já existem estudos que relatam as proteínas que possuem domínios RS. Um estudo realizado com um mutante de *A. nidulans* mostrou que o gene *swoK1* codifica uma SRp envolvida na regulação do mecanismo de controle da polaridade celular (SHAW; UPADHYAY, 2005).

O *splicing* alternativo também é um mecanismo que apresenta um importante papel na regulação, contribuindo para a complexidade biológica através de sua habilidade de controlar a expressão gênica. No *splicing* alternativo nem todos os íntrons são removidos, gerando diferentes tipos de RNAm a partir de um único gene (LAREAU *et al.*, 2004). Formas de *splicing* alternativo foram previamente descritas para poucos genes de fungos filamentosos, como *A. niger*, *Neurospora crassa* e outros (revisado por BROWN *et al.*, 2007).

Análises do genoma e dados de cDNA de *Cryptococcus neoformans* mostraram evidência de 277 formas alternativas de *splicing* (LOFTUS *et al.*, 2005) e um estudo com *A. nidulans* mostrou uma forte ligação entre as formas alternativas de *splicing* e a regulação gênica (MOROZOV *et al.*, 2006). Neste caso, as formas alternativas afetam a

expressão gênica por desviar os RNAs mensageiros para a degradação (LAREAU *et al.*, 2004).

Em *F. verticillioides* foi recentemente identificado o gene *FUM21* que codifica para um fator de transcrição zinc binuclear cluster (BROWN *et al.*, 2007). Este gene apresenta oito íntrons e está localizado adjacente ao *FUM1* (que codifica uma policetídeo sintase), no cluster da fumonisina, sendo um ativador positivo da transcrição dos genes *FUM* e desenvolve um crítico papel na biossíntese da fumonisina. A análise de treze transcritos deste gene mostrou que nove consistem de quatro diferentes tipos de formas alternativas de *splicing* que foram diferencialmente expressas, mostrando um envolvimento do *splicing* alternativo com a biossíntese da micotoxina.

2.6 BIOSÍNTESE DA OCRATOXINA A EM *Aspergillus carbonarius* E IDENTIFICAÇÃO DE GENES

Alguns genes relacionados com a biossíntese de ocratoxina A já foram descritos para algumas espécies fúngicas. Entretanto, o número de estudos que visam identificar estes genes em *A. carbonarius* ainda é reduzido.

Atoui *et al.* (2006 e 2007) identificaram parte de um gene que codifica para uma policetídeo sintase em *A. carbonarius* e, com o objetivo de quantificar diretamente a presença do fungo em amostras de uvas, os autores mostraram uma correlação positiva entre a presença deste gene e a quantidade de ocratoxina A encontrada nas amostras. No entanto, esses autores não relataram o envolvimento deste gene com a biossíntese de ocratoxina A.

Em 2008, Botton *et al.* identificaram 119 seqüências supostamente envolvidas na biossíntese e/ou regulação da ocratoxina A em *A. carbonarius*. Estas seqüências foram diferencialmente expressas em duas linhagens contrastantes para a habilidade de produzir a toxina e algumas delas apresentaram similaridade com genes envolvidos em biossíntese de toxinas, desenvolvimento vegetativo e sexual/assexual, e importantes fatores de transcrição.

Gallo *et al.* (2009) identificaram e caracterizaram uma parte do gene *ACpks* que codifica uma policetídeo sintase em *A. carbonarius* possivelmente envolvido com a produção de ocratoxina A. A transcrição do gene foi diferencialmente regulada, sendo os transcritos observados em meio permissivo e ausentes em meio restritivo para a produção da

toxina.

Apesar disto, nenhuma destas sequências foi provada estar envolvida com a biossíntese de ocratoxina A. Ou seja, para *A. carbonarius* a caracterização de novos genes e a comprovação de sua participação na via biossintética desta toxina ainda faz-se necessária.

Uma metodologia utilizada para a identificação de genes envolvidos em um determinado processo metabólico pode ser através do uso de mutantes insercionais obtidos a partir de transformação genética. Das diferentes técnicas de transformação, o sistema via *Agrobacterium tumefaciens* tem sido muito utilizado para a transformação de diferentes espécies de fungos filamentosos (MICHIELSE *et al.*, 2005). A integração do DNA exógeno (T-DNA) via *A. tumefaciens* no genoma pode ocorrer tanto por recombinação homóloga como por recombinação heteróloga. Esta última tem sido bastante utilizada para a obtenção de mutagênese aleatória em substituição aos métodos de mutagênese química e radioativa (KHANG *et al.*, 2005; SUGUI; CHANG; KWON-CHUNG, 2005).

Uma das vantagens da mutagênese insercional via *A. tumefaciens* sobre os métodos clássicos de indução de mutação é o número de inserções do T-DNA no genoma do fungo transformado. A obtenção de transformantes com inserções únicas é desejável, pois só assim pode-se assegurar que o fenótipo mutante está diretamente associado ao gene interrompido. A maioria dos trabalhos que fizeram uso do sistema *A. tumefaciens* para a transformação de fungos mostra que o T-DNA se insere em sítios aleatórios, que há uma predominância de inserções únicas no genoma do hospedeiro e que a integração ocorre preferencialmente em regiões codificantes do genoma (de GROOT *et al.*, 1998; COVERT *et al.*, 2001; MORIOKA *et al.*, 2006; BLAISEA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008).

Outra vantagem é que as sequências do genoma do hospedeiro que flanqueiam o sítio de inserção do T-DNA podem ser identificadas por técnicas baseadas em reações de PCR. Como se conhece a sequência do T-DNA inserido, todos os transformantes são “etiquetados” e a sequência do gene interrompido pode ser identificada (COMBIER *et al.*, 2003). Estas características tornam o método de transformação via *A. tumefaciens* bastante atraente quando se deseja obter fenótipos mutantes e identificar os genes a estes relacionados.

Alguns trabalhos relatam o emprego da mutagênese insercional via *A. tumefaciens* para a identificação de genes em fungos. Em 2005, Li *et al.* otimizaram a metodologia de transformação mediada por *A. tumefaciens* para o fungo *Coniothyrium minitans* e obtiveram uma biblioteca de trinta mil transformantes. A análise de sequências do DNA de um dos mutantes para esporulação mostrou que o gene que codifica para uma MAP kinase foi interrompido pelo T-DNA.

Já Idnurm *et al.* (2004) estudaram a potencialidade do método de agrotransformação para a obtenção de mutantes insercionais de *Cryptococcus neoformans*. Dentre 576 transformantes avaliados, três mutantes com deficiência na produção de melanina foram identificados. Para dois destes mutantes foi possível identificar o gene nocauteado. Com o objetivo de identificar os genes envolvidos na síntese de melanina, Walton; Idnurm; Heitman (2005) também investiram na mutagênese insercional deste fungo via *A. tumefaciens* e quatro novos alelos do gene que codifica para a lacase (*LACI*) foram identificados.

Recentemente mutantes de *A. carbonarius* com alteração na capacidade de produção de ocratoxina A foram obtidos via transformação genética mediada por *A. tumefaciens* (LUNARDI *et al.*, 2006). Um destes mutantes apresentou considerável redução da capacidade de produzir a micotoxina. Dentro deste contexto, pode-se identificar o gene interrompido em decorrência da transformação e buscar uma associação entre este gene e o fenótipo redução da produção de ocratoxina A. Esta associação pode ser realizada através da análise da expressão gênica.

Um método quantitativo muito sensível e confiável para analisar a expressão gênica é a PCR em Tempo Real. Esta técnica baseia-se na detecção e quantificação da fluorescência que aumenta em proporção direta à quantidade de produto de PCR durante a reação (MORRISON; WEIS; WITTEWER, 1998). Os sinais de fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. O ciclo em que o sinal emitido atinge o limiar da fase exponencial de amplificação, sendo superior à fluorescência basal, é denominado ciclo *threshold* (Ct) (GIBSON; HEIDI; WILLIAMS, 1996). Os valores de Ct são utilizados para os cálculos de quantificação da expressão gênica. Como muitos autores têm utilizado a PCR em Tempo Real para análise da expressão de genes envolvidos em biossíntese de micotoxinas (GEISEN *et al.*, 2004; O'CALLAGHAN; STAPLETON; DOBSON, 2006), pode-se também utilizar esta técnica para avaliar a expressão do gene identificado no mutante de *A. carbonarius*.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo investigar a região de integração do T-DNA em um mutante de *Aspergillus carbonarius* defectivo para a produção de ocratoxina A, previamente obtido por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, e buscar uma associação entre o gene disrupto pela transformação e a biossíntese de ocratoxina A.

REFERÊNCIAS

- ALMELA, L.; RABE, V.; SÁNCHEZ, B.; TORRELLA, F.; PÉREZ, J. P. L.; GABALDÓN, J. A.; GUARDIOLA, L. Ochratoxin A in red paprika: relationship with the origin of the raw material. **Food Microbiology**, v. 24, p. 319-327, 2007.
- ATOUI, A.; DAO, H. P.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A. Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, p. 488-493, 2006.
- ATOUI, A.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 313-318, 2007.
- BACHA, N.; ATOUI, A.; MATHIEU, F.; LIBOZ, T.; LEBRIHI, A. *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene “*aoksI*” is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 77-84, 2009.
- BATTILANI, P.; GIORNI, P.; BERTUZZI, T.; FORMENTI, S.; PIETRI, A. Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. S53-S60, 2006.
- BAU, M.; CASTELLÁ, G.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J. DNA-based characterization of ochratoxin-A-producing and non-producing *Aspergillus carbonarius* strains from grapes. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 375-381, 2005.
- BAYMAN, P.; BAKER, J. L. Ochratoxins: a global perspective. **Mycopathologia**, v. 162, p. 215-223, 2006.
- BENNETT, J. W.; BENTLEY, R. What's in a name? Microbiol secondary metabolism. **Advanced Applied in Microbiology**, v. 34, p. 1-28, 1989.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 497-516, 2003.
- BLAISEA, F.; RÉMY, E.; MEYER, M.; ZHOU, L.; NARCY, J. P.; ROUX, J.; BALESSENT, M. H.; ROUXEL, T. A critical assessment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for pathogenicity gene discovery in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 123-138, 2007.

BLENCOWE, B. J.; BOWMAN, J. A.; MCCRACKEN, S.; ROSONINA, E. SR-related proteins and the processing of messenger RNA precursors. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 77, p. 277-291, 1999.

BLENCOWE, B. J.; BAURÉN, G.; ELDRIDGE, A. G.; ISSNER, R.; NICKERSON, J. A.; ROSONINA, E.; SHARP, P. A. The SRm160/300 splicing coactivator subunits. **RNA**, v. 6, p. 111-120, 2000.

BLUHM, B. H.; WOLOSHUK, C. P. *Fck1*, a C-type cyclin-dependent kinase, interacts with *Fcc1* to regulate development and secondary metabolism in *Fusarium verticillioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, p. 146-154, 2006

BOK, J. W.; KELLER, N. P. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. **Eukaryotic cell**, v. 3, p. 527-535, 2004.

BOK, J. W.; NOORDERMEER, D.; KALE, S. P.; KELLER, N. P. Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, v. 61, p. 1636-1645, 2006.

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

BRODHAGEN, M.; KELLER, N. P. Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, p. 285-301, 2006.

BROW, D. A. Allosteric cascade of spliceosome activation. **Annual Review of Genetics**, v. 36, p. 333-360, 2002.

BROWN, D. W.; YU, J. H.; KELKAR, H. S.; FERNANDES, M.; NESBITT, T. C.; KELLER, N. P.; ADAMS, T. H.; LEONARD, T. J. Twenty-five co-regulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 93, p. 1418-1422, 1996.

BROWN, D. W.; BUTCHKO, R. A. E.; BUSMAN, M.; PROCTOR, R. H. The *Fusarium verticillioides* *FUM* gene cluster encodes a Zn(II)₂Cys₆ protein that affects *FUM* gene expression and fumonisin production. **Eukaryotic Cell**, v. 6, p. 1210-1218, 2007.

CABAÑES, F. J.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CASTELLÁ, G.; MINGUEZ, S.; PONS, A. What is the source of ochratoxin A in vine? **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 213-215, 2002.

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

CARBONE, I.; RAMIREZ-PRADO, J. H.; JAKOBEK, J. L.; HORN, B. W. Gene duplication, modularity and adaptation in the evolution of the aflatoxin gene cluster. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 1-12, 2007.

CARY, J. W.; EHRLICH, K. C. Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. **Mycopathologia**, v. 162, p. 167-177, 2006.

CHANG, P. K.; YU, J. Characterization of a partial duplication of the aflatoxin gene cluster in *Aspergillus parasiticus* ATCC 56775. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 632- 636, 2002.

COMBIER, J. P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G.; MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, p. 141-148, 2003.

COVERT, S. F.; KAPOOR, P.; LEE, M.; BRILEY, A.; NAIRN, C. J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycological Research**, v. 105, p. 259-264, 2001.

CREPPY, E. E.; MOUKHA, S.; BACHA, H.; CARRATU, M. R. How much should we involve genetic and environmental factors in the risk assessment of mycotoxins in humans? **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 2, p. 186-193, 2005.

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

D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science Technology**, v. 69, p. 155-166. 1997.

DE GROOT, M. J. A.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 839-842, 1998.

DREYER, J.; EICHHORN, H.; FRIEDLIN, E.; KURNSTEINER, H.; KUCK, U. A homologue of the *Aspergillus velvet* gene regulates both cephalosporin C biosynthesis and hyphal fragmentation in *Acremonium chrysogenum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3412-3422, 2007.

DURAN, R. M.; CARY, J. W.; CALVO, A. M. Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA*, a gene necessary for sclerotial formation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 1158-1168, 2007.

EDWARDS, S. G.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, A. D. W. PCR-detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research**, v. 106, p. 1005-1025, 2002.

EHRlich, K. C.; MONTALBANO, B. G.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E. Alteration of different domains in AFLR affects aflatoxin pathway metabolism in *Aspergillus parasiticus* transformants. **Fungal Genetics and Biology**, v. 23, p. 279-287, 1998.

EHRlich, K. C.; MONTALBANO, B. G.; CARY, J. W. Binding of the C6-zinc cluster protein, AFLR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. **Gene**, v. 20, p. 249-257, 1999.

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

FLAHERTY, J. E.; PIRTTILÄ, A. M.; BLUHM, B. H.; WOLOSHUK, C. P. *PAC1*, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5222-5227, 2003.

FLAHERTY, J. E.; WOLOSHUK, C. P. Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a zinc binuclear cluster-type gene, ZFR1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2653-2659, 2004.

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

FRISVAD, J. C. Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in storage. *In: Stored-grain Ecosystems*. Jayas, D. S.; White, N. D. G.; Muir, W. E. (ed.), Ed. CRC Press, p. 251-254, 1995.

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

FRISVAD, J. C.; THRANE, U.; SAMSON, R. A. Mycotoxin producers. *In: Food Mycology: a multifaceted approach to fungi and food*. Dijksterhuis, J.; Samson, R. A. (ed.), Ed. CRC Press, Série Mycology 25, p. 135-163, 2007.

FU, X. D. The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA*, v. 1, p. 663-680, 1995. FUJII, I.; WATANABE, A.; MORI, Y.; EBIZUKA, Y. Structures and functional analyses of fungal polyketide synthase genes. *Actinomycetologica*, v. 12, p. 1-14, 1998.

GALAGAN, J. E.; CALVO, S. E.; CUOMO, C.; MA, L. J.; WORTMAN, J. R.; BATZOGLOU, S.; LEE, S. I.; BAŞTÜRKMEN, M.; SPEVAK, C. C.; CLUTTERBUCK, J.; KAPITONOV, V.; JURKA, J.; SCAZZOCCHIO, C.; FARMAN, M.; BUTLER, J.; PURCELL, S.; HARRIS, S.; BRAUS, G. H.; DRAHT, O.; BUSCH, S.; D'ENFERT, C.; BOUCHIER, C.; GOLDMAN, G. H.; BELL-PEDERSEN, D.; GRIFFITHS-JONES, S.; DOONAN, J. H.; YU, J.; VIENKEN, K.; PAIN, A.; FREITAG, M.; SELKER, E. U.; ARCHER, D.; PEÑALVA, M. A.; OAKLEY, B. R.; MOMANY, M.; TANAKA, T.; KUMAGAI, T.; ASAI, K.; MACHIDA, M.; NIERMAN, W. C.; DENNING, D. W.; CADDICK, M.; HYNES, M.; PAOLETTI, M.; FISCHER, R.; MILLER, B.; DYER, P.; SACHS, M. S.; OSMANI, S. A.; BIRREN, B. W. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, v. 438, p. 1105-1115, 2005.

GALLO, A.; PERRONE, G.; SOLFRIZZO, M.; EPIFANI, F.; ABBAS, A.; DOBSON, A. D. W.; MULÈ, G. 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.

GEISEN, R.; MAYER, Z.; KAROLEWIEZ, A.; FÄRBER, P. Development of a real time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production by targeting the ochratoxin A polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 27, p. 501-507, 2004.

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.

GIBSON, U. E.; HEIDI, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 995-1001, 1996.

GRONOVER, C. S.; SCHORN, C.; TUDZYNSKI, B. Identification of *Botrytis cinerea* genes up-regulated during infection and controlled by Galpha subunit BCG1 using suppression subtractive hybridization (SSH). **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 17, p. 537-546, 2004.

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

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

HICKS, J. K.; YU, J. H.; KELLER, N. P.; ADAMS, T. H. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the Fada Ga protein-dependent signaling pathway. **EMBO Journal**, v. 16, p. 4916-4923, 1997.

HOFFMEISTER, D.; KELLER, N. P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 393-416, 2007.

HOHN, T. M.; MCCORMICK, S. P.; DESJARDINS, A. E. Evidence for a gene cluster involving trichothecene-pathway biosynthetic genes in *Fusarium sporotrichioides*. **Current Genetics**, v. 24, p. 291-295, 1993.

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

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

IDNURM, A.; REEDY, J. L.; NUSSBAUM, J. C.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. **Eukaryot Cell**, v. 3, p. 420-429, 2004.

JARVIS, B. B.; MILLER, J. D. Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 67-72, 2005.

JOOSTEN, H. M. L. J.; GOETZ, J.; PITTET, A.; SCHELLENBERG, M.; BUCHELI, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 39-44, 2001.

JURICA, M. S.; MOORE, M. J. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. **Molecular Cell**, v. 12, p. 5-14, 2003.

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.

KATO, N.; BROOKS, W.; CALVO, A. M. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. **Eukaryotic Cell**, v. 2, p. 1178-1186, 2003.

KELLER, N. P.; HOHN, T. M. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 21, p. 17-29, 1997.

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

KHANG, C. H.; PARK, S. Y.; LEE, Y. H.; KANG, S. A dual selection based, targeted gene replacement tool for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 483-492, 2005.

KIM, Y. T.; LEE, Y. R.; JIN, J.; HAN, K. H.; KIM, H.; KIM, J. C.; LEE, T.; YUN, S. H.; LEE, Y. W. Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. **Molecular Microbiology**, v. 58, p. 1102-1113, 2005.

KIM, H.; WOLOSHUK, C. P. Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, p. 947-953, 2008.

KOBAYASHI, T.; ABE, K.; ASAI, K.; GOMI, K.; JUVVADI, P. R.; KATO, M.; KITAMOTO, K.; TAKEUCHI, M.; MACHIDA, M. Genomics of *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 646-670, 2007.

LAREAU, L. F.; GREEN, R. E.; BHATNAGAR, R. S.; BRENNER, S. E. The evolving roles of alternative splicing. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, p. 273-282, 2004.

LI, M.; GONG, X.; ZHENG, J.; JIANG, D.; FU, Y.; HOU, M. Transformation of *Coniothyrium minitans*, a parasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, with *Agrobacterium tumefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, p. 323-329, 2005.

LOFTUS, B. J.; FUNG, E.; RONCAGLIA, P.; ROWLEY, D.; AMEDEO, P.; BRUNO, D.; VAMATHEVAN, J.; MIRANDA, M.; ANDERSON, I. J.; FRASER, J. A.; ALLEN, J. E.; BOSDET, I. E.; BRENT, M. R.; CHIU, R.; DOERING, T. L.; DONLIN, M. J.; D'SOUZA, C. A.; FOX, D. S.; GRINBERG, V.; FU, F.; FUKUSHIMA, M.; HAAS, B. J.; HUANG, J. C.; JANBON, G.; JONES, S. J. M.; KOO, H. L.; KRZYWINSKI, M. I.; KWON-CHUNG, J. K.; LENGELER, K. B.; MAITI, K.; MARRA, M. A.; MARRA, R. E.; MATHEWSON, C. A.; MITCHELL, T. G.; PERTEA, M.; RIGGS, F. R.; SALZBERG, S. L.; SCHEIN, J. E.; SHVARTSBEYN, A.; SHIN, H.; SHUMWAY, M.; SPECHT, C. A.; SUH, B. B.; TENNEY, A.; UTTERBACK, T. R.; WICKES, B. L.; WORTMAN, J. R.; WYE, N. H.; KRONSTAD, J. H.; LODGE, J. K.; HEITMAN, J.; DAVIS, R. W.; FRASER, C. M.; HYMAN, R. W. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science**, v. 307, p.1321-1324, 2005.

LUNARDI, L. U. FIER, C. B.; ASHIKAGA, F. Y.; MORIOKA, L. R.; FUNGARO, M. H. P. Obtenção de mutantes de *Aspergillus carbonarius* via transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 27, p. 95-104, 2006.

LUND, F.; FRISVAD, J. C. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1117-1123, 2003.

MACHIDA, M.; ASAI, K.; SANO, M.; TANAKA, T.; KUMAGAI, T.; TERA, G.; KUSUMOTO, K. I.; ARIMA, T.; AKITA, O.; KASHIWAGI, Y.; ABE, K.; GOMI, K.; HORIUCHI, H.; KITAMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, M.; DENNING, D. W.; GALAGAN, J. E.; NIERMAN, W. C.; YU, J.; ARCHER, D. B.; BENNETT, J. W.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; FEDOROVA, N. D.; GOTOH, O.; HORIKAWA, H.; HOSOYAMA, A.; ICHINOMIYA, M.; IGARASHI, R.; IWASHITA, K.; JUVVADI, P. R.; KATO, M.; KATO, Y.; KIN, T.; KOKUBUN, A.; MAEDA, H.; MAEYAMA, N.; MARUYAMA, J. I.; NAGASAKI, H.; NAKAJIMA, T.; ODA, K.; OKADA, K.; PAULSEN, I.; SAKAMOTO, K.; SAWANO, T.; TAKAHASHI, M.; TAKASE, K.; TERABAYASHI, Y.; WORTMAN, J. E.; YAMADA, O.; YAMAGATA, Y.; ANAZAWA, H.; HATA, Y.; KOIDE, Y.; KOMORI, T.; KOYAMA, Y.; MINETOKI, T.; SUHARNAN, S.; TANAKA, A.; ISONO, K.; KUHARA, S.; OGASAWARA, N.; KIKUCHI, H. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, p. 1157-1161, 2005.

MANIATIS, T.; TASIC, B. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. **Nature**, v. 418, p. 236-243, 2002.

MICHIELSE, C. B.; HOOYKAAS, P. J. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; RAM, A. F. J. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, v. 48, p. 1-17, 2005.

MORIOKA, L. R. I.; FURLANETO, M. C.; BOGAS, A. C.; POMPERMAYER, P.; DUARTE, R. T. D.; VIEIRA, M. L. C.; WATANABE, M. A. E.; FUNGARO, M. H. P. Efficient genetic transformation system for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. **Current Microbiology**, v. 52, p. 469-472, 2006.

MOROZOV, I. Y.; NEGRETE-URTASUN, S.; TILBURN, J.; JANSEN, C. A.; CADDICK, M. X.; ARST, H. N. Nonsense-mediated mRNA decay mutation in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, p. 1838-1846, 2006.

MORRISON, T. B.; WEIS, J. J.; WITTEWER, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **BioTechniques**, v. 24, p. 954-962, 1998.

MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 13 (Supl.), p. 5-9, 1996.

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Symposium Series (Society for Applied Microbiology)**, v. 27, p. 62S-76S, 1998.

NIERMAN, W. C.; PAIN, A.; ANDERSON, M. J.; WORTMAN, J. R.; KIM, H. S.; ARROYO, J.; BERRIMAN, M.; ABE, K.; ARCHER, D. B.; BERMEJO, C.; BENNETT, J.; BOWYER, P.; CHEN, D.; COLLINS, M.; COULSEN, R.; DAVIES, R.; DYER, P. S.; FARMAN, M.; FEDOROVA, N.; FEDOROVA, N.; FELDBLYUM, T. V.; FISCHER, R.; FOSKER, N.; FRASER, A.; GARCÍA, J. L.; GARCÍA, M. J.; GOBLE, A.; GOLDMAN, G. H.; GOMI, K.; GRIFFITH-JONES, S.; GWILLIAM, R.; HAAS, B.; HAAS, H.; HARRIS, D.; HORIUCHI, H.; HUANG, J.; HUMPHRAY, S.; JIMÉNEZ, J.; KELLER, N.; KHOURI, H.; KITAMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; KONZACK, S.; KULKARNI, R.; KUMAGAI, T.; LAFTON, A.; LATGÉ, J. P.; LI, W.; LORD, A.; LU, C.; MAJOROS, W. H.; MAY, G. S.; MILLER, B. L.; MOHAMOUD, Y.; MOLINA, M.; MONOD, M.; MOUZYNA, I.; MULLIGAN, S.; MURPHY, L.; O'NEIL, S.; PAULSEN, I.; PEÑALVA, M. A.; PERTEA, M.; PRICE, C.; PRITCHARD, B. L.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; RAWLINS, N.; RAJANDREAM, M. A.; REICHARD, U.; RENAULD, H.; ROBSON, G. D.; RODRIGUEZ DE CÓRDOBA, S.; RODRÍGUEZ-PEÑA, J. M.; RONNING, C. M.; RUTTER, S.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, M.; SÁNCHEZ-FERRERO, J. C.; SAUNDERS, D.; SEEGER, K.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAKEUCHI, M.; TEKAIA, F.; TURNER, G.; ALDANA, C. R. V.; WEIDMAN, J.; WHITE, O.; WOODWARD, J.; YU, J. H.; FRASER, C.; GALAGAN, J. E.; ASAI, K.; MACHIDA, M.; HALL, N.; BARRELL, B.; DENNING, D. W. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, p. 1151-1156, 2005.

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.

PALACIOS-CABRERA, H.; TANIWAKI, M. H.; MENEZES, H. C.; IAMANAKA, B. T. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. **Food Control**, v. 15, p. 531-535, 2004.

PARDO, E.; MARIN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxin fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, v. 10, p. 45-49, 2004.

PAYNE, G. A.; BROWN, M. P. Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. **Annual Reviews in Phytopathology**, v. 36, p. 329-362, 1998.

PEDLEY, K. F.; WALTON, J. D. Regulation of cyclic peptide biosynthesis in a plant pathogenic fungus by a novel transcription factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 14174–14179, 2001.

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

PERRIN, R. M.; FEDOROVA, N. D.; BOK, J. W.; CRAMER, R. A.; WORTMAN, J. R.; KIM, H. S.; NIERMAN, W. C.; KELLER, N. P. Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. **PLoS Pathogens**, v. 3, p. 508-517, 2007.

PERRONE, G.; MULÈ, G.; SUSCA, A.; BATTILANI, P.; PIETRI, A.; LOGRIECO, A. 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.

PITT, J. I. Toxicogenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, v. 138 (Suppl. 1), p. 17-22, 2000.

PROCTOR, R. H.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S. P.; DESJARDINS, A. E. *Tri6* encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1923-1930, 1995.

PROCTOR, R. H.; BROWN, D. W.; PLATTNER, R. D.; DESJARDINS, A. E. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 237-249, 2003.

PROCTOR, R. H.; BUSMAN, M.; SEO, J. A.; LEE, Y. W.; PLATTNER, R. D. A fumonisin biosynthetic gene cluster in *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetic basis for B versus C fumonisin production. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, p. 1016-1026, 2008.

REITHNER, B.; BRUNNER, K.; SCHUHMACHER, R.; PEISSEL, I.; SEIDL, V.; KRŠKA, R.; ZEILINGER, S. The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 749-760, 2005.

ROHLFS, M.; ALBERT, M.; KELLER, N. P.; KEMPKEN, F. Secondary chemicals protect mould from fungivory. **Biology Letters**, v. 3, p. 523-525, 2007.

SCHMIDT-HEYDT, M.; BAXTER, E.; GEISEN, R.; MAGAN, N. Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and *otapksPV* gene expression by *Penicillium verrucosum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 277-283, 2007.

SCUDAMORE, K. A.; LIVESEY, C. T. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage, a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, p. 1-7, 1998.

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

SEO, J. A.; GUAN, Y.; YU, J. H. Suppressor mutations bypass the requirement of *fluG* for asexual sporulation and sterigmatocystin production in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 165, p. 1083-1093, 2003.

SERRA, R.; ABRUNHOSA, L.; KOZAKIEWICZ, Z.; VENÂNCIO, A. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 63-68, 2003.

SHAW, B. D.; UPADHYAY, S. *Aspergillus nidulans swoK* encodes an RNA binding protein that is important for cell polarity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 862-872, 2005.

SHIM, W. B.; WOLOSHUK, C. P. Regulation of fumonisin B1 biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, *FCC1*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1607-1612, 2001.

SHIMIZU, K.; HICKS, J. K.; HUANG, T. P.; KELLER, N. P. Pka, Ras and RGS protein interactions regulate activity of AfIR, a Zn(II)₂Cys₆ transcription factor in *Aspergillus nidulans*. **Genetic**, v. 165, p. 1095-1104, 2003.

SHWAB, E. K.; KELLER, N. P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. **Mycological Research**, v. 112, p. 225-230, 2008.

STEYN, P. S. The biosynthesis of micotoxins. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 149, p. 469-478, 1998.

SUGUI, J. A.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1798-1802, 2005.

TACKE, R.; TOHYAMA, M.; OGAWA, S.; MANLEY, J. L. Human Tra2 proteins are sequence-specific activators of pre-mRNA splicing. **Cell**, v. 93, p. 139-148, 1998.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 173-179, 2003.

TSITSIGIANNIS, D. I.; KOWIESKI, T. M.; ZARNOWSKI, R.; KELLER, N. P. Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic Cell**, v. 3, p. 1398-1411, 2004.

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; LEITAO, M. F. F.; VICENTINI, M. C. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 1226-1230, 2001.

VAN DER MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, D. E. B.; THERON, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. **Nature**, v. 65, p. 1112-1113, 1965.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; KOCSUBÉ, S.; FARKAS, B.; PÁL, K. Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus* species. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 593-600, 2003.

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

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

WAALWIJK, C.; VAN DER LEE, T.; VRIES, I.; HESSELINK, T.; ARTS, J.; KEMA, G. H. J. Synteny in toxigenic *Fusarium* species: the fumonisin gene cluster and the mating type region as examples. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 533-544, 2004.

WALTON, F. J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 57, p. 1381-1396, 2005.

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. H.; BUTCHKO, R. A. E.; FERNANDES, M.; KELLER, N. P.; LEONARD, T. J.; ADAMS, T. H. Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *aflR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. **Current Genetics**, v. 29, p. 549-555, 1996.

YU, J.; CHANG, P. K.; EHRLICH, K. C.; CARY, J. W.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; PAYNE, G. A.; LINZ, J. E.; WOLOSHUK, C. P.; BENNETT, J. W. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1253-1262, 2004.

YU, J. H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 437-458, 2005.

ZHANG, J.; CAI, L.; CHENG, J.; MAO, H.; FAN, X.; MENG, Z.; CHAN, K. M.; ZHANG, H.; QI, J.; JI, L.; HONG, Y. Transgene integration and organization in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genome. **Transgenic Research**, v. 17, p. 293-306, 2008.

ZUBER, S.; HYNES, M. J.; ANDRIANOPOULOS, A. The G-protein alpha-subunit GasC plays a major role in germination in the dimorphic fungus *Penicillium marneffe*. **Genetics**, v. 164, p. 487-499, 2003.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão desta dissertação são apresentados na forma de um artigo científico que foi enviado para o periódico “Brazilian Archives of Biology and Technology”.

ARTIGO

Identification of a gene that affects the production of ochratoxin A in *Aspergillus carbonarius*

Identification of a splicing coactivator gene that affects the production of ochratoxin A in *Aspergillus carbonarius*

Lígia Uno Lunardi¹, Roberta Losi Guembarovski¹, Luiz Ricardo Hanai², Valderi Cristiano³, Maria Lucia Carneiro Vieira², Daniele Sartori¹, Maria Helena Pelegrinelli Fungaro^{1*}

¹Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, PO Box 6001, 86055-900, Londrina-PR, Brazil.

²Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, PO Box 83, 13400-970 Piracicaba-SP, Brazil.

³Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, PO Box 6001, 86055-900, Londrina-Pr, Brazil.

ABSTRACT

Ochratoxin A is a mycotoxin produced by some fungi species. Among them, Aspergillus carbonarius is considered a powerful producer. Genes involved in the ochratoxin A biosynthesis pathway have been identified in some producers species. However, there are few studies which purpose to identify these gene in A. carbonarius. The use of insertion mutants in order to identify genes associated with certain properties have been increasingly in the literature. In this work, the region of T-DNA integration was investigated in one A. carbonarius ochratoxin-defective mutant previously obtained by the Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation, in order to find an association between interrupted gene and the biosynthesis of ochratoxin A. The integration occurred in a gene that possibly encodes a splicing coactivator protein. This integration resulted in the interruption of the gene and, furthermore, provoked a deletion length of 727bp. The deletion includes a final portion of a splicing coactivator gene and a non-coding region between this gene and the F-actin gene. The analysis of the relative expression of the splicing coativator gene from A. carbonarius wild type strain in four different media, showed high correlation between the transcript levels and the ochratoxin A production.

Key words: *Aspergillus carbonarius*, ochratoxin A, real time PCR, splicing coactivator protein.

INTRODUCTION

Ochratoxin A (OTA) is a toxin produced by some fungal species, known to have nephrotoxic effects and carcinogenic potential. This mycotoxin has been found in grapes and grape products such as juice, wine and dried vine fruit (Zimmerli & Dick, 1996; Macdonald *et al.*, 1999; Majerus *et al.*, 2000; Da Rocha Rosa *et al.*, 2002 Valero *et al.*, 2005). Due to the potential human and animal health hazard, the European Union (EU) has introduced maximum limits for OTA in dried vine fruits (10 µg kg⁻¹) and wine (2 µg kg⁻¹). OTA has also been found in market samples of roasted

coffee. By the same token, the EU (European Commission, 2005) established limit of OTA in roasted (5 µg kg⁻¹) and soluble (10 µg kg⁻¹) coffees. The results of several years of investigation in order to recognize which fungi are responsible for the OTA production in coffee and grapes showed that *Aspergillus carbonarius* is one of the most important species (Taniwaki *et al.*, 2003).

OTA is a polyketide-derived secondary metabolite consisting of chlorinated isocoumarin derivative linked to L-phenylalanine (Moss, 1996). O'Callaghan & Dobson (2006a) reviewed the biosynthesis of this mycotoxin and results suggest

*Autor for correspondence: fungaro@uel.br

that it is a process consisting of four main steps: (1) biosynthesis of the pentaketide 7-methylmellein by a PKS (polyketide synthase); (2) oxidation by cytochrome P450 to produce the intermediate 7-carboxy-mellein; (3) chlorination, probably by a chloroperoxidase producing 7-carboxy-5-chloro-mellein, and (4) the condensation of this intermediary with phenylalanine by the OTA synthase, probably a non-ribosomal peptide synthase. Some structural genes were already identified to be related to OTA biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium* species (O'Callaghan *et al.*, 2003; Geisen *et al.*, 2004; Karolewicz & Geisen, 2005; Atoui *et al.*, 2006; Bogs *et al.*, 2006). More recently, a structural gene (a *pks* gene) possibly involved in the OTA biosynthesis in *A. carbonarius* was reported (Gallo *et al.*, 2009). However, as far as we know, genes involved in the regulation of the structural ochratoxin gene were not described until now for none of ochratoxigenic species.

The T-DNA insertional mutagenesis approach is a powerful tool for detecting genes involved in a particular function. This strategy is based on the capability of *Agrobacterium tumefaciens* to transform host genomes by transferring its T-DNA to the host nuclei. The exogenous sequence is able to insert itself at random within chromosomes (Azpiroz-Leehan & Feldmann, 1997), and therefore can be used as a mutagen to create loss-of-function mutations in several organisms. The T-DNA not only disrupts the gene where it is inserted, but also acts as a marker for subsequently identifying the mutation. This approach has been used for cloning genes, promoters, and regulatory sequences (Radhamony *et al.*, 2005). Bundock *et al.* (1995) firstly described the protocols for the transference of T-DNA into fungi cells. Only recently, the *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) protocol was adapted to transform *A. carbonarius* and used for generating insertional mutants (Morioka *et al.*, 2006; Lunardi *et al.*, 2006).

In this contribution, we verified the integration of T-DNA in one *A. carbonarius* ochratoxin-defective mutant obtained by AMT, and identified a gene which was probably involved in the regulation of OTA biosynthesis.

MATERIAL AND METHODS

Strains

A. carbonarius wild type (ITAL187) used in the present paper was obtained from coffee beans and kindly provided by Taniwaki *et al.* (2003). The mutant T188 was obtained by using *Agrobacterium*-mediated transformation approach by Lunardi *et al.* (2006). This mutant produces significantly lower amounts of OTA than the wild type strain after growing for four days on YES media.

DNA and RNA extraction

Genomic DNA of *A. carbonarius* T188 mutant and wild type strain ITAL187 was extracted according to Azevedo *et al.* (2000) and quantified by a fluorimetric method (Dyna Quant, Phamarcia). Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) and following the manufacturer's instructions.

Southern blot analysis

In order to obtain information about the number of copies of the foreign DNA integrated in the transformant genome, DNA digestion was performed using *Sst*I. Since this enzyme cuts the expression cassette once, outside of the *hph* gene, when the fragment of *hph* gene is used as probe, a single-hybridizing band will be indicative of a single copy integrated in the fungus genome. Standard procedures described in Sambrook & Russell, (2001) were used for restriction endonuclease digestion, agarose-electrophoresis, and transference onto nylon membranes. Approximately 5 µg of digested genomic DNA were submitted to electrophoresis in each track. As a probe, a fragment of the *hph* gene (0.6 kb) was used. This fragment was obtained by PCR using the primer pair *hph*1 (5'-TTTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT) and *hph*2 (5'-CGCGTCTGCTGCTCCATAACAAG). DNA probe labeling and hybridization were performed using a digoxigenin (DIG) hybridization system (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's recommendations.

Identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions

The T-DNA flanking region was extended by using an adaptation of the PCR-walking

methodology as described by Cottage *et al.* (2001). Following the manufacturer's instructions, genomic DNA (100 ng) was partially digested for 3 h at 37°C with 5 U *SspI*, a blunt-cutting restriction enzyme (New England Biolabs) in a final volume of 25 µL. Adapters were prepared by mixing equimolar amounts of the oligonucleotides 5'-

ACTCGATTCTCAACCCGAAAGTATAGATCC CA and 5'-TGGGATCTATACTT/3AmM, which were ligated to the blunt-ended fragments for 3 h at 17°C. The reaction was performed by adding an equal volume of a ligation solution i.e. 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1.0 mM ATP, 1 µM adapters, and 1.2 units of T4 DNA ligase (New England Biolabs). The resulting products were diluted with ultra pure water and used as templates in the amplification reaction. A primer specific to the adaptor (5'-ACTCGATTCTCAACCCGAAAG) and nested primers specific to T-DNA (RB1, RB2, RB3 or LB1, LB2, LB3) (Combier *et al.*, 2003) were used to amplify the flanking region. The adapter sequence does not contain a primer-binding site, which is created only by the PCR extension from the walking-primer. As we are the first to use this methodology to characterize regions flanking the T-DNA in fungi mutants, an illustration is given in Figure 1. In order to obtain greater specificity, PCR products were submitted to two semi-nested-PCRs using internal primers i.e. RB2 and RB3 or LB2 and LB3 combined with primer specific to the adapter. The final PCR products were resolved on agarose gels, purified (QIA quick[®] Spin Handbook-Qiagen) and cloned (TOPO TA Cloning for Sequencing Kit, Invitrogen). Cloned inserts were sequenced with DYEnamic[™] ET dye Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotec, Inc.) for Megabace 1000. By using the BLASTX and BLASTN algorithm (Altschul *et al.*, 1997), the resulting sequences were searched against *Aspergillus niger* genome (<http://genome.jgi-psf.org/Aspni1/Aspni1.home.html>) and others (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Characterization of the T-DNA integration by PCR

Based on the two regions flanking the T-DNA (left and right borders), a primer-pair was designed in order to characterize the supposed deletion provoked by T-DNA integration. One primer

sequence recognized the *F-actin* gene (5'-CGATGAAGGAGGATGCGAGT), and the other one recognized the *splicing coactivator* gene (5'-CACCACCCCTGATGAACCG). This primer pair was used to amplify DNA from the T188 mutant and the wild type strain ITAL187. The PCR reaction was performed in a total volume of 100 µL containing DNA 5 ng, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, PCR buffer 1x (Invitrogen), 0.5 µM primer, 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). The amplification conditions used were 5 min 94 °C, 30 cycles (45 s 94 °C, 1 min 62 °C, 1 min and 15 s 72 °C) and 5 min 72 °C. An aliquot of PCR products was separated by electrophoresis in 0.8% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. The remaining reaction mixture was purified and submitted to sequencing on Megabace 1000 as described above.

Kinetic study of ochratoxin A production

For a kinetic study of the OTA production by the ITAL 187 strain, conidia were inoculated at a density of 10⁶ mL⁻¹ into 500-mL flasks containing 100 mL of permissive liquid medium (CY). The flasks were incubated in the dark at 25 °C for up to 10 days. After 2, 4, 6, 8 and 10 days, the OTA content in culture broths was measured by high performance liquid chromatography (HPLC). OTA extraction and purification was done according to OCHRAPREP[®] -Quantitative Detection of Ochratoxin A (R-Biopharm, Rhône LTD) kit instruction. A LC-10VP HPLC system (Shimadzu, Japan) was used with fluorescence detection set at 333 nm excitation and 443 nm emission. A Spherisorb ODS2 (5 µm x 25 cm x 5 mm) column was employed. The mobile phase was an acetonitrile-water-acetic acid (51/47/2, v/v/v) mixture and the flow rate was 1 mL min⁻¹. An OTA standard (Sigma) was used for the construction of a calibration curve, peak area versus concentration (µg⁻¹). The OTA concentration in sample extract was determined by the interpolation of peak area results from the calibration graph.

RT-real time PCR analysis

Firstly, the ITAL 187 strain was grown for sporulation at 25 °C on potato dextrose agar for 5 days. Conidia (approximately 10⁶ mL⁻¹) were inoculated into 100 mL of four different media: CY, YES, PD and EMP. The pH of the whole media was adjusted to 5.0 by adding acetic acid.

After growing in the dark for four days, the RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen). First-strand cDNA synthesis was performed with reverse transcriptase (RT M-MLV, Invitrogen) according to the manufacturer's protocol from 500 µg of total RNA. Real time PCR reactions were performed in a PTC 200 DNA Engine Cycler using a Chromo4 Detection System (MJ Research). The primers, 5'-CACCACCCCTGATGAACCG and 5'-GGGCTTCTTCGGTGTCTCGGA respectively, were used as forward and reverse for expression analysis of the *splicing coactivator* gene by using RT-real time PCR. Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen) was used as reaction mixture, adding 0.4 µM of each primer and 2 µL of template cDNA, in a final volume of 25 µL. The PCR thermal cycling conditions were as follows: an initial step at 95 °C for 5 min, and 40 cycles at 95 °C for 20 s, 62 °C for 15 s and 72 °C for 20 s, followed by 95 °C for 10 s and 40 °C for 1 min. A melting curve analysis was persistently performed at the end of the reaction to check for primer-dimer artifacts and contamination. In addition, in all experiments, appropriate negative controls containing no template were subjected to the same procedure to exclude or detect any possible contamination. All experiments were performed with two replications. The values were normalized against the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (G3PDH). The primers for amplification of cDNA for *A. carbonarius* G3PDH were g3pdh-bf (5'-TCGTCAACGGCAAGAAGATT) and g3pdh-br (5'-TAGCAAGGGGAGCAAGGCAGT), as described by O'Callaghan *et al.* (2006b). The analysis of relative expression results in real-time PCR was performed using the REST-MCS[®] software (www.gene-quantification.info) (Pfaffl *et al.*, 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

The mutant denoted T188 that produces significantly less OTA (1.6 %) than the wild type strain (100 %) (ITAL 187) was investigated by using Southern analysis to detect the T-DNA copy number integrated into the genome. As shown in the Figure 2, a single foreign DNA copy was found integrated in the T188 mutant genome,

which means that it is appropriated to look for associations between the gene disrupted by insertional mutagenesis and its phenotype. After PCR-based amplification of DNA fragments spanning insertion site borders and sequencing, the BLASTN and BLASTX algorithm was used to characterize the insertion of T-DNA within the host genome. The nucleotide sequence flanking one side of the insertion site (left border, 1251 nt) showed significant similarity with the initial part of the locus An11g05460 from *A. niger* strain CBS 513.88 (E value = $2e^{-50}$), which is annotated as encoding an F-actin subunit alpha protein. The nucleotide sequence flanking the other side of the insertion site (right border, 228 nt) showed high similarity with locus An11g05450 also from *A. niger* strain CBS 513.88 (E value = $5e^{-47}$) which is annotated as encoding a hypothetical protein (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). This very same sequence was also searched for in the genome of the *A. niger* strain ATCC 1015 (<http://genome.jgi-psf.org/Aspni1/Aspni1.home.html>). Equally significantly nucleotide similarities were found ($2e^{-39}$), but in this case the gene is annotated as encoding an unnamed protein of 647 aa (ID 39109) with KOG description as a splicing coactivator SRm160/300, subunit SRm300, i.e. a protein involved in RNA processing and modification. When an exact joining of T-DNA and fungus genomic DNA takes place, sequences of the same gene are expected for both sides of the integrated T-DNA. Our results mean that a non-exact joining of T-DNA and fungus genomic DNA occurs during the integration event. Information on the pattern of T-DNA integration in fungi was very limited, with only a few T-DNA insertion sites having been characterized in several species transformed using *A. tumefaciens* (Bundock *et al.*, 1995; Mullins *et al.*, 2001; Leclercq *et al.*, 2004, Choi *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007, Meng *et al.*, 2007). The most significant contribution for understanding the mechanisms and characteristics of T-DNA integration has been given from analysis of *Magnaporthe oryzae* transformants. Choi *et al.* (2007) conducted a broad analysis of T-DNA insertion sites in transformants of *M. oryzae* and showed that exact joining (without deletion, addition and microhomology) of T-DNA and genomic DNA occurs in only 14.1 % of integration events. Non-exact joining of T-DNA and fungus genomic DNA occurred very

frequently. The most frequent non-exact joining was that represented by a deletion of genomic DNA at the insertion site (78.3 %). Deletions of genomic DNA ranged from 1 to 1950 bp, most of them being less than 35 bp (77.8 %), while those larger than 100 bp comprised only 9.8 %. In addition, small duplications (1-11 bp) and chromosomal translocations were also observed in 7.6 % of integration events. Also studying *M. oryzae*, Li *et al.* (2007) showed that deletions due to T-DNA integration are found frequently in genomic target sites. Although small deletions (1-80 bp in size) were more frequent, a deletion 505 bp in size was found in one transformant. Equally, Meng *et al.* (2007) examined the junctions between chromosomal DNA and the left and right T-DNA borders in several *M. oryzae* transformants for possible deletions surrounding the target site. Among 36 informative T-DNA insertions, 34 exhibited a genomic deletion at the target site. Five of them were deletions larger than 1 kb.

In order to confirm the deletion provoked by T-DNA integration, we amplified the region between a portion of *F-actin* gene and a portion of *splicing coactivator* gene by using DNA from the wild type strain ITAL 187 and the mutant strain T188. As shown in Figure 3, the amplification products obtained were of 6040 bp and 970 bp from the insertional mutant (T188) and the wild type strain (ITAL 187), respectively. The sequence analysis in fact showed that T-DNA integration into the mutant T188 provoked a deletion of 727 bp in length. The deletion includes a final portion of the *splicing coactivator* gene and a non-coding region between this gene and the *F-actin* gene (Figure 4). Based on the fact that the mutant T188 has a deletion of the final portion of the *splicing coactivator* gene and it produces significantly smaller amounts of OTA than the wild type strain, we investigated the possible association between the amount of OTA and transcription levels of the gene being studied. Based on the kinetics of OTA production (Figure 5), the 4th day was chosen as the point for extracting total RNA and OTA quantification. The wild type strain (ITAL 187) was grown in four different media, CY, YES, PD and EMP. The highest amount of OTA was detected in CY medium (272 ng mL⁻¹). After growing on both YES and PD media, the production of OTA was significantly lower than that observed in CY, 135 and 118 ng mL⁻¹ respectively. As expected, the production of OTA

after growing on EMP medium was very low (4.7 ng mL⁻¹). The relative expression of the *splicing coactivator* gene in the four different media was analyzed and an association between the amount of OTA and the transcript levels was observed (Figure 6). A high Pearson correlation coefficient found (0.96) shows a supposed involvement of this gene in the production of OTA.

In general the genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites are clustered, as already described for aflatoxin/sterigmatocystin (Brown *et al.*, 1996), lovastatin (Kennedy *et al.*, 1999), trichothecenes (Brown *et al.*, 2001) and for gibberellins (Tudzynski & Holter, 1998). In most cases, transcriptional regulation is governed by a pathway-specific DNA-binding protein encoded by a gene located within the cluster (Keller *et al.*, 2005). Analysis of the genomic context of *A. niger* near the *splicing coactivator* gene revealed that it is not located within a cluster expected for OTA biosynthesis. No genes assumed to be necessary for OTA production, i.e. encoding polyketide synthases, chloroperoxidase, reductase, esterase, dehydratase, were found near the *splicing coactivator* gene. However, some genes that are not located in the gene cluster have also been described as affecting the biosynthesis of some mycotoxins. A typical example is four *Fusarium verticillioides* genes that are located outside the fumonisin gene cluster but affect fumonisin biosynthesis (Shim & Woloshuk, 2001; Flaherty *et al.*, 2003; Flaherty & Woloshuk, 2004; Bluhm & Woloshuk, 2006).

An analysis of the genes within the *F. verticillioides* fumonisin cluster showed the presence of alternative splicing forms (ASFs) for eight genes, including *FUM1*, *FUM11* and *FUM12*, that code for polyketide synthase, tricarboxylate carrier and cytochrome P450 monooxygenase, respectively (Brown *et al.*, 2005), and the gene *FUM21* which has a Zn(II)₂Cys₆ DNA-binding motif, supposedly involved in the transcriptional regulation of the genes in the fumonisin cluster (Brown *et al.*, 2007). The differential expression of the ASFs of *FUM* genes suggests that splicing regulation can play a role in fumonisin biosynthesis (Brown *et al.*, 2005). Some proteins that participate in the splicing mechanism show serine- and arginine-rich domains, known as RS domains. These proteins play a dual role in the splicing process, affecting both constitutive and alternative splicing and they therefore have a key role in genic expression at the RNA processing

level (Fu, 1995). In mammals, the SRm160/300 protein is related to spliceosome formation and plays a part in the recognition of exonic splicing enhancers (ESEs). Both subunits SRm300 and SRm160 have RS domains, but do not show RNA recognition motifs (RRMs) (Blencowe *et al.*, 2000). The *splicing coativador* gene, identified in this work, displayed similarities to gene An11g05450 of *A. niger* CBS 513.88, whose amino acid-derived sequence has no RRM, but does have a serine-rich domain (annotation KEGG at <http://www.uniprot.org>).

In conclusion, although the *splicing coativador* gene identified in this study is not found in an ochratoxin gene cluster, it is in fact associated with the production of OTA.

ACKNOWLEDGMENTS

Our study was supported (grants and fellowships) by the following Brazilian institutions: Fundação Araucária, Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).

RESUMO

A ocratoxina A é uma micotoxina frequentemente encontrada em uma grande variedade de produtos alimentares e apresenta efeitos nefrotóxicos e potencial carcinogênico para animais e humanos. É naturalmente produzida por algumas espécies fúngicas, como Aspergillus carbonarius, que é considerado um potente produtor. Apesar disso, o número de estudos que visam identificar genes que são essenciais para a biossíntese de ocratoxina em A. carbonarius é ainda reduzido. Um mutante de A. carbonarius com baixa produção de ocratoxina A previamente obtido por transformação mediada por Agrobacterium foi investigado com o objetivo de encontrar uma associação entre o gene interrompido e a biossíntese desta micotoxina. Os resultados mostraram a ocorrência de uma junção não exata entre o T-DNA e o DNA genômico do

fungo durante o evento de integração. A integração do T-DNA no genoma do mutante T188 provocou uma deleção de 727 nucleotídeos. Esta deleção inclui uma porção final do gene coativador de splicing e uma região não-codificante entre este gene e o gene F-actina. A expressão relativa do gene coativador de splicing na linhagem selvagem cultivada em quatro diferentes meios mostrou uma associação entre a quantidade de ocratoxina A e os níveis dos transcritos.

REFERENCES

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402.
- Atoui, A., Dao, P., Mahieu, F., Lebrhi, A. (2006), Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. *Mol Nutr Food Res.*, **50**, 488-493.
- Azevedo, A. C. S., Furlaneto, M. C., Sosa-Gomez, D. R., Fungaro, M. H. P. (2000), Molecular characterization of *Paecilomyces fumosus* (*Deuteromycotina Hyphomycetes*) isolates. *Sci Agric. (Piracicaba, Braz.)*, **57**, 729-732.
- Azpiroz-Leehan, R., Feldmann, K. A. (1997), T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends Genet.*, **13**, 152-156.
- Blencowe, B. J., Baurén, G., Eldridge, A. G., Issner, R., Nickerson, J. A., Rosonina, E., Sharp, P. A. (2000), The SRm160/300 splicing coactivator subunits. *RNA*, **6**, 111-120.
- Bluhm, B. H., Woloshuk, C. P. (2006), *Fck1*, a C-type cyclin-dependent kinase, interacts with *Fcc1* to regulate development and secondary metabolism in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol.*, **43**, 146-154.
- Bogs, C., Battilani, P., Geisen, R. (2006), Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. *Int J Food Microbiol.*, **107**, 39-47.
- Brown, D. W., Yu, J.-H., Kelkar, H. S., Fernandes, M., Nesbitt, T. C., Keller, N. P., Adams, T. H., Leonard, T. J. (1996), Twenty-five co-regulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 1418-1422.

- Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H., Desjardins, A. E. (2001), A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol.*, **32**, 121-144.
- Brown, D. W., Cheung, F., Proctor, R. H., Butchko, R. A. E., Zheng, L., Lee, Y., Utterback, T., Smith, S., Feldblyum, T., Glenn, A. E., Plattner, R. D., Kendra, D. F., Town, C. D., Whitelaw, C. A. (2005), Comparative analysis of 87,000 expressed sequence tags from the fumonisin-producing fungus *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol.*, **42**, 848-861.
- Brown, D. W., Butchko, R. A. E., Busman, M., Proctor, R. H. (2007), The *Fusarium verticillioides* *FUM* gene cluster encodes a Zn(II)₂Cys₆ protein that affects *FUM* gene expression and fumonisin production. *Eukaryot Cell*, **6**, 1210-1218.
- Bundock, P., Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., Hooykaas, P. J. (1995), Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **14**, 3206-3214.
- Choi, J., Park, J., Jeon, J., Chi, M. H., Goh, J., Yoo, S. Y., Park, J., Jung, K., Kim, H., Park, S. Y., Rho, H. S., Kim, S., Kim, B. R., Han, S. S., Kang, S., Lee, Y. H. (2007), Genome-wide analysis of T-DNA integration into the chromosomes of *Magnaporthe oryzae*. *Mol Microbiol.*, **66**, 826-826.
- Comber, J. P., Melayah, D., Raffier, C., Gay, G., Marmeisse, R. (2003), *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. *FEMS Microbiol Lett.*, **220**, 141-148.
- Cottage, A., Yang, A., Maunders, H., Lacy, C., Ramsay, N. (2001), Identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions by PCR-walking. *Plant Mol Biol Rep.*, **19**, 321-327.
- Da Rocha Rosa, C. A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M. E., Rekson, A. O., Magnoli, C. E., Dalcero, A. M. (2002), Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Addit Contam.*, **19**, 408-414.
- European Commission (2005), Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. *Off J Eur Union*, **L25**, 3-5.
- Flaherty, J. E., Pirttila, A. M., Bluhm, B. H., Woloshuk, C. P. (2003), *PAC1*, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl Environ Microbiol.*, **69**, 5222-5227.
- Flaherty, J. E., Woloshuk C. P. (2004), Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a zinc binuclear cluster-type gene, *ZFR1*. *Appl Environ Microbiol.*, **70**, 2653-2659.
- Fu, X. D. (1995), The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA*, **1**, 663-680.
- 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*. *Int J Food Microbiol.*, **129**, 8-15.
- Geisen, R., Mayer, Z., Karolewicz, A., Färber, P. (2004), Development of a real time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production by targeting the ochratoxin A polyketide synthase gene. *Syst Appl Microbiol.*, **27**, 501-507.
- 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. *Syst Appl Microbiol.*, **28**, 588-595.
- Keller, N., Turner, G., Bennett, W. J. (2005), Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nat Rev.*, **3**, 937-947.
- Kennedy, J., Auclair, K., Kendrew, S. G., Park, C., Vederas, J. C., Hutchinson, C. R. (1999), Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science*, **284**, 1368-1372.
- Leclerque, A., Wan, H., Abschütz, A., Chen, S., Mitina, G. V., Zimmermann, G., Schairer, H. U. (2004), *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Curr Genet.*, **45**, 111-119.
- Li, G., Zhou, Z., Liu, G., Zheng, F., He, C. (2007), Characterization of T-DNA insertion patterns in the genome of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Curr Genet.*, **51**, 233-243.
- Lunardi, L. U., Fier, C. B., Ashikaga, F. Y., Morioka, L. R., Fungaro, M. H. P. (2006), Obtenção de mutantes de *Aspergillus carbonarius* via transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. *Semina*, **27**, 95-104.
- Macdonald, S., Wilson, P., Barnes, K., Damant, A., Massey, R., Mortby, E., Shepherd, M. J. (1999), Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. *Food Addit Contam.*, **16**, 253-260.
- Majerus, R., Bresch, H., Otteneder, H. (2000), Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. *Arch Lebensmittelhyg.*, **51**, 95-97.
- Meng, Y., Patel, G., Heist, M., Betts, M. F., Tucker, S. L., Galadima, N., Donofrio, N. M., Brown, D., Mitchell, T. K., Li, L., Xu, J. R., Orbach, M., Thon, M., Dean, R. A., Farman, M. L. (2007), A systematic analysis of T-DNA insertion events in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol.*, **44**, 1050-1064.
- Morioka, L. R. I., Furlaneto, M. C., Bogas, A. C., Pompermayer, P., Duarte, R. T. D., Vieira, M. L. C., Watanabe, M. A. E., Fungaro, M. H. P. (2006), Efficient genetic transformation system for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. *Curr Microbiol.*, **52**, 469-472.
- Moss, M. O. (1996), Mode of formation of ochratoxin A. *Food Addit Contam.*, **13**, 5-9.

- Mullins, E. D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D. M., Kang, S. (2001), *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, **91**, 173-180.
- O'Callaghan, J., Caddick, M. X., Dobson, A. D. (2003), A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*, **149**, 3485-3491.
- O'Callaghan, J., Dobson, A. D. W. (2006a), Molecular characterization of ochratoxin A biosynthesis and producing fungi. *Adv Appl Microbiol.*, **58**, 227-243.
- O'Callaghan, J., Stapleton, P. C., Dobson, A. D. W. (2006b), Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genet Biol.*, **43**, 213-221.
- Pfaffl, M. W., Graham, W. H., Dempfle, L. (2002), Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 2-10.
- Radhamony, R. N., Prasad, A. M., Srinivasan, R. (2005), T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electron J Biotechnol.*, **8**, 82-106.
- Sambrook, J., Russel, D. W. (2001), Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA. In-*Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 237-268.
- Shim, W. B., Woloshuk, C. P. (2001), Regulation of fumonisin B1 biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, *FCC1*. *Appl Environ Microbiol.*, **67**, 1607-1612.
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., Iamanaka, B. T. (2003), The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int J Food Microbiol.*, **82**, 173-179.
- Tudzynski, B., Holter, K. (1998), Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal Genet Biol.*, **25**, 157-170.
- Valero, A., Marín, S., Ramos A. J., Sanchis, V. (2005), Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. *Lett Appl Microbiol.*, **41**, 196-201.
- Zimmerli, B., Dick, R. (1996), Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit Contam.*, **13**, 655-668.

Figure Legends

Figure 1. Amplification scheme of PCR-walking method for identification of T-DNA flanking sequences. DNA was digested with a restriction enzyme and an adapter was ligated to the ends of the restriction fragments. This adapter has the 3' end of the short strand blocked by the presence of an amino group that prevents the extension with Taq DNA polymerase. The amplification of T-DNA flanking sequences involved a two-step PCR procedure. Although both T-DNA and adapter primers are in the PCR, a first step was carried out as a linear (asymmetric) PCR using only the specific primer to T-DNA (RB1 or LB1) because in this step there isn't the binding site to the adapter primer. The adapter binding site is generated after the extension from T-DNA primer which prevents amplification from adapter to adapter. In the second step, an exponential amplification was carried out using both T-DNA and adapter primers.

Figure 2. Southern Blot analysis of the *A. carbonarius* mutant. M: molecular marker (Kb); A: *A. carbonarius* ITAL187 wild type; B: *A. carbonarius* T188 mutant.

Figure 3. Amplification of the region between *splicing coactivator* gene and *F-actin* gene in *A. carbonarius* wild type and mutant. M: 1kb molecular marker; Lane 1: *A. carbonarius* T188 mutant; Lane 2: *A. carbonarius* ITAL187 wild type; C: negative control.

Figure 4. Alignment of the nucleotide sequences of *A. niger* (CBS 513.88 and ATCC 1015 strains), *A. carbonarius* wild type (ITAL187) and the mutant (T188/T-DNA). The T-DNA integration into the T188 mutant provoked a deletion length of 727bp which includes the end of the *splicing coactivator* gene and a non-coding region (shaded region, the conserved nucleotides are in gray). The non-coding region is represented by ••••. The *F-actin* gene was not affected by integration. The T-DNA sequence is in italic. The stop codon of *splicing coactivator* gene (TAG) and start codon of *F-actin* gene (ATG) in *A. niger* are in box.

Figure 5. Kinetic of ochratoxin A production by *A. carbonarius* ITAL187 wild type in CY media.

Figure 6. Association between the transcription levels of the *splicing coactivator* gene and the amount of OTA produced by *A. carbonarius* ITAL187 wild type in four different media, CY, YES, PD and EMP.

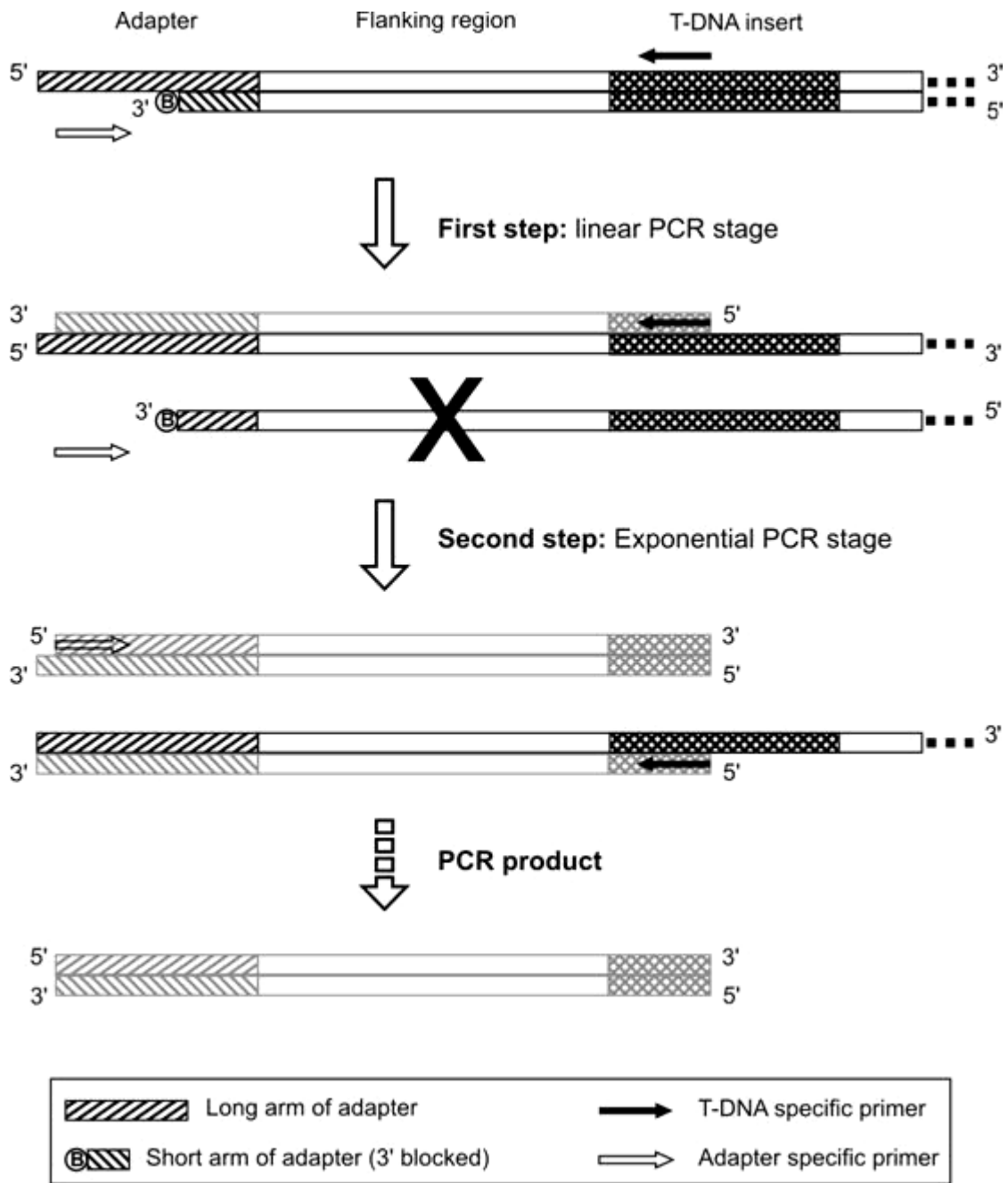


Fig.01



Fig.02

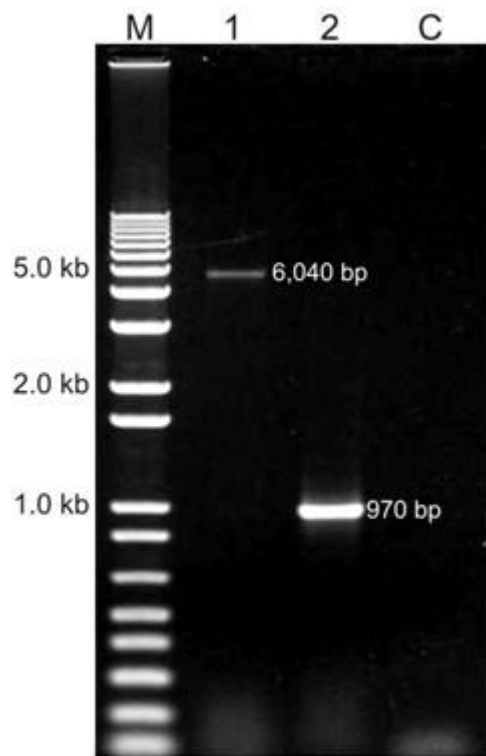


Fig.03

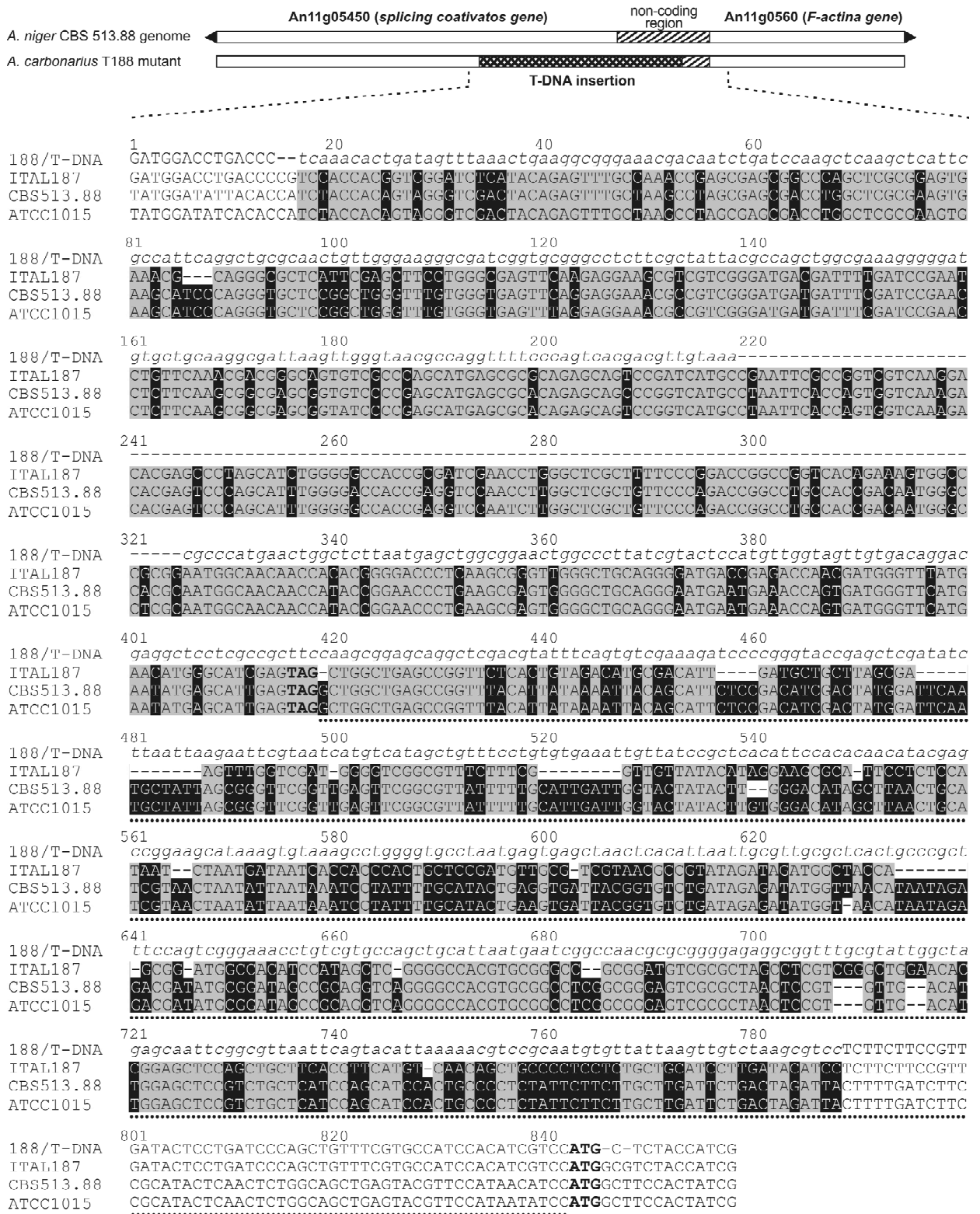


Fig.04

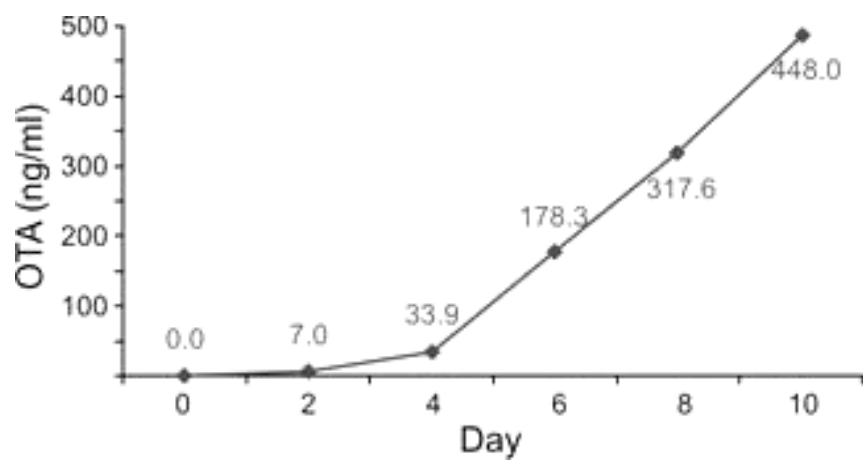


Fig.05

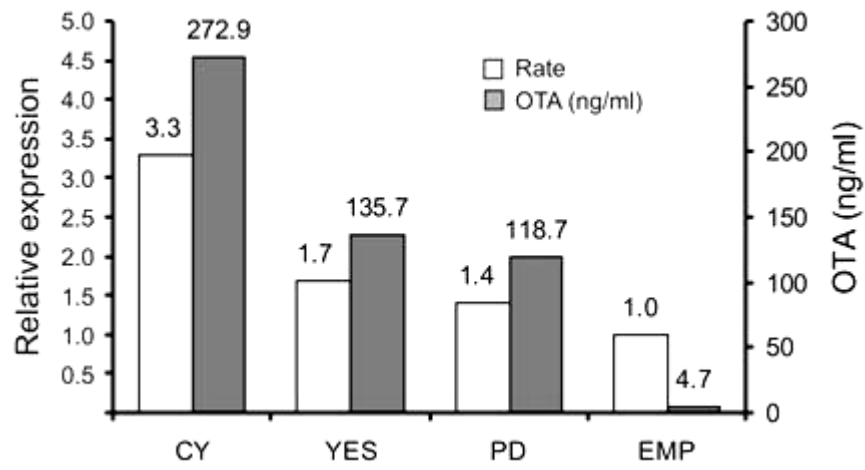


Fig.06