



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCIA MAGALHÃES MATA

**TRANSFORMAÇÃO DO FUNGO OCRATOXIGÊNICO
ASPERGILLUS WESTERDIJKIAE MEDIADA POR
*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

Londrina
2006

MARCIA MAGALHÃES MATA

**TRANSFORMAÇÃO DO FUNGO OCRATOXIGÊNICO
ASPERGILLUS WESTERDIJKIAE MEDIADA POR
*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Helena P. Fungaro

Londrina
2006

MARCIA MAGALHÃES MATA

**TRANSFORMAÇÃO DO FUNGO OCRATOXIGÊNICO
ASPERGILLUS WESTERDIJKIAE MEDIADA POR
*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria Helena P. Fungaro

Londrina, 09 de março de 2006.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Valter** e **Maria Helena**, pelo total incentivo, colaboração e amor que me ofereceram por toda a minha vida.

À **Rodrigo** pelo amor, carinho e força durante esses dois últimos anos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de realizar o curso;

À professora Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, orientadora deste trabalho, por todo o conhecimento e incentivo repassado a mim ao longo desses dois últimos anos;

À professora Márcia Cristina Furlaneto pela disponibilidade de equipamentos e materiais do laboratório bem como, de todo o apoio científico durante a realização do trabalho;

Em especial, à Daniele Sartori e Maria Rosana de Paula, não só pela colaboração no laboratório, mas também ao apoio incondicional que me dispensaram sempre, em todos os momentos bons e ruins. Esses momentos nunca serão esquecidos;

Aos amigos de laboratório, Luiz Rodrigo, Renan, Guga, André, Lara e Maria Elena. Pude construir grandes amizades, das quais recordarei sempre com muito carinho!

À todos os colegas do laboratório vizinho, que muitas vezes me ajudaram, esclarecendo, tirando dúvidas e auxiliando em alguma etapa desse experimento;

Em especial às amigas Luciana Bernd e Cleusa Weber pela amizade compartilhada durante todo o período que moramos em Londrina e que permanecerá para sempre;

À Rodrigo Correa, por toda ajuda, força e carinho inesgotáveis, que foram dispensados durante toda a realização deste trabalho, especialmente nas horas mais difíceis;

Aos meus pais e irmãos, pelo incentivo, compreensão e apoio incondicionais durante toda a minha vida;

A todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer” Albert Einstein

“É sábio olhar para trás, pois é avaliando a tortuosidade de nossas pegadas que poderemos garantir um caminho reto no futuro” Anônimo

MATA, Marcia Magalhães. **Transformação do fungo ocratoxigênico *Aspergillus westerdijkiae* mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. 2006. 111f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2006.

RESUMO

Aspergillus westerdijkiae é um produtor de ocratoxina A que tem sido freqüentemente encontrado em grãos de café. A ocratoxina A é conhecida por ter efeitos nefrotóxicos e potencial carcinogênico para espécies animais. Neste trabalho é reportada pela primeira vez a transformação genética de *A. westerdijkiae* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Conídios foram transformados para resistência a higromicina B usando a linhagem AGL-1 de *A. tumefaciens*. A condição mais favorável de transformação permitiu a obtenção de 36 transformantes para cada 10^6 conídios alvo. Dentre 600 transformantes, um total de 30 (5%) mostraram variações morfológicas. Dois mutantes (T10 e TS18) com significativa redução da capacidade de produção de ocratoxina A foram obtidos. Ambos mostraram significativa redução na conidiogênese quando comparados à linhagem selvagem. As seqüências que flanqueiam os sítios de integração do T-DNA foram amplificadas pela técnica denominada Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR). A seqüência obtida a partir do mutante TS18 mostrou homologia com uma possível monooxygenase de *A. fumigatus*. Para o mutante T10 foi identificada uma seqüência homóloga a um fator de transcrição da família jumonji de *A. fumigatus*.

Palavras-chave: *Aspergillus ochraceus*. *Aspergillus westerdijkiae*. Mutagênese insercional mediada por *Agrobacterium*. Transformação mediada por *Agrobacterium*. Ocratoxina A.

MATA, Marcia Magalhães. ***Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae***. 2006. 111f. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina. 2006.

ABSTRACT

Aspergillus westerdijkiae is a potent ochratoxin A producer frequently associated to coffee beans. Ochratoxin A is known to have nephrotoxic effects and carcinogenic potential in animal species. Here we report the first *Agrobacterium*-mediated transformation of *A. westerdijkiae*. Conidia were transformed to hygromycin B resistance using AGL-1 strain of *Agrobacterium tumefaciens*. The most favourable conditions allowed a mean transformation frequency of 36 transformants per 10⁶ target conidia. Among 600 transformants 30 (5%) showed morphological alterations. Two transformants (T10 and TS18) with consistently reduced ochratoxin A production were obtained. Both of them also showed significant reduction in conidiogenesis compared with the wild type. Fungal sequences flanking the insertion site could be amplified by Thermal Asymmetric Interlaced PCR. The sequence obtained from transformant TS18 had similarity to a monooxygenase putative from *A. fumigatus*. Transformant T10 had a sequence with similarity to a jumonji family of transcription factor from *A. fumigatus*.

Keywords: *Aspergillus ochraceus*. *Aspergillus westerdijkiae*. *Agrobacterium*-mediated transformation. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis. ochratoxin A.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Espécies de fungos transformadas com sucesso através de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
Tabela 2 -	Seqüências e temperaturas de anelamento dos <i>primers</i> usados para TAIL-PCR	40
Tabela 1 (Artigo) -	Seqüências e características dos primers utilizados na TAIL-PCR (Combier et al. 2003)	61
Tabela 2 (Artigo) -	Número de colônias de <i>Aspergillus westerdijkiae</i> higromicina-resistentes obtidas após transformação mediada por <i>Agrobacterium</i> . Acetoseringona foi adicionado (condição IM+AS) ou não (condição IM-AS) no pré-tratamento das células bacterianas antes do co-cultivo. Os resultados representam três experimentos independentes.....	62
Tabela 3 (Artigo) -	Níveis ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) de Ocratoxina A de cinco mutantes e a linhagem selvagem	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura química da Ocratoxina A19
- Figura 1 (Artigo) - Morfologia típica de *A. westerdijkiae* em placa de transformação após co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* por 36 horas e crescimento em M-100 + 200 µg.ml⁻¹ de Higromicina B + 150 µg. ml⁻¹ de mefoxina por cinco dias65
- Figura 2 (Artigo) - Análise por Southern de 10 transformantes de *A. westerdijkiae* selecionados aleatoriamente. O DNA genômico foi restringido com *Sst*I e submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%. Para hibridação um fragmento de 0,6kb do gene *hph* marcado com digoxigenina foi usado. Wt: linhagem selvagem não transformada; c+: controle positivo, plasmídeo pPK266
- Figura 3 (Artigo) - Linhagem selvagem e mutantes tem características morfológicas diferentes. Os mutantes T10 e TS18 tiveram significativa redução na produção de ocratoxina quando comparados à linhagem selvagem.....67
- Figura 4 (Artigo) - Seleção por fluorescência (produção de ocratoxina) em Agar Leite de coco. (a) Linhagem selvagem; (b) mutante com deficiência na produção de ocratoxina68
- Figura 5 (Artigo) - Seqüências das junções de inserção do T-DNA dos mutantes T10 e TS18. A primeira linha mostra parte da seqüência do T-DNA do pPK2; Letras em caixa alta representam nucleotídios da borda do T-DNA; Seqüências que estão flanqueando o DNA genômico estão indicadas em itálico69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 <i>ASPERGILLUS OCHRACEUS</i> E <i>ASPERGILLUS WESTERDIJKIAE</i>	15
3.2 PRODUÇÃO DE OCHRATOXINA A	18
3.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 LINHAGEM DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	30
4.2 VETOR BINÁRIO	30
4.3 ISOLADO FÚNGICO	31
4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE DA LINHAGEM ITAL 142 À HIGROMICINA B	31
4.5 COLORAÇÃO DE NÚCLEOS DOS CONÍDIOS	31
4.6 TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	32
4.7 EXTRAÇÃO DE DNA PARA USO EM PCR E SOUTHERN BLOT	33
4.8 ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES POR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	33
4.9 ANÁLISE DA ESTABILIDADE MITÓTICA DOS TRANSFORMANTES	34
4.10 ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES QUANTO AO NÍVEL DE RESISTÊNCIA À HIGROMICINA B	35
4.11 DIGESTÃO DO DNA GENÔMICO DOS TRANSFORMANTES E TRANSFERÊNCIA PARA A MEMBRANA DE NÁILON	35
4.12 EXTRAÇÃO DO PLASMÍDIO PPK2 PARA PREPARO DA SONDA DE HIBRIDAÇÃO	36
4.13 OBTENÇÃO DO FRAGMENTO DO GENE HPH E MARCAÇÃO DA SONDA	37
4.14 HIBRIDAÇÃO	38
4.15 SELEÇÃO DE MUTANTES PARA OCHRATOXINA A	39
4.16 TAIL-PCR E SEQUENCIAMENTO DE DNA	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
ARTIGO: <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated transformation of the ochratoxigenic fungus <i>Aspergillus westerdijkiae</i>	42

6 CONCLUSÕES70

REFERÊNCIAS.....71

ANEXOS87

ANEXO 1: Soluções e Meios de Cultura88

ANEXO 2: Normas do Periódico – Antonie Van Leeuwenhoek100

1 INTRODUÇÃO

A ocratoxina A (OTA) é um produto do metabolismo secundário de algumas espécies fúngicas. Esta micotoxina apresenta propriedades nefrotóxicas e carcinogênicas e vem sendo detectada em vários produtos destinados à alimentação humana. Uma das espécies mais importantes que está relacionada à produção desta toxina em alimentos produzidos em países de clima tropical é *Aspergillus westerdijkiae*. Esta espécie foi recentemente proposta por Frisvad et al. (2004). De acordo com estes autores *A. westerdijkiae* é uma espécie muito comum e a maioria dos isolados são capazes de produzir grandes quantidades de ocratoxina A. *A. westerdijkiae* é muito similar a *A. ochraceus* e vários isolados previamente identificados como *A. ochraceus* são agora identificados como *A. westerdijkiae*. Um importante exemplo é a linhagem NRRL 3174, a partir da qual a ocratoxina foi descrita pela primeira vez. Dentre vinte e cinco isolados obtidos de grãos de café no Brasil e identificados pelo nosso grupo como *A. ochraceus*, vinte e um foram agora reclassificados como *A. westerdijkiae*.

OTA é um derivado de dihidroisocumarina ligado a um grupo L-β fenilalanina. Apesar de sua reconhecida importância, a via biossintética desta micotoxina é ainda pouco conhecida. Baseando-se em sua estrutura molecular supõe-se que várias atividades enzimáticas são requeridas para a biossíntese de OTA, mas somente uma parte de um gene (*pks*) envolvido na biossíntese de OTA foi caracterizado a partir de *A. ochraceus* (renomeado como *A. westerdijkiae*).

A metodologia de mutagênese insercional mediada por *Agrobacterium tumefaciens* é uma estratégia útil para a identificação de genes. Esta estratégia é baseada na habilidade de *A. tumefaciens* em transferir parte de seu DNA (T-DNA) para o núcleo hospedeiro. Em plantas, a mutagênese insercional via T-DNA tem sido amplamente explorada para clonar genes, promotores, e seqüências regulatórias. Comparado às plantas, a descrição de protocolos de transferência de T-DNA para células fúngicas é recente. O número de espécies fúngicas passíveis de serem transformadas por esta metodologia já é bastante grande e há consenso que para cada uma delas deve-se otimizar o protocolo de transformação.

A vantagem da mutagênese insercional via T-DNA sobre os procedimentos clássicos de mutagênese é que as seqüências que flanqueiam o sítio onde ocorreu a integração do T-DNA podem ser isoladas facilmente. Existem na literatura alguns relatos recentes de sucesso no isolamento de mutantes defectivos na esporulação, na patogenicidade e na pigmentação, usando a metodologia de agrotransformação.

Este trabalho teve por objetivo adaptar a metodologia de agrotransformação para a espécie *A. westerdijkiae* visando à obtenção de mutantes insercionais que possam ser úteis para a identificação e a clonagem de genes envolvidos na biossíntese de ocratoxina A.

2 OBJETIVOS

Com vistas à identificação de genes que participam da via biossintética da ocratoxina A, este trabalho teve por objetivo a obtenção de mutantes insercionais, com deficiência na produção de ocratoxina, via transformação por *Agrobacterium tumefaciens*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *ASPERGILLUS OCHRACEUS* E *ASPERGILLUS WESTERDIJKIAE*

Aspergillus ochraceus é um fungo ubíquo, encontrado em solos cultivados, na rizosfera, em grãos, e em uma ampla variedade de alimentos (KOZAKIEWICZ, 1989 *apud* VARGA et al. 2000b). A presença de *A. ochraceus* já foi relatada para grãos de café (URBANO et al. 2001; BUCHELI & TANIWAKI, 2002; PALACIOS-CABRERA et al. 2004; TANIWAKI et al. 2003; SUÁREZ-QUIROZ et al. 2004;), cevada (PARDO et al. 2004), milho (LEE & MAGAN, 2000) e uvas (BATTILANI & PIETRI, 2002; BELLÍ et al. 2004a). Alguns isolados de *A. ochraceus* são utilizados na indústria farmacêutica na bioconversão de esteróides e alcalóides (CHEN et al. 1994). A propriedade de produzir enzimas industriais e compostos com propriedades inseticidas é um destaque da importância econômica desta espécie (CHADHA & GARCHA, 1992; DE GUZMAN et al. 1994). No entanto, a capacidade de produzir algumas micotoxinas tais como as ocratoxinas (VAN DER MERVE et al. 1965a), viomeleínas, xantomegninas (STACK & MISLIVEC, 1978; ROBBERS et al. 1978) e ácido penicílico (CIEGLER, 1972) é que tem justificado a maioria dos investimentos para estudos desta espécie fúngica.

A. ochraceus é um deuteromiceto pertencente à secção *Circumdati*. Esta secção inclui espécies com conídios pequenos, biseriados, nas cores que variam desde o amarelo até o ocre, e escleródios em tons de amarelo, vermelho e preto. Baseando-se em caracteres morfológicos e culturais, esta secção foi inicialmente subdividida em dezoito espécies (RAPER & FENNELL, 1965).

Nos últimos anos, a análise de ácidos nucleicos tem permitido um aumento expressivo dos conhecimentos sobre a variabilidade da secção *Circumdati*. A utilização de marcadores moleculares de RAPD e de sequenciamento de DNA, principalmente dos genes que codificam para β -tubulina e RNAr, tem sido de grande utilidade para a reorganização taxonômica da secção *Circumdati*.

Varga et al. (2000b) realizaram estudos de seqüências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2, de *Aspergillus* identificados como

pertencentes à secção *Circumdati*. Dois clados principais foram propostos. *Aspergillus ochraceus* foi incluído no Clado I da secção *Circumdati* juntamente com *A. petrakii*, *A. melleus* e *A. ostianus*. Essas espécies normalmente produzem conidióforos curtos, conídios de subglobosos a globosos, e escleródios que podem apresentar colorações que variam desde o creme até o vermelho. Em *A. petrakii*, escleródios ainda não foram descritos. O Clado II foi formado pelas espécies *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. bridgeri* e *A. insulicola*, tais como: conidióforos longos, conídios globosos e escleródios variando entre a cor creme e amarelo claro (VARGA et al. 2000b).

Dentre as linhagens de *A. ochraceus* analisadas por Varga et al. (2000b), a linhagem NRRL 3174, descrita por van der Merwe et al. (1965b) como produtora de ocratoxina A, e que é usada freqüentemente como modelo para estudos fisiológicos e bioquímicos da produção desta toxina, mostrou-se filogeneticamente distante das demais linhagens de *A. ochraceus* analisadas. Esta mesma observação foi feita por Varga et al. (2000a), quando analisaram vários isolados de *A. ochraceus* quanto aos perfis de RFLP e RAPD. A linhagem NRRL 3174, juntamente com a linhagem 306, apresentou perfil diferenciado das demais linhagens de *A. ochraceus*.

Fungaro et al. (2004) sequenciaram a região ITS1-5,8S-ITS2 de 25 isolados de *A. ochraceus* coletados de grãos de café brasileiro. A análise conjunta das seqüências obtidas com aquelas depositadas no Banco de dados do NCBI (VARGA et al. 2000b) mostrou dois grupos de *A. ochraceus* (A e B): o grupo A subdividido em subgrupos A1 e A2; e um novo grupo denominado B, o qual acomoda a maioria dos isolados brasileiros e a cepa NRRL 3174.

Recentemente, Frisvad et al. (2004) propuseram uma nova classificação para os fungos da secção *Circumdati* baseados em dados morfológicos, produção de micotoxinas, e capacidade de crescimento em diferentes substratos e temperaturas. Os autores foram capazes de propor novas taxa da secção, incluindo entre eles, alguns que eram caracterizados e identificados formalmente como *A. ochraceus*. Baseando-se nos resultados obtidos e nas seqüências de nucleotídeos depositadas no NCBI (FUNGARO et al. 2004; VARGA et al. 2000b) o grupo B identificado por Fungaro et al. (2004) foi renomeado a uma nova espécie da secção *Circumdati*. Esta nova espécie foi denominada *Aspergillus westerdijkiae*. Conseqüentemente, a linhagem original produtora de ocratoxina A,

NRRL 3174 (VAN DER MERWE et al. 1965 a, b) também foi renomeada para *A. westerdijkiae*.

De acordo com Frisvad et al. (2004), *A. westerdijkiae* é uma espécie comum, e a maioria dos isolados a ela pertencente é capaz de produzir grandes quantidades de ocratoxina A. Vários isolados previamente identificados como *A. ochraceus* são agora reconhecidos como *A. westerdijkiae*. Algumas características morfológicas e fisiológicas diferenciam *A. ochraceus* de *A. westerdijkiae*. *A. westerdijkiae* é incapaz de crescer à temperatura de 37°C e tem coloração de escleródios que varia do branco ao creme. Diferentemente, *A. ochraceus* é capaz de crescer à temperatura de 37°C e tem escleródios de coloração rosada e vinho (FRISVAD et al. 2004).

A recente revisão da secção *Circumdati* feita por Frisvad et al. (2004) conclui que 19 espécies constituem esta secção: *A. auricomus*, *A. bridgeri*, *A. cretensis*, *A. elegans*, *A. flocculosus*, *A. insulicola*, *A. roseoglobulosus*, *A. sclerotiorum*, *A. steynni*, *A. melleus*, *A. neobridgeri*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. persii*, *A. petrakii*, *A. pseudoelegans*, *A. sulphureus*, *A. westerdijkiae*, e *Neopetromyces muricatus*. Dentre as espécies que constituem esta secção as espécies *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* e *A. steynii*, são as principais responsáveis pela contaminação de alimentos por ocratoxina A. No que se refere ao café produzido no Brasil, a principal fonte de contaminação por ocratoxina A é a espécie agora denominada *A. westerdijkiae*. A contaminação do café é um fator de grande importância no que diz respeito à compreensão do problema da Ocratoxina A no produto, bem como, do desenvolvimento de estratégias de controle. A experiência com outras culturas mostra que a contaminação ocorre no período pré-colheita, onde o controle é muito mais difícil de ocorrer do que se a contaminação ocorresse no período pós-colheita, durante a secagem ou o armazenamento (TANIWAKI et al., 2003). Taniwaki et al., (2003) concluíram em seu trabalho que a maioria da contaminação no café estudado ocorreu no período pós-colheita, o que envolve as condições gerais do ambiente de colheita e as falhas nos procedimentos de secagem e armazenamento do produto.

3.2 PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A

As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário de algumas espécies de fungos, e quando ingeridas pelos seres humanos e animais podem causar alterações biológicas prejudiciais à saúde. Esses metabólitos são quimicamente diversos, e a variedade de estruturas está diretamente relacionada à diversidade de efeitos tóxicos. As atividades tóxicas persistem por um longo tempo nos alimentos, mesmo após o desaparecimento dos fungos que as originaram. Os substratos contaminados com doses elevadas de micotoxinas, quando ingeridos, podem causar intoxicações de evolução rápida com o comprometimento de vários órgãos.

Membros do gênero *Aspergillus* secção *Circumdati* (o grupo *A. ochraceus* de RAPER & FENNEL, 1965) são importantes devido à capacidade que têm de produzirem algumas micotoxinas tais como: a Ocratoxina A (OTA). Essa toxina teve seu nome originado a partir do produtor *A. ochraceus* (VAN DER MERWE et al. 1965a). Posteriormente, outros fungos foram relatados como produtores de OTA: *Penicillium viridicatum* e *P. verrucosum* (HÄGGBLUM, 1982; LARSEN et al. 2001) entre representantes do gênero *Penicillium*, e uma grande variedade de representantes do gênero *Aspergillus*: *A. alliaceus* e *A. albertensis* (secção *Flavi*); *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. awamori* e *A. foetidus* (secção *Nigr*); e *A. auricomus*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, *A. sulfureus* e *A. westerdijkiae* (secção *Circumdati*) (ABARCA et al. 2001; BAYMAN et al. 2002; DALCERO et al. 2002; FRISVAD et al. 2004). À OTA foram atribuídas as seguintes propriedades: propriedades nefrotóxica, imunotóxica, genotóxica e teratogênica para várias espécies animais. Foi classificada pela Agência Internacional de pesquisa do Câncer como um possível carcinógeno para seres humanos (POHLAND, 1993; IARC, 1993; MANTLE, 2002). A OTA despertou maior interesse por parte da comunidade científica após ter sido relacionada a Nefropatia Endêmica dos Balcãs (BEN), uma disfunção renal crônica degenerativa, que causou a falência renal em uma população adulta na região dos Balcãs. As investigações epidemiológicas baseadas em estudos dos tumores do trato urinário, no sangue dos pacientes da região, apontaram a OTA como agente causal da BEN (STOEV, 1998). Ela é uma molécula moderadamente estável que pode se manter viável após ser submetida à

maioria dos métodos de processamento de alimentos (SCOTT & KANHERE, 1995). Relatos na literatura expõem a ocorrência de OTA em vários produtos alimentícios destinados à alimentação humana, como por exemplo: trigo, milho, cacau, frutas secas, uva, vinho, cerveja e café (SHOTWELL et al. 1976; SCOTT & KANHERE, 1995; ZIMMERLI & DICK, 1996; TANIWAKI et al. 2001; MACDONALD et al. 2003; AMEZQUETA et al. 2005).

Quimicamente, a OTA (N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl)-carbonyl]-3-phenyl-L-alanine) é um derivado de dihidroisocumarina ligado por uma ligação peptídica a um grupo L-β fenilalanina (HARRIS & MANTLE, 2001) (Figura 1). Embora existam algumas informações sobre a formação dos grupos químicos componentes da estrutura química da OTA (MOSS, 1996), detalhes sobre sua biossíntese ainda são desconhecidos. Um único gene relacionado à biossíntese desta toxina, em *A. ochraceus*, foi relatado até o momento. Trata-se de um gene que codifica uma policetideo sintase (*pKs*) (O'CALLAGHAN et al. 2003).

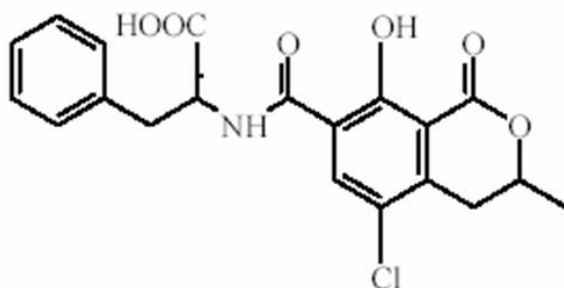


Figura 1 – Estrutura química da Ocratoxina A.

Devido aos danos que esta toxina pode trazer à saúde e a economia de forma geral, se faz pertinente identificar maneiras de eliminar ou minimizar os danos provocados pela presença da toxina no alimento. Vários estudos vêm sendo realizados na tentativa de desenvolver métodos rápidos e específicos de detecção da ocratoxina em alimentos assim como de fungos produtores deste metabólito secundário. Trabalhos que vislumbrem desvendar a via biossintética desta

micotoxina poderão contribuir no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e prevenção do problema.

Dentre as estratégias para detecção destes fungos em alimentos, destaca-se a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). A PCR é uma técnica que se aplica muito bem para este objetivo porque é simples, rápida, não exige grandes quantidades e alto grau de pureza de DNA, e é altamente sensível. Evidentemente, para que a PCR possa ser utilizada para a detecção de fungos produtores de toxina em alimentos é necessário o conhecimento de seqüências de nucleotídeos espécie-específicas. Os alvos gene específicos são seqüências pertencentes a genes que codificam para as enzimas que participam da via biossintética das micotoxinas (genes estes ditos: “genes da biossintese de micotoxinas”). Entretanto, *A. ochraceus* ainda é um fungo pouco estudado geneticamente e não se conhecem os genes que participam da biossintese de OTA a partir deste fungo. A maioria dos trabalhos da literatura relacionados a esta espécie refere-se ao isolamento a partir de diferentes substratos (BATISTA et al. 2002; BENÍCIO et al. 2003), ao seu potencial de produção de ocratoxina (MANTLE & CHOW, 2000; HARRIS & MANTLE, 2001; BAYMAN et al. 2002; TANIWAKI et al. 2003; O’ CALLAGHAN et al. 2003), e à de análise de variabilidade genética (VARGA et al. 2000a, 2000b, 2003; SCHIMIDT et al. 2003; FUNGARO et al. 2004; FRISVAD et al. 2004). A identificação de genes relacionados à biossintese de OTA, poderá contribuir para o desenvolvimento de métodos de detecção de isolados produtores desta micotoxina em alimentos.

3.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Grande parte dos estudos de Biologia Molecular depende do uso de estratégias de transformação genética. Pode-se dizer que a transformação genética é uma etapa essencial da pesquisa moderna dos fungos, e é de grande importância também para o melhoramento de espécies de importância biotecnológica. Assim, o número de estratégias de transformação genética tem aumentado nos últimos anos, abrindo caminho para análises moleculares mais detalhadas (RUIZ-DIEZ, 2002).

O sistema denominado protoplasto - polietileno-glicol (PEG) foi descrito em 1979 por Case et al. para o fungo filamentoso *Neurospora crassa*. O

sistema protoplasto - PEG é a metodologia de transformação mais utilizada até o momento, e baseia-se na ação do agente fusogênico polietilenoglicol (PEG) e íons cálcio (CaCl_2) sobre protoplastos originados a partir da digestão enzimática da parede celular de hifas. Entretanto, apesar de muito comum, esta técnica demanda a otimização etapas envolvidas na obtenção e regeneração de protoplastos (FINCHAM, 1989). Para algumas espécies fúngicas, a frequência de transformação obtida através da utilização de protoplastos é muito baixa (DABOUSSI et al. 1989; BOGO et al. 1996; SUN et al. 2002; ZWIERS & WAARD, 2001), o que inviabiliza alguns estudos de Biologia Molecular que necessitam de um grande número de transformantes.

O segundo sistema que faz uso de protoplastos, denominado eletroporação, foi descrito em 1989 por Ward & Barnes, para *Aspergillus awamori* e *Aspergillus niger*. Este sistema baseia-se na permeabilização reversível de biomembranas, por curto período de tempo, induzida por correntes elétricas de alta amplitude. A ação da corrente elétrica de alta voltagem permite formar poros na membrana da célula hospedeira, facilitando a entrada do DNA exógeno (RUIZ-DIEZ, 2002). Alguns pesquisadores descreveram este sistema de transformação para diferentes espécies fúngicas (St. LEGER et al. 1995; BOGO et al. 1996; MEYER et al. 2003).

A técnica de REMI (Integração mediada por enzimas de restrição), foi descrita primeiramente para *Saccharomyces cerevisiae* (SCHIESTL & PETES, 1991) e posteriormente para outros fungos (LU et al. 1994; BÖLKER et al. 1995; SHI et al. 1995; SWEIGARD et al. 1998) como método de transformação eficiente quando se tem por objetivo a busca de mutantes insercionais. Nessa metodologia, enzimas de restrição são introduzidas na mistura de transformação. Através de um processo ainda pouco compreendido, a enzima tem acesso ao DNA genômico no núcleo do recipiente de transformação, onde ocorre a introdução do material genético em sítios específicos de reconhecimento (THON et al. 2000). Esse sistema possui algumas vantagens como, por exemplo, a alta frequência de transformação, o sucesso na obtenção de mutantes e isolamento de genes em diversas espécies como: *Dictyostelium discoideum* (KUSPA & LOOMIS 1992, 1994), *Neurospora crassa* (KANG & METZENBERG 1993), *Ustilago maydis* (BOLKER et al. 1995), *Alternaria alternata* (AKAMATSU et al. 1997), *Candida albicans* (BROWN et al. 1995), *Coprinus cinereus* (GRANADO et al. 1997), *Magnaporthe grisea* (SWEIGARD et al. 1998; SHI

et al. 1995), *Coniothyrium minitans* (ROGERS et al. 2004) e *Fusarium graminearum* (SEONG et al. 2005). Algumas desvantagens também podem ser observadas, entre elas: o elevado número de deleções genéticas, reorganizações gênicas, mutações inespecíficas e múltiplas inserções (BOLKER et al. 1995).

A biobalística é um procedimento que foi desenvolvido por Sanford et al. (1987) para a transformação genética de plantas. Na década de 90, este procedimento foi adaptado para a transformação genética de micélio ou conídios de fungos filamentosos tais como: *Neurospora crassa* (ARMALEO et al. 1990), *Phytophthora* spp. (BAILEY et al. 1993) e *Aspergillus nidulans* (FUNGARO et al. 1995). Este método consiste na introdução de microprojéteis de metal pesado (ouro ou tungstênio), recoberto com o DNA do vetor, em células hospedeiras com o auxílio de um acelerador de partículas. Em geral, as freqüências de obtenção de transformantes são maiores através da biobalística quando comparadas ao sistema de protoplasto-PEG (St LEGER et al. 1995).

Recentemente, *Agrobacterium tumefaciens*, uma bactéria do solo, aeróbica, Gram-negativa, não formadora de esporos, capaz de induzir a formação de tumores em plantas (BRASILEIRO, 1998; BRASILEIRO & LACORTE, 1998; STAFFORD H. A., 2000) e que até alguns anos era responsável somente pela transformação de células vegetais, passou a ser utilizada também como mediadora da transformação genética de leveduras (BUNDOCK et al. 1995) e fungos filamentosos (De GROOT et al. 1998). Este procedimento de transformação tem mostrado uma série de vantagens com relação aos anteriormente descritos, tais como: a não utilização de protoplastos como material inicial, o que otimiza tempo e custos, e ainda não faz uso de equipamentos caros (FRITZGERALD et al. 2003).

A. tumefaciens é uma das cinco espécies do gênero *Agrobacterium* que pode infectar plantas, causando a doença denominada galha-da-coroa. A doença é caracterizada pela proliferação descontrolada das células próximas à região do colo da planta, o que resulta na formação de um tecido neoplásico, o tumor (SAVKA et al. 1996; AGRIOS, 1997). Ao sofrer uma lesão, a planta libera moléculas-sinal que atraem o *Agrobacterium* e estas infectam as células vegetais. A capacidade de infecção está associada à presença nas agrobactérias de um plasmídio de alto peso molecular (200Kb), denominado plasmídio Ti ("tumor inducing"). Durante a formação do tumor, o T-DNA que é uma região que contém oncogenes e é flanqueada por duas seqüências curtas (aproximadamente 25 pares

de bases) denominadas de borda esquerda (LB) e borda direita (RB), é incorporado no núcleo da planta hospedeira a qual passa a produzir hormônios vegetais (auxina e citocinina) e opinas (compostos sintetizados para a nutrição da bactéria) (BORÉM, 1998). As bordas direita e esquerda do T-DNA são necessárias para que ocorra a transferência do mesmo para o núcleo das células vegetais, no entanto a presença ou não dos outros genes contidos nesta região não interfere no processo de transferência.

O plasmídeo Ti contém vários genes, cuja atividade media a transferência do T-DNA. Os genes mais imprescindíveis na transferência do T-DNA para o núcleo da célula vegetal estão em uma região do plasmídeo Ti que é denominada “região *vir*”. A região *vir* tem cerca de 30kb e contém pelo menos 10 genes (*vir A – vir J*) cujos produtos são vitais para o processamento e a transferência do T-DNA (WEI et al. 2000). Para que desencadeie a transferência do T-DNA para o núcleo da planta, a expressão dos genes *vir* deve ser induzida. Um dos compostos que tem esta propriedade de induzir os genes *vir* é o hormônio vegetal acetoseringona (AS) (KADO, 1991).

Baseando-se neste sistema natural de transferência de genes de procaríoto para eucaríoto, estratégias para transferir genes de interesse do homem às plantas foram desenvolvidas. Este sistema tem sido muito utilizado para a obtenção de plantas transgênicas. No entanto, quando o objetivo é a obtenção de plantas transgênicas, os oncogenes presentes no T-DNA devem ser deletados para evitar a formação de tumor. As linhagens de *Agrobacterium* contendo plasmídios sem a região T, portanto sem oncogenes, são denominadas linhagens “desarmadas” (LACORTE & MANSUR, 1993). Conforme já mencionado, a remoção de todos os genes do T-DNA não inibe a transferência de DNA pela bactéria, mas evita-se a formação de tumores. As linhagens de *Agrobacterium* a serem utilizadas na obtenção de transgênicos podem possuir ainda um segundo vetor, contendo as extremidades do T-DNA (bordas direita e esquerda), entre as quais os genes de interesse são clonados (ZAMBRYSKI et al. 1983; BEVAN, 1984; ROGERS et al. 1986). Esses vetores são denominados de vetores binários e são derivados de plasmídios capazes de se replicar tanto em *Escherichia coli* quanto em *A. tumefaciens*, e de se manter de forma independente do plasmídeo Ti. O vetor deve conter uma região de múltiplos sítios de clonagem entre as extremidades do T-DNA, para a inserção das seqüências desejadas, uma origem de replicação apropriada, e

um gene para seleção em bactéria, geralmente, resistência a um antibiótico (ROGERS et al. 1986).

A Higromicina B é um antibiótico aminoglicosídico que inibe a síntese de proteínas em procariotos e eucariotos interferindo na translocação dos ribossomos e causando erro na leitura da fita de RNAm. Genes que conferem resistência a esse antibiótico foram isolados e caracterizados a partir de linhagens de *Streptomyces hygroscopicus* (ZALACAIN et al. 1986) e *Escherichia coli* (GRITZ & DAVIES, 1983; KASTER et al. 1983). Ambos codificam para uma fosfotransferase que inativa o antibiótico através de fosforilação (GRITZ & DAVIES, 1983). Vetores de clonagem contendo o gene de resistência a higromicina B, *hph* de *E.coli*, foram desenvolvidos para uma série de organismos, inclusive para fungos filamentosos (QUEENER et al. 1985).

Bundock et al. (1995) demonstraram pela primeira vez que o co-cultivo de *Agrobacterium* e células de *S. cerevisiae* proporciona a transformação genética desta levedura. Mais tarde, de Groot et al. (1998) mostraram que *Agrobacterium* também possui a capacidade de transformar fungos filamentosos. Da mesma forma que para plantas, a transferência do T-DNA para a célula fúngica só ocorre se houver a ativação *in vitro* dos genes da região *vir*, a qual vem sendo feita através do uso de acetoseringona na etapa de co-cultivo (BUNDOCK et al. 1995, MULLINS et al. 2001; COMBIER et al. 2003).

Uma das vantagens de se utilizar o método baseado em *Agrobacterium* para transformar fungos filamentosos está relacionada à eficiência de transformação. Alguns trabalhos compararam a eficiência de transformação obtida por este método com aquela obtida por protoplasto PEG e/ou Biobalística, e demonstraram que o sistema *Agrobacterium* permite a obtenção de um maior número de transformantes (AMEY ET AL. 2002; CAMPOY et al. 2003; FITZGERALD et al. 2003; RODRÍGUEZ-TOVAR et al. 2005).

Atualmente, vários parâmetros vêm sendo investigados visando à otimização da frequência de transformação de diferentes espécies fúngicas. Dentre estes parâmetros, destacam-se: a linhagem de *Agrobacterium* utilizada na transformação, a quantidade de células de *Agrobacterium* utilizada no cocultivo, o tempo de cocultivo e a presença ou não de acetoseringona no pré-cultivo da bactéria. O efeito de todas estas variáveis são bem discutidos na revisão de Michielse et al. (2005b).

A integração do DNA exógeno em fungos filamentosos pode ocorrer tanto por recombinação homóloga como por recombinação heteróloga, sendo que esta última tem sido bastante utilizada para a obtenção de mutagênese aleatória em substituição aos métodos para obtenção de mutantes via mutagênese química e radioativa (KHANG et al. 2005; SUGUI et al. 2005). A vantagem da mutagênese insercional via T-DNA sobre os métodos clássicos de indução de mutação, é que as seqüências que flanqueiam o sítio de inserção podem ser identificadas facilmente. A identificação dessas regiões permite associar a função de um gene a um dado fenótipo mutante. Dentro deste contexto, ou seja, de mutagênese insercional com vistas à obtenção de mutantes aleatórios e subsequente identificação do gene mutado, é extremamente relevante o número de cópias do DNA exógeno integrado ao genoma do fungo transformado por *Agrobacterium*. A obtenção de transformantes com inserções únicas é desejável, pois só assim pode-se assegurar que o fenótipo mutante está associado ao gene interrompido. A maioria dos trabalhos que fizeram uso do sistema *Agrobacterium* para a transformação de fungos demonstra que o T-DNA se insere em sítios aleatórios, e que há uma predominância de inserções únicas no genoma do hospedeiro (de GROOT et al. 1998; COVERT et al. 2001, MORIOKA et al. 2006). Esta característica torna o método de agrotransformação bastante atraente quando se deseja obter fenótipos mutantes e identificar os genes a estes relacionados. Alguns trabalhos descrevem variáveis que interferem com o número de cópias integradas ao genoma. Uma das variáveis é a presença ou ausência de acetoseringona no pré-tratamento da bactéria antes do co-cultivo. Neste sentido, os dados são divergentes na literatura. Para *Fusarium oxysporum*, Mullins et al., (2001) demonstraram que a presença de acetoseringona no pré-tratamento da bactéria diminuiu a freqüência de transformantes com integrações únicas. O mesmo tipo de resultado foi obtido por Morioka et al., (2006) ao trabalhar com o fungo *Aspergillus carbonarius*. Ao contrário disso, Combier et al. (2003) registraram que a presença de acetoseringona no pré-tratamento de *A. tumefaciens* aumentou a freqüência de transformantes com integrações únicas do T-DNA no genoma do fungo *Hebeloma cylindrosporium*. Michielse et al. (2005b), discutem em sua revisão que o efeito da acetoseringona no pré-cultivo da bactéria pode ser favorável ou negativo, dependendo da espécie em estudo.

Embora seja grande o número de espécies fúngicas já descritas como passíveis de serem transformadas via *A. tumefaciens* (Tabela 1), poucos genes fúngicos foram identificados até o momento através de mutação insercional via *A. tumefaciens*.

O fungo *Coniothyrium minutans* tem despertado interesse dos pesquisadores por ser capaz de parasitar o fitopatôgeno *Sclerotinia sclerotiorum* e ter, portanto, potencial para uso no controle biológico. Rogers et al. (2004) após transformarem este fungo via *A. tumefaciens* e procederem à análise fenotípica de 1000 transformantes, obtiveram dois mutantes não patogênicos. Posteriormente este mesmo fungo, *Coniothyrium minutans*, foi alvo da pesquisa realizada por Li et al. (2005). Estes autores otimizaram a metodologia de transformação mediada por *A. tumefaciens* e obtiveram uma biblioteca de trinta mil transformantes. A observação de cada um dos transformantes permitiu detectar quatro tipos de mutantes: com deficiência de esporulação, não patogênicos, com alteração na pigmentação e com deficiência na produção de antibióticos. Dentre estes tipos de mutantes o mais freqüente foi do tipo deficiência de esporulação, i.e. 98 mutantes em um total de 30000 transformantes analisados. A análise de seqüências do DNA de um dos mutantes para esporulação mostrou que o gene MAP kinase foi interrompido pelo T-DNA.

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 identificadas. Para dois destes mutantes foi possível identificar o gene nocauteado. Um destes mutantes apresentou a inserção do T-DNA a 575pb upstream do início do gene *LAC1*. O segundo mutante mostrou a inserção do T-DNA 80pb upstream do início do gene *CLC1*. A habilidade de produzir melanina é um fator de virulência chave no patógeno *Cryptococcus neoformans*. Apesar do grande significado da biossíntese de melanina, os processos moleculares e celulares envolvidos nesta biossíntese são ainda pouco conhecidos. Visando identificar genes envolvidos nesta biossíntese, Walton et al. (2005) também investiram na mutagênese insercional deste fungo via *A. tumefaciens*. Os autores isolaram doze mil transformantes visando recuperar genes envolvidos na síntese de melanina. Quatro novos alelos do gene que codifica lacase (*LAC1*) foram identificados.

Vários métodos têm sido descritos para identificar as seqüências de DNA que flanqueiam as bordas direita e esquerda do T-DNA inserido no genoma fúngico (BALZERGUE et al. 2001; COTTAGE et al. 2001; LIU et al. 1995; SINGER & BURKE, 2003). Dentre essas metodologias, a técnica de TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced), descrita primeiramente por Liu et al. (1995), vem sendo bastante utilizada na tentativa de identificar genes em organismos eucarióticos. Ela permite o rápido e eficiente reconhecimento das seqüências que flanqueiam o T-DNA no genoma transformado (COMBIER et al. 2003; MULLINS et al. 2001; RHO et al. 2001; ROLLAND et al. 2003; van ATTIKUM et al. 2001). Essa técnica baseia-se em reações de PCR consecutivas usando *primers* de seqüências específicas e *primers* de seqüências degeneradas. A especificidade do produto resultante após três ciclos de amplificação é alta, o que permite seu sequenciamento e identificação. Cerca de 60 à 80% das reações resultam em produtos específicos com qualquer dos *primers* degenerados desenvolvidos por LIU et al. (1995).

Tabela 1 – Espécies fúngicas transformadas via *Agrobacterium tumefaciens*

Espécies de fungos	Referências
<i>Agaricus bisporus</i>	de Groot et al. (1998)
<i>Aspergillus awamori</i>	de Groot et al. (1998), Michielse et al. (2004a, 2005a)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Morioka et al. (<i>in press</i>)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Sugui et al. (2005)
<i>Aspergillus giganteus</i>	Meyer et al. (2003)
<i>Aspergillus niger</i>	de Groot et al. (1998)
<i>Beauveria bassiana</i>	Dos Reis et al. (2004); Fang et al. (2004); Leclerque et al. (2004)
<i>Beauveria dermatiditis</i>	Brandhorst et al. (2002)
<i>Blakeslea trispora</i>	Heinekamp et al. at ECFG7, 2004
<i>Botrytis cinerea</i>	Rolland et al. (2003)
<i>Calonectria morgani</i>	Malonek & Meinhardt (2001)
<i>Ceratocystis resinifera</i>	Loppnau et al. (2004)

Espécies de fungos	Referências
<i>Chaetomium globosum</i>	Gao & Yang (2005)
<i>Claviceps pururea</i>	Scheffer & Tudzynski at 22nd FGC, 2003
<i>Coccidiodes immitis</i>	Abuodeh et al. (2000)
<i>Coccidiodes posadasii</i>	Kellner et al. (2005)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	de Groot et al. (1998)
<i>Colletotrichum graminicola</i>	Flowers & Vaillancourt. (2005)
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	Tsuji et al. (2003)
<i>Colletotrichum trifolii</i>	Takahara et al. (2004)
<i>Coniothyrium minitans</i>	Rogers et al. (2004); Li et al. (2005)
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Park & Kim (2004)
<i>Cryptococcus neomorfans</i>	Idnurm et al. (2004)
<i>Cryptococcus gatii</i>	McClelland et al. (2005)
<i>Fusarium circinatum</i>	Covert et al. (2001)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Mullins et al. (2001); Mullins & Kang (2001)
<i>Fusarium venenatum</i>	de Groot et al. (1998)
<i>Glarea lozoyensis</i>	Zhang et al. (2003)
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	Combier et al. (2003)
<i>Helminthosporium turcicum</i>	Degefu & Hanif (2003)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Sullivan et al. (2002)
<i>Hypholoma sublateritium</i>	Godio et al. (2004)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Bundock et al. (1999)
<i>Leptosphaeria maculans</i>	Gardiner & Howlett (2004); Gardiner et al. (2004)
<i>Magnaporthe grisea</i>	Rho et al. (2001); Khang et al. (2005)
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	M. Furlaneto, comunicação pessoal
<i>Monascus purpureus</i>	Campoy et al. (2003)
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Donzelli et al. at 22nd FGC, 2003
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Zwiers & de Waard (2001)
<i>Mucor miehei</i>	Monfort et al. (2003)
<i>Neurospora crassa</i>	de Groot et al. (1998)

Espécies de fungos	Referências
<i>Omphalotus olearius</i>	Voss et al. at ECFG6, 2002
<i>Ophiostoma piceae</i>	Tanguay & Breuil (2003)
<i>Ophiostoma piliferum</i>	Hoffman & Breuil (2004)
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Lima et al. (<i>in press</i>)
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Leal et al. (2004)
<i>Paxillus involutus</i>	Pardo et al. (2002)
<i>Pisolithus microcarpus</i>	Pardo et al. (2005)
<i>Pisolithus tinctorius</i>	Rodriguez-Tovar et al. (2005)
<i>Phytophthora infestans</i>	Vijn & Govers (2003)
<i>Phytophthora palmivora</i>	Vijn & Govers (2003)
<i>Pythium ultimum</i>	Vijn & Govers (2003)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Michielse et al. (2004b)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bundock et al. (1995; 1996)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Weld et al. (2005)
<i>Suillus bovinus</i>	Hanif et al. (2002); Pardo et al. (2002)
<i>Trichoderma asperellum</i>	Cardoza et al. at ECFG7, 2004
<i>Trichoderma atroviride</i>	Cardoza et al. at ECFG7, 2004; Zeilinger (2003)
<i>Trichoderma hazianum</i>	Quoc-Khanh et al. at 21st FGC, 2001
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Cardoza et al. at ECFG7, 2004
<i>Trichoderma reesei</i>	de Groot et al. (1998)
<i>Tuber borchii</i>	Grimaldi et al. (2005)
<i>Venturia inaequalis</i>	Fitzgerald et al. (2003)
<i>Verticillium dahliae</i>	Dobinson et al. (2003)
<i>Verticillium fungicola</i>	Amey et al. (2002)

Modificação e atualização da tabela apresentada por MICHELSE et al. 2005b

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGEM DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Agrobacterium tumefaciens linhagem AGL1 (ATCC/BAA-101) usada para a transformação foi gentilmente cedida pelo Dr. C. Peter Romaine da Universidade da Pensilvânia, EUA. A agrobactéria foi estocada em meio Luria-Bertani (LB) contendo os antibióticos para a manutenção do plasmídeo Ti desarmado: canamicina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e estreptomicina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

4.2 VETOR BINÁRIO

O vetor binário plasmídeo pPK2 (10,77 Kb) foi construído pela Dra. Sarah F. Covert no Departamento de Botânica da Universidade da Geórgia, EUA e cedido gentilmente ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, Brasil. Este vetor, derivado do plasmídeo pZP201 (HAJDUKIEWICS et al. 1994), possui as bordas esquerda (LB) e direita (RB) do T-DNA, flanqueando o gene da fosfotransferase (*hph*) de *E. coli*, que confere resistência a higromicina B, controlado pelo promotor *Pgpd* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e pela seqüência terminal *Ttrp C* (síntese do triptofano), ambos de *A. nidulans*. No plasmídeo Ti a bactéria possui o gene Kan^R marcador genético para resistência a canamicina. O vetor binário pPK2 foi introduzido em *A. tumefaciens* via eletroporação pela Profa. Dra. Márcia Cristina Fulaneto do departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

4.3 ISOLADO FÚNGICO

Aspergillus westerdijkiae linhagem ITAL 142 foi gentilmente cedida pela Dra. Marta H. Taniwaki do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, São Paulo, Brasil. Trata-se de uma linhagem isolada de grãos de café e caracterizada como produtora de ocratoxina A (TANIWAKI et al., 2003).

4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE DA LINHAGEM ITAL 142 A HIGROMICINA B

A inibição do crescimento de *A. westerdijkiae* (ITAL 142), por higromicina B foi determinada antes dos experimentos de agrotransformação. Para a determinação da CIM (concentração inibitória mínima) o isolado fúngico foi inoculado em placas de petri contendo meio completo (MC) (PONTECORVO et al. 1953), com diferentes concentrações de higromicina B (0, 100, 150, 200 e 300 µg Hyg/mL). As placas foram incubadas à 28°C durante sete dias e posteriormente o desenvolvimento do fungo foi analisado nas placas com diferentes concentrações do antibiótico.

4.5 COLORAÇÃO DE NÚCLEOS DOS CONÍDIOS

A coloração de núcleos dos conídios foi realizada seguindo-se o protocolo de Tanaka et al. (1979). Os conídios foram aderidos a uma lamínula usando uma gota de solução de albumina. Após secagem, o material foi fixado usando ácido acético –etanol (3:1 v/v) por 30 minutos a temperatura ambiente. Após secagem procedeu-se a lavagem do material em etanol 95% e posteriormente em etanol 70%. Após estas duas lavagens o material foi submetido à hidrólise em HCl 1 N a 60°C por 12 min. Após a hidrólise a lamínula foi lavada em água destilada, tratada com corante Giemsa (0.07% Giemsa em tampão fosfato 50 mM / pH 6.9 / 3% glicerol / 3% metanol) por 30 minutos. Por fim, a lamínula foi lavada em água corrente e depositada sobre uma lâmina para observação sob microscópio óptico.

4.6 TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Após sete dias de crescimento do isolado *A. westerdijkiae* ITAL 142, conídios foram suspensos em solução tween 80 e contados em câmara de Neubauer. A suspensão de conídios foi centrifugada e ressuspensa em meio de indução (MI) em um volume de 7 mL contendo 200 μM de acetoseringona (AS) à uma concentração ajustada de 2×10^6 conídios/mL ou 2×10^7 conídios/mL.

Agrobacterium tumefaciens linhagem AGL1 carregando o plasmídeo pPK2 foi recuperada do estoque em glicerol, cultivada duas vezes subseqüentes durante 12 h a 28°C, 180 rpm em meio LB líquido ($V = 7$ mL) suplementado com canamicina ($50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) e estreptomicina ($50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$). Uma suspensão de células da agrobactéria foi diluída para um densidade óptica $\text{DO}_{660 \text{ nm}}$ de 0,15 em meio de indução na presença ou na ausência de AS (200 μM) em um volume final de 10 mL. Para os experimentos de transformação as células foram incubadas, a 28°C em 180 rpm, por um tempo adicional até que a cultura alcançasse $\text{DO}_{660 \text{ nm}}$ de 0,6 a 0,8. Nas condições utilizadas este tempo de indução de competência foi de aproximadamente 9 horas.

Após este período, as suspensões de agrobactéria ($\text{DO}_{660 \text{ nm}} = 0,6 - 0,8$) e fungo (2×10^6 conídios/mL ou 2×10^7 conídios/mL) foram misturadas em igual volume (100 μL). Essa mistura (200 μL) foi plaqueada em uma membrana de nitrocelulose (de 0,45 μm de porosidade e 90 mm de diâmetro, MFS, Japan) que estava posicionada sobre meio de indução solidificado contendo AS (200 μM). As placas foram incubadas à 28°C durante 36 horas. Após este período que é denominado, tempo de co-cultivo, as membranas foram transferidas para placas contendo meio de cultivo M-100 (STEVENS, 1974) suplementado com 150 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de mefoxina (MERCK) e 200 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de Hyg B (INVITROGEN Life Technologies). A mefoxina é usada para eliminar a bactéria, e a Hyg B para selecionar os transformantes. As colônias resistentes a Hyg B visualizadas após 7 dias foram contadas e repicadas para placas de petri contendo meio de cultivo seletivo (M-100 suplementado com 200 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de Hyg B) até a conidiogênese.

4.7 EXTRAÇÃO DE DNA PARA USO EM PCR E SOUTHERN BLOT

Trinta transformantes escolhidos ao acaso e a linhagem selvagem ITAL 142 de *A. westerdijkiae* foram cultivados durante 7 dias à 28°C em placas contendo meio seletivo solidificado 1,5% (M-100 suplementado com 200 µg.mL⁻¹ de Hyg B), sendo em seguida repicados em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio completo sem adição de Hyg B à 28°C sob agitação de 180 rpm durante 20 horas. Aglomerados de micélios foram coletados por filtração e lavados por várias vezes com água destilada autoclavada. O filtrado foi congelado duas a três vezes em nitrogênio líquido e macerado até obter um pó. O DNA genômico dos transformantes e da linhagem selvagem foi isolado do material macerado usando o protocolo descrito em Azevedo et al. (2000).

A quantidade de DNA dos transformantes foi determinada por leitura da intensidade de fluorescência do brometo de etídio, após eletroforese do DNA em gel de agarose 0,8% (p/v). O brometo de etídio é um corante (tóxico) que se intercala nas moléculas dos ácidos nucléicos sendo que à luz ultravioleta induz sua fluorescência. A intensidade da fluorescência observada sob UV é proporcional à massa total de DNA da amostra colocada no poço da eletroforese. Foi preparada uma diluição 1:10 do DNA de cada transformante onde 10µL da diluição foi introduzido no gel para eletroforese. Para quantificação comparou-se a fluorescência da amostra com àquela de um padrão conhecido (DNA de fago *lambda* a 1,2; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 ng/µL).

4.8 ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES POR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

O DNA genômico dos transformantes e da linhagem selvagem foi analisado para a presença do gene *hph* por PCR (Polymerase Chain Reaction). Os *primers*: *hph* 1 (5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3') e *hph* 2 (5'-CGCGTCTGCTGCTCCATAACAAG-3'), que reconhecem porções do gene *hph* foram utilizados na reação de PCR. Cada reação de amplificação foi preparada com um volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão 10x (Invitrogen, Life Technologies

200 mM Tris – HCl pH 8,4 / 500 mM KCl); 2,0 μ L de dNTP (Invitrogen – Life Technologies 2,5 mM) / 1,5 μ L de *primer* hph 1 e hph 2 (Invitrogen, Life Technologies – 10 pmol/ μ L) / 1,0 μ L de MgCl₂ (Invitrogen, Life Technologies – 50 mM) / 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies – 1U/ μ L) / 3 μ L da amostra de DNA (5 ng/ μ L). O volume foi completado para 25 μ L com água ultrapura.

Para a amplificação foi utilizado o termociclador PT – 100 (MJ Research, Inc). As condições de ciclagem foram aquelas descritas por Malonek e Meinhardt (2001), ou seja: um ciclo de desnaturação inicial de 4 minutos à 95°C, seguidos de 35 ciclos, sendo cada ciclo consistindo de 45 segundos à 92°C (desnaturação), 1 minuto à 60°C (anelamento) e 1,5 minutos à 72°C (polimerização), finalizando o processo com 5 minutos à 72°C (extensão). Após a amplificação, as amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corrido em tampão TBE 1x. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados em fotodocumentador Digi Doc.

4.9 ANÁLISE DA ESTABILIDADE MITÓTICA DOS TRANSFORMANTES

Para estimar a estabilidade mitótica do DNA exógeno no genoma do hospedeiro, 16 transformantes escolhidos ao acaso foram analisados. Conídios das extremidades das colônias crescidas em meio seletivo (M-100 suplementado com 200 μ g.mL⁻¹ de Hyg B), durante 7 dias à 28°C foram repicados para placas contendo meio completo sem adição de Hyg B durante 10 (dez) gerações sucessivas. Após este procedimento conídios provenientes do crescimento da décima repicagem em meio não seletivo foram transferidos para placas de 26 pontos contendo meio M-100 suplementado com 200 μ g.mL⁻¹ de Hyg B. Após incubação a 28°C durante 7 dias procedeu-se a contagem de colônias crescidas e calculou-se a percentagem de transformantes que mantiveram o fenótipo higromicina resistente.

4.10 ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES QUANTO AO NÍVEL DE RESISTÊNCIA A HIGROMICINA B

Para determinar o nível de resistência a Hyg B, os transformantes foram inoculados em placas de 26 pontos, contendo meio M-100 solidificado em diferentes concentrações de higromicina B (0, 25, 50, 75, 150, 300, 600, 900 e 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A linhagem selvagem ITAL 142 foi utilizada como controle.

4.11 RESTRIÇÃO DO DNA GENÔMICO DOS TRANSFORMANTES E TRANSFERÊNCIA PARA A MEMBRANA DE NAILON

Para a análise por Southern Blot os DNAs extraídos foram submetidos à hidrólise com a enzima de restrição *Sst*I (Invitrogen, Life Technologies) a 10 U/ μL . Esta enzima reconhece e cliva uma seqüência de nucleotídeos presente em uma das extremidades do cassete de expressão. A reação de restrição foi feita em um volume total de 100 μL , contendo 3 μg de DNA, 10 μL de tampão React[®] 2 e 20 U da enzima *Sst*I. A reação foi incubada a 37°C (em banho-maria) durante 12 horas, e após este período a enzima foi inativada por aquecimento a 65°C por 5 minutos. Para concentrar a amostra hidrolisada foi feita uma precipitação adicionando-se 10 μL de NaCl (3 M) e 250 μL de álcool absoluto gelado. Após incubação a -20°C por 12 horas, o material foi centrifugado (10.000 rpm por 10 minutos) e o precipitado lavado com álcool 70%. Após secagem em temperatura ambiente, o DNA hidrolisado foi ressuspenso em 10 μL de H₂O estéril. Os 10 μL de DNA hidrolisado foram colocados em gel de agarose 0,8%. A eletroforese foi realizada a 3 V por cm de distância entre os eletrodos de modo a obter uma corrida lenta. O gel foi posteriormente corado com brometo de etídio e fotografado em fotodocumentador Digi Doc.

Após a eletroforese o DNA foi transferido para uma membrana de náilon conforme procedimento a seguir: foi feito um pequeno corte na porção inferior do lado esquerdo do gel de agarose. O gel foi submetido à depurinização em solução depurinizante HCl 0,2 N (4,97 mL de HCl em 295,3 mL de H₂O), por 10

minutos. Após este período o gel foi lavado com água destilada e transferido para uma solução desnaturante (NaOH 6,0 g; 26,26 g NaCl; H₂O 300 mL) por 30 minutos. O gel foi lavado com água destilada e em seguida neutralizado através da incubação por 30 minutos em solução neutralizadora (150 mL de Tris-HCl 2 M pH7,2; 150 mL de NaCl 3,0 M), com agitação branda à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido mais uma vez, porém incubando-se por apenas 15 minutos. Enquanto o gel estava na solução de neutralização, utilizando-se de luvas em todas as etapas, foi preparada a membrana de náilon (HYBOND-N – AMERSHAM). A membrana foi umedecida em água destilada e então imersa em tampão de transferência SSC 20 X por 5 minutos. A transferência do DNA contido no gel para a membrana de náilon foi feita por 12 horas em um aparato de transferência tradicional. Para fixar o DNA na membrana, expôs-se o lado da membrana com o DNA voltado para cima a uma fonte de luz UV (baixa intensidade) dando 3 pulsos de 1 minuto, com 2 minutos de intervalo entre os pulsos. A membrana foi lavada com água destilada e seca em cima de um papel de filtro comum por 2 horas em temperatura ambiente. Por fim, a membrana foi guardada em um envelope de papel de filtro comum e alumínio à -20°C.

4.12 EXTRAÇÃO DO PLASMÍDIO PPK2 PARA PREPARO DA SONDA DE HIBRIDAÇÃO

Células de *E. coli* transformadas com o vetor pPK2 que contém o gene *hph* foram inoculadas em meio LB líquido (3 mL) com ampicilina 100 µg.mL⁻¹ (3,0 µL) e incubadas a 37 °C, 180 rpm, por 12 horas. Em seguida, o meio de cultura contendo as células transformadas foi aliqotado em tubos de 1,5 mL e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 100 µL de GET (glicose 20%; EDTA 0,5 M pH 8,0; Tris-HCl 1M pH 7,4), homogeneizando-se suavemente. Após esta fase, foram adicionados 100 µL da solução de lise (2 mL NaOH 10 N; 1 mL SDS 10%), invertendo-se o tubo e incubando-se em gelo por 5 minutos. Foram adicionados 200 µL da solução de neutralização (30 mL KOAc 5 M; 5,75 mL C₂H₄O₂; 14,25 mL água *milliQ*) e em seguida misturou-se por inversão dos tubos, sendo logo após incubados em gelo por 5 minutos, e centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi

transferido (400 µL) para um novo tubo, e foram colocados 2,5 volumes (1 mL) de álcool absoluto, invertendo-se o tubo e deixando no freezer por 15 minutos. Logo após, centrifugou-se a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 500 µL de álcool 70% na parede do tubo, e o sobrenadante novamente descartado. Após a secagem do DNA, o mesmo foi ressuspensão em 50 µL de água *milliQ*. Nesta fase foram adicionados 7 µL de RNase (100 ng/µL) e incubados por 15 minutos a 37 °C. Após este período, foram colocados 50 µL de clorofane, invertendo-se suavemente o tubo e centrifugando por 5 minutos a 12000 rpm, então, foi retirada a fase superior e a mesma transferida para um novo tubo de microcentrífuga. No novo tubo, foram acrescentados 5 µL (1/10 do volume) de NaCl 3 M juntamente com 100 µL de etanol absoluto gelado (2 volumes), e foi deixado no freezer por uma hora. Ao ser retirado do freezer, foi novamente centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado, então foram adicionados 100 µL de etanol 70%, para lavagem, descartando-se em seguida e deixando secar. O precipitado foi ressuspensão em 20 µL de água *milliQ*.

4.13 OBTENÇÃO DO FRAGMENTO DO GENE HPH E MARCAÇÃO DA SONDA

Para a hidridação foi utilizado como sonda um fragmento de DNA contendo o gene *hph* de 1,75 Kb. Este fragmento foi obtido por PCR com os *primers* *hph* 1 (5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3') e *hph* 2 (5'-CGCGTCTGCTGCTCCATAC AAG -3').

A marcação da sonda foi realizada segundo o protocolo do Kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche). Trezentos nanogramas de DNA molde foram desnaturados à 95°C em banho-maria por 10 minutos, seguido de resfriamento rápido em gelo. Após desnaturação, foram adicionados ao DNA 4 µl do Mix DIG-High Prime (fornecido pelo kit). A solução foi homogeneizada e incubada à 37°C por 18 horas. A reação foi interrompida pela adição de 2 µl de EDTA (0,2 M, pH 8,0) e aquecimento em banho-maria à 65°C por 10 minutos.

A sonda foi quantificada conforme os procedimentos sugeridos no protocolo do Kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche).

4.14 HIBRIDAÇÃO

A hidridação foi realizada conforme recomendado pelo protocolo do Kit DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Roche).

As membranas foram colocadas em saco plástico contendo 5 mL de solução de pré-hibridação (Kit) e incubadas a 42°C, sob 80 rpm de agitação, por 30 minutos. Decorrido este tempo, a solução de pré-hibridação foi retirada do saco plástico. Cerca de 120 ng de sonda previamente desnaturados a 100°C por 5 minutos seguidos de resfriamento em gelo, foram suspensos em 5 mL de solução de hibridação, e então colocados no saco plástico. As membranas foram incubadas por 18 horas nas mesmas condições de pré-hibridação.

Após hibridação, as membranas foram inicialmente lavadas duas vezes com SSC 2x, SDS 0,1% por 5 minutos a 25°C, e mais duas vezes com SSC 0,5x, SDS 0,1% por 15 minutos a 68°C, sob 80 rpm de agitação. Em seguida, foram lavadas em tampão de lavagem (ácido maléico 0,1 M; NaCl 0,15 M; Tween 20 0,3 %, pH 7,5) por 5 minutos a 30°C sob agitação, e incubadas em 144 mL de solução de bloqueio (Kit) diluído 1:10 em tampão de Ácido Maleico, por 30 minutos nas mesmas condições. As membranas ainda foram incubadas por 30 minutos a 30°C em 30 mL de solução de anticorpo (Kit), anteriormente diluída 1:10000 em solução de bloqueio, também sob agitação, e novamente lavadas em tampão de lavagem duas vezes por 15 minutos a 30°C sob agitação. Por último, foram colocadas em 30 mL de tampão de detecção (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 0,1 M pH 9,5) por 5 minutos em iguais condições. As membranas foram colocadas sobre uma folha de transparência e às suas faces contendo o DNA foram aplicados 1,44 mL de CSPD (Kit). Em seguida as membranas foram cobertas com outra folha de transparência e incubadas por mais 5 minutos a 30°C. O excesso de líquido entre as folhas de transparência entre as quais estavam as membranas foi retirado rolando-se um bastão de vidro sobre elas. As membranas foram incubadas por 10 minutos a 37°C e expostas a filme de raio-X por 2 horas.

4.15 SELEÇÃO DE MUTANTES PARA OCRATOXINA A

Um total de 600 transformantes foi avaliado quanto à capacidade de produção de ocratoxina A em meio leite de coco-ágar (HEENAN et al. 1998). A cada placa foi inoculado um transformante e a linhagem selvagem (ITAL 142). Após incubação das placas a 28°C por 6 dias as placas foram observadas em luz ultravioleta. Os transformantes que não mostraram halo fluorescente azul foram selecionados para análise em HPLC usando a metodologia descrita por Bragulat et al. (2001). Os transformantes foram inoculados em placas de Petri contendo meio Ágar Sacarose Extrato de Levedura (YESA). As placas foram incubadas por 7 dias a 25°C, sendo posteriormente testados quanto à produção de ocratoxina através da técnica de “ágar plug”. Três plugs de ágar foram removidos da área central das colônias, pesadas e introduzidas em um pequeno frasco. Um volume de 0,5 mL de metanol foi adicionado e, após 60 minutos, o extrato foi filtrado (Millex-Millipore, Massachusetts, USA) e injetado em um sistema HPLC. O equipamento de HPLC usado foi um Shimadzu LC-10VP System (Shimadzu, Japan) com um detector de fluorescência de 333 nm de excitação e 477 nm de emissão. O HPLC foi ajustado com uma coluna de guarda Shimadzu CLC G-ODS (4 x 10 mm) e uma coluna Shimadzu Shimpack CLC-ODS (4.6 x 250 mm). A fase móvel foi metanol: acetonitrila: água deionizada: ácido acético (35:35:29:10) e a taxa de fluxo foi 0,8 mL/min. Uma ocratoxina A padrão (Sigma Chemical, St Louis, USA) foi usada para a construção de uma curva de calibração, área de pico *versus* massa (ng). A concentração de OTA no extrato da amostra foi determinada pela interpolação da área de pico resultante a partir do gráfico de calibração.

4.16 TAIL-PCR E SEQUENCIAMENTO DE DNA

O DNA genômico dos mutantes (T10 e TS18) foram usados como molde nas reações de TAIL-PCR. O par de *primer*, degenerado AD2 e específico RB foram usados conforme mostra a Tabela 2. As condições de reação e amplificação foram idênticas àquelas descritas por Combier et al. (2003). Três ciclos de

amplificação foram feitos em termociclador PTC 100 (MJ Research). Os produtos secundários e terciários foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5%). Os produtos resultantes das PCR terciárias que eram cerca de 100 bp menores que os respectivos produtos obtidos nas PCR secundárias foram excisados do gel e purificados usando o Kit CONCERT™ Rapid Gel Extraction System (Gibco BRL, Germany, US, UK). O DNA resultante foi sequenciado usando DYEnamic™ ET dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) em MegaBACE 1000. As seqüências foram comparadas através da ferramenta BLAST disponível nos *sites* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e do TIGR (<http://tigrblast.tigr.org>).

Tabela 2 - Seqüências e temperaturas de anelamento dos *primers* usados na TAIL-PCR (Combiar et al. 2003).

<i>Primer</i>	Seqüência de nucleotídeos (5' para 3')	Temperatura de anelamento (C°)
RB1	GGCACTGGCCGTCGTTTTACAAC	64
RB2	AACGTCGTGACTGGGAAAACCCT	62
RB3	CCCTTCCCAACAGTTGCGCA	61
AD2	NGTCGASWGANAWGAA	47

W=A ou T; N=A, T, C ou G; S= G ou C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão desta dissertação são apresentados na forma de um artigo científico que será enviado para o periódico “Antonie van Leeuwenhoek”. As normas de publicação para este periódico encontram-se nos anexos (Anexo 2).

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae*

Marcia M. Mata¹, Marta H. Taniwaki², Beatriz T. Iamanaka², André Oliveira¹, Márcia C. Furlaneto¹, Daniele Sartori¹, Maria Helena P. Fungaro^{1*}

¹ Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, PO Box 6001, Londrina – Paraná – Brazil, Zip code 86051-990, E-mail: fungaro@uel.br, Tel: 55-43-3371-5731

² Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, Av. Brasil, 2880, Campinas- São Paulo – Brazil, Zip code 13.070-178

*corresponding author

Abstract

Aspergillus westerdijkiae is a potent ochratoxin A producer that has been found in coffee beans. Ochratoxin A is known to have nephrotoxic effects and carcinogenic potential in animal species. Here we report the *Agrobacterium*-mediated transformation for *A. westerdijkiae*. Conidia were transformed to hygromycin B resistance using AGL-1 strain of *Agrobacterium tumefaciens*. The obtained transformation frequency was up to 47 transformants per 10^6 target conidia. Among 600 transformants around 5% showed morphological variations. Two transformants (T10 and TS18) with consistently reduced ochratoxin A production were obtained. Fungal sequences flanking the insertion site could be amplified by Thermal Asymmetric Interlaced PCR. The sequence obtained from TS18 had homology to a monooxygenase putative from *Aspergillus fumigatus*. For the transformant T10 it was found a jumonji family of transcription factor with a C4HC3 zinc-finger-like motif that has homology with *A. fumigatus*.

Keywords:

Agrobacterium-mediated transformation, *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, Ochratoxin A

Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a secondary metabolite that is known to have nephrotoxic effects and carcinogenic potential in animal species (IARC, 1993). This mycotoxin was first identified in *Aspergillus ochraceus*, which belongs to section *Circumdati*. The taxonomy of this section remains in progress and recently Frisvad et al. (2004) proposed the division of formal *A. ochraceus* species into two species, *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae*. Several isolates previously identified as *A. ochraceus* is now recognised as *A. westerdijkiae*, including the original OTA producing strain (NRRL 3174). In a previous work, we showed that two groups (A and B) of *A. ochraceus* are found in Brazilian coffee beans (Fungaro et al. 2004), and the majority of the isolates was accommodated in group B. Based on the recently proposed classification (Frisvad et al. 2004) the group B isolates was recognised as *A. westerdijkiae*, which is the most important OTA producing species in Brazilian coffee beans.

OTA consists of a chlorinated isocoumarin-derivative linked to L-phenylalanine (Moss 1996; O'Callaghan et al. 2003). Despite its importance, the knowledge of the biosynthetic pathway for OTA is very limited. Based on OTA molecular structure, several enzymatic activities are supposed to be required for its biosynthesis. To our knowledge, only a part of one gene (*pks*) involved in the OTA biosynthesis has been characterized from *A. ochraceus* (O' Callaghan et al. 2003).

The T-DNA insertional mutagenesis strategy is a recent and powerful tool for the identification of genes involved in a particular function. This strategy is based on the well-known ability of *Agrobacterium tumefaciens* to transform host genomes by transferring part of its DNA (T-DNA) to the host nuclei. In plants, T-DNA insertional mutagenesis has been extensively used for cloning genes, promoters, enhancers

and other regulatory sequences (reviewed by Radhamony et al. 2005). In comparison to plants, the protocols for the transference of T-DNA into fungi cells have recently been described (Bundock et al. 1995; de Groot et al. 1998). The number of fungi that can be transformed by *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) is still increasing, and there is a consensus that each species must be considered independently, and the transformation-protocols optimized (Michielse et al. 2005 and references therein).

The *Agrobacterium*-mediated transformation methodology generates a high number of transformants, mostly with one single foreign-DNA copy integrated at random sites in the fungal genome (Mullins et al. 2001; Combiere et al. 2003; Tsuji et al. 2003; Leclerque et al. 2004). The advantage of T-DNA over classical mutagens is that the fungal sequences flanking the insertion site can be isolated easily. This simplifies the identification of genes corresponding to interesting mutants. There are some very recent reports about success in obtaining sporulation deficient mutants, pathogenicity deficient mutants, and pigmentation change mutants (Li et al. 2005; Rogers et al. 2004; Leclerque et al. 2004) by using AMT methodology.

Here, we initiated our work by adapting the AMT methodology to *A. westerdijkiae* aiming at the isolation of insertional mutants that can be useful for cloning genes involved in the biosynthetic pathway of OTA. We report the first *Agrobacterium*-mediated transformation of *A. westerdijkiae* and the isolation of five ochratoxin-defective mutants.

Material and methods

Strains and plasmid

The ITAL 142 strain of *Aspergillus westerdijkiae*, which was isolated from Brazilian coffee-bean samples (Taniwaki et al. 2003) was used. *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL-1, harbouring the Ti plasmid was kindly given by C. P. Romaine (Pennsylvania State University, PA, USA). The binary vector pPK2 (Covert et al. 2001) that contains the T-DNA borders harbouring the hygromycin B resistance gene (*hyg* B) driven by the *Aspergillus nidulans* *gpd* promoter and *trpC* terminator was kindly provided by S. Covert (University of Georgia, Athens, GA, USA).

Nuclei staining

The conidia staining were performed according to Tanaka et al. (1979). Briefly, conidia were attached to a coverlid by using one drop of albumin solution. The material was fixed by using ethanol-acetic acid (3:1 v/v) for 30 min at room temperature. The slide was dried, washed once in 95% ethanol and once in 70% ethanol, and then treated with 1N HCl at 60°C for 12 min. The coverlid was washed in water, treated with Giemsa stain (0.07% Giemsa in 50 mM phosphate buffer, pH 6.9, 3% glycerol, 3% methanol) for 30 min, and again rinsed in water. The stained nuclei in conidia were viewed by light microscopy.

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation

The protocols for the transformation of *A. westerdijkiae* were adapted from de Groot et al. (1998). Cells of the AGL-1 strain of *A. tumefaciens* were grown at 28°C for 48 h in *Agrobacterium* minimal medium (Hooykaas et al. 1979) supplemented with kanamycin (50 mg.ml⁻¹) and streptomycin (50 mg.ml⁻¹). The culture was diluted to an

OD660 = 0.15 in induction medium (IM) (10 mM K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 2.5 mM NaCl, 2 mM MgSO₄, 0.7 mM CaCl₂, 9 μM FeSO₄, 4 mM NH₄SO₄, 10 mM glucose, 40 mM 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid, pH 5.3, 0.5% glycerol) in the presence (IM+AS) or absence (IM-AS) of 200 μM acetosyringone (AS) (Sigma, St. Louis, Mo.). The cells were grown for an additional 9 h before mixing them with an equal volume of a conidial suspension from the *A. westerdijkiae* recipient strain (10⁶ or 10⁷ per ml each). For co-cultivation, this mix (200 μl) was spread onto a nitrocellulose filter (0.45 μm pore and 90 mm diameter, MFS-Japan) that was placed on an agar plate containing the co-cultivation medium (same as IM, but containing 5 mM instead of 10 mM of glucose and 200 μM AS). Following co-cultivation at 28°C for 36 h, the membranes were transferred to M-100 plates (Stevens 1974) that had hygromycin B (200 mg.ml⁻¹) as the selection agent, and mefoxin (150 mg.ml⁻¹) to inhibit growth of *A. tumefaciens* cells. After incubation for 7 days at 28°C, the number of hygromycin-resistant colonies was counted. For each transformation trial, co-cultivation under non-inducing conditions (without AS) was used as negative controls.

Assay for mitotic stability of transformants

To determine mitotic stability, 16 randomly selected *A. westerdijkiae* transformants were cultured on CM (Pontecorvo et al. 1953) devoid of hygromycin B. Following growth, conidia of each of the transformants were transferred onto fresh CM. This procedure was repeated 10 times. Then, conidia of each of the transformants were transferred onto M-100 containing hygromycin B (200 mg.ml⁻¹).

PCR analysis

Fungal genomic DNA for the PCR was obtained according to a published protocol (Azevedo et al. 2000). PCR detection of the *hph* gene was performed using the following primer-pair: *hph1* (5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3') and *hph2* (5'-CGCGTCTGCTGCTCCATAACAAG-3'). The reaction contained: 3.0 µl of template, 0.5 µl MgCl₂ (50 mmol), 2.5 µl Taq DNA polymerase buffer 10X, 1.0 µl of each primer (Invitrogen- Life Technologies, USA, 10 pmol each), 2.0 µl dNTP (2.5 µM), and 0.1 µl Taq polymerase (5 U/µl). The reaction was submitted to a PTC 100 thermal cycler (MJ Research). Amplification reactions were carried out under the following conditions: an initial denaturation step (95°C, 2 min), 35 cycles of denaturation (92°C, 45 s), annealing (60°C, 1 min) and elongation (72°C, 1.5 min), and a final elongation (72°C, 5 min).

Southern blot analysis

The DNA (3 µg) was digested with *Sst*I that cuts the expression cassette once, outside the *hph* gene. Standard procedures described by Sambrook and Russell (2001) were used for restriction endonuclease digestion, agarose-electrophoresis, and transference onto nylon membranes. As a DNA probe, a fragment of *hph* gene (600 bp) was used. This fragment was obtained by PCR using the above-mentioned primer-pair. DNA probe labelling and hybridization were performed using a digoxigenin (DIG) hybridization system (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's recommendations.

Screening of transformants for OTA-negative mutants

A total of 600 transformants were screened for OTA production on coconut-agar medium (Heenan et al. 1998). Each transformant and the wild-type strain were inoculated on coconut milk agar and incubated at 28°C for 6 days. The plates were observed under UV light and transformants without a blue fluorescent halo were selected for a secondary screening using the methodology described by Bragulat et al. (2001). Briefly, the isolates were three point inoculated into Yeast Extract Sucrose Agar (YES agar) and incubated at 25°C for 7 days. Three agar plugs were removed from the central area of the colony, weighed and introduced into a small vial. A volume of 0.5 ml of methanol was added to the vial and, after 60 minutes, the extracts were filtered (Millex-Millipore, Massachusetts, USA) and injected into the HPLC system. The HPLC equipment used was a Shimadzu 10VP system (Shimadzu, Japan) with a fluorescence detector, set at 333 nm excitation and 477 nm emission. The HPLC was fitted with a Shimadzu CLC G-ODS (4 x 10mm) guard column and Shimadzu Shimpack CLC-ODS (4.6 x 250 mm) column. The mobile phase was methanol:acetonitrile:water:acetic acid (35:35:29:10) and the flow rate was 0.8ml/min. An ochratoxin A standard (Sigma Chemical, St Louis, USA) was used for the construction of the 5 point calibration curve, peak areas versus mass (ng). The OTA concentration in the sample extract was determined by interpolation of resulting peak areas from the calibration graph.

TAIL-PCR and DNA sequencing

Genomic DNA from two mutants was used as template in TAIL-PCR reactions. The degenerated primers AD2, and the RB-specific primers used are shown in Table 1. The reaction conditions and thermal cycling settings were identical to those used

by Combier et al. (2003). Three rounds of amplifications were performed (PTC 100 thermal cycler, MJ Research), and secondary and tertiary PCR were analyzed by electrophoresis (1.5 % agarose gel). The product resulting from the tertiary PCR was c.a. 100 bp shorter than ones obtained after the secondary PCR were excised from the gel and purified using CONCERT™ Rapid Gel Extraction System (Gibco BRL, Germany, US, UK). The resulting DNA was sequenced using the DYEnamic™ ET dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) on MegaBACE 1000. Sequence comparison was performed using BLAST tools available on the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), and TIGR website (<http://tigrblast.tigr.org>).

Results and discussion

Untransformed *A. westerdijkiae* were initially tested for their ability to grow on agar plates containing M-100 medium in the presence of various hygromycin B concentrations. Growth was totally inhibited on plates containing at least 150 mg.ml⁻¹ Hyg B (minimal inhibitory concentration), therefore 200 mg.ml⁻¹ Hyg B was used for selecting Hyg B-resistant colonies in all the subsequent transformation experiments. Co-cultivation of *A. westerdijkiae* with *A. tumefaciens* harbouring the pPK2 binary vector resulted in hygromycin-resistant colonies seven days after the transference to the selection medium (Fig. 1). In the absence of acetosyringone (AS) during co-cultivation, no resistant colony was found, as previously reported for other fungi species (de Groot et al. 1998; Rho et al. 2001; Combier et al. 2003).

Two conditions of genetic transformation were evaluated: growing *A. tumefaciens* cells in induction medium containing (IM+AS condition) or not acetosyringone (IM-AS condition). Acetosyringone is an inducer of the *vir* operon in

Agrobacterium cells, and serves as an inducer agent for *in vitro* transformation. Although the presence of AS in the IM is not essential to grow bacterial cells prior to co-cultivation, previous reports showed that its addition improves transformation frequencies in *Aspergillus carbonarius*, *Beauveria bassiana*, *Fusarium oxysporum*, and *Magnaporthe grisea* (Morioka et al. 2006; Leclerque et al. 2004; Mullins et al. 2001; Rho et al. 2001). On the other hand, no difference in the *Colletotrichum trifolii* transformation frequency was observed when AS was omitted during *Agrobacterium* pre-culture (Takahara et al. 2004). In our work it was found that the addition of AS in *Agrobacterium* pre-culture slightly increased the number of *A. westerdijkiae* transformants (Table 2). The mean numbers of resistant colonies after growing *A. tumefaciens* cells onto IM+AS were 20.33 ± 7.5 and 35.66 ± 10.26 transformants per 10^5 and 10^6 target conidia, respectively. In the IM-AS condition, the numbers of resistant colonies were lower, i.e. $10,66 \pm 2.08$ and $25,33 \pm 11.01$ transformants per 10^5 and 10^6 target conidia, respectively.

The stability of the hygromycin B-resistance gene of sixteen putative transformants was examined after 10 cultivation rounds onto non-selective media. 100% of the transformants analysed retained the hygromycin-resistant phenotype. All of them grew well on plates containing up to 1200 mg.ml^{-1} Hyg B.

Thirty hygromycin B-resistant colonies randomly selected were confirmed as transformants by using Polymerase Chain Reaction. The results showed that DNA fragments with expected size (c.a. 600pb) could be amplified from DNA of all putative transformants tested, but not from the original strain of *A. westerdijkiae*.

The Southern analysis of these thirty transformants showed that *hph* gene was randomly integrated into the genome of *A. westerdijkiae* (Fig 2 shows 10 of them). A single *hph* integration was found for most of *A. westerdijkiae* transformants analysed

in both transformation conditions, e.g. 71% and 73% of the transformants obtained with addition or not of AS to the *Agrobacterium* pre-culture, respectively. This kind of treatment has been reported to result in either a decrease or an increase in single-copy T-DNA integration (Combier et al. 2003; Mullins et al. 2001; Rho et al. 2001; Morioka et al. 2006).

The heterologous integration of transforming DNA may be used as a random process of gene disruption (insertional mutagenesis). The mutated gene is tagged by transforming DNA and can be subsequently identified and cloned. The knowledge of the number of nuclei per conidia is of considerable use for designing mutant screening process. The loss-of-function allele is usually recessive and if it is present together with the wild allele, the mutant phenotype will be not recognized. Because of this fact, nucleus number per *A. westerdijkiae* strain ITAL 142 conidium was assessed by Giemsa staining. Fortunately, 100 % of *A. westerdijkiae* conidia strain ITAL 142 was mononucleated. This feature prevents the heterokaryon formation of transformed and untransformed nuclei, thus making simple to screen for transgene-associated phenotypes.

Among six hundred transformants growing in CM medium, some 5% showed altered morphology. This result showed that *Agrobacterium*-mediated transformation is a powerful mutagen for *A. westerdijkiae*. Examples for deviating phenotype observed in our library transformants are shown in Fig. 3.

The same six hundred transformants were screened for OTA production on coconut milk agar medium. Five putative ochratoxin-defective mutants were identified based on the absence of a blue halo around the colony (Fig. 4). The ability of these five putative mutants to produce ochratoxin A was quantified by HPLC. This led to the identification of two mutants T10 and TS18 with consistently reduced ochratoxin A

production (Table 3). Recently, Karolewicz and Geisen (2005) cloned a 10Kb genomic DNA region of *Penicillium nordicum* carrying two genes (*otapksPN* and *npsPN*) involved in ochratoxin A biosynthesis. The inactivation of *otapksPN* by gene disruption did not lead to transformants completely unable to produce ochratoxin, they still produce scarce amounts of OTA compared to high amounts produced by wild type.

Both of mutants with reduced ochratoxin A production (mutants T10 and TS18) had also reduced sporulation capacity. Several authors already showed some correlation between sporulation and other secondary metabolites (Scheidegger and Payne, 2003; Karolewicz and Geisen, 2005; Yu and Adams, 1996, Kale et al, 1994, Hicks et al. 1997).

To test whether T-DNA insertion provides a suitable tool for gene identification in *A. westerdijkiae* we investigated the two mutants that produced minor amounts of ochratoxin A (T-10 and TS18). By using the thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR) (Liu et al. 1995) methodology we successfully amplified junction's region between mutant genomic DNA and the T-DNA right border (Fig. 5). The sequence obtained from TS18 had homology (E value 1.3 e-45) to a monooxygenase putative from *A. fumigatus*. For the transformant T10 it was found a jumonji family of transcription factor with a C4HC3 zinc-finger-like motif that has homology with *A. fumigatus* (E value 5.7e-10).

Biosynthetic pathways involved in secondary metabolism are commonly associated with gene cluster in filamentous fungi. The aflatoxin cluster (*afI*) in *A. parasiticus* and *A. flavus* includes 21 genes that was verified or predicted to encode aflatoxin biosynthetic enzymes, including fatty acid synthases, a polyketide synthase, monooxygenases, reductases, dehydrogenases, methyltransferases, an esterase, a

desaturase, and an oxidase. In addition, one gene (*afIR*) in aflatoxin cluster encodes a binuclear zinc cluster (ZN (II)₂ Cys₆) transcription regulating transcription of the aflatoxin biosynthetic genes (Yu and Keller, 2005 and references therein). More work is in progress to verify the relation of the genes here identified to the production of ochratoxin A from *A. westerdijkiae*.

In summary, this study described for the first time the *Agrobacterium*-mediated transformation of *A. westerdijkiae* and the generation of mutants with reduced ochratoxin A production.

Acknowledgements

This work was supported by grants and fellowships from the Brazilian institutions: Fundação Araucária, Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).

References

- Azevedo A.C.S., Furlaneto M.C., Sosa-Gomez D.R. and Fungaro M.H.P. 2000. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) isolates. *Sci. Agr.* 57: 729-732.
- Bragulat M.R., Abarca M.L. and Cabañes F.J. 2001. A screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 139-144.
- Bundock P., Dulk-Ras A. Den, Beijersbergen A., and Hooykaas P.J.J. 1995. Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 3206-3214.
- Combiér J.P., Melayah D., Raffier C., Gay G. and Marmeisse R. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 220: 141–148.
- Covert S.F., Kapoor P., Lee M., Briley A. and Nairn C.J. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycol. Res.* 105: 259-264.
- De Groot M.J.A., Bundock P., Hooykaas P.J.J. and Beijersbergen A.G.M. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.* 16: 839– 842.

- Frisvad C. J., Frank J. M., Houbraken J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A. and Samson, R. A. 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies Mycol* 50: 23-43.
- Fungaro M.H.H., Magnani, M., Vilas-Boas, L.A., Vissotto, P.C., Furlaneto, M.C., Vieira, M.L.C. and Taniwaki, M. H. 2004. Genetic relationships among Brazilian strains of *Aspergillus ochraceus* based on RAPD and ITS sequences. *Can. J. Microbiol.* 50: 985-988.
- Heenan C.N., Shaw K.J. and Pitt J.L. 1998. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *J. Food Mycol.* 1: 63-72.
- Hicks J.K., Yu J-H., Keller N.P. and Adams T.H. 1997. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G α protein-dependent signalling pathway. *EMBO J.* 16: 4916-4923.
- Hooykaas P.J.J., Roobol C. and Schilperoot R.A. 1979. Regulation of the transfer of Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Gen. Microbiol.* 110: 99-109.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), J. I. 1993. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances. Food Items and Constituents, heterocyclic Amines and Mycotoxins (pp. 489-521). France, Lyon.

- Karolewicz A. and 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.
- Kale S.P., Bhatnagar D. and Bennet J.W. 1994. Isolation and characterization of morphological variants of *Aspergillus parasiticus*. *Mycol. Res.* 98: 645-652.
- Leclerque A., Wan H., Abschütz A., Chen S., Mitina G.V., Zimmermann G. and Schairer H.U. 2004. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Curr. Genet.* 45: 111-119.
- Li M. Gong X., Zheng J., Jiang D., Fu Y. and Hou M. 2005. Transformation of *Coniothyrium minitans*, a parasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, with *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 243: 323-329.
- Liu Y-G., Mitsukawa N., Oosumi T. and Whittier R.F. 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* 8: 457-463.
- Michielse C.B., Hooykaas P.J.J., van den Hondel C.A.M.J.J. and Ram A.F.J. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr. Genet.* 48: 1-17.
- Morioka L.R., Furlaneto, M.C., Bogas A.C., Pompermayer, O.S., Duarte R.T., Carneiro M.L., Watanabe M.A.E. and Fungaro M.H.P. 2006. Efficient genetic

transformation system for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*.
Curr. Microbiol.: *in press*.

Moss M.O. 1996. Mode of formation of ochratoxin. Food Addit. Contam. 13: 5-9.

Mullins E.D, Chen X., Romaine P., Raina R., Geiser D.M. and Kang S. 2001.
Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool
for insertional mutagenesis and gene transfer. Phytopathol. 91: 173–180.

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

Pontecorvo G., Roper J.A., Hemons L.M., MacDonald K.D. and Bufton, A.W.J. 1953.
The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet. 5: 141-238.

Radhamony R.N., Prasad A.M. and Srinivasan R. 2005. T-DNA insertional
mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomes. Electronic Journal of
Biotechnology [on line] 15 April 2005, vol 8, n 1. Available from: [http://www.
ejbiotechnology.info/content/vol8/issue1/index.html](http://www.ejbiotechnology.info/content/vol8/issue1/index.html).

Rho H.S., Kang S. and Lee Y.H. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated
transformation of the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. Mol. Cells 12:
407-411.

- Rogers C.W., Challen M.P., Green J.R. and Whipps J.M. 2004. Use of REMI and *Agrobacterium*-mediated transformation to identified pathogenicity mutants of the biocontrol fungus, *Coniothyrium minitans*. FEMS Microbiol. Lett. 241: 207-214.
- Sambrook J. and Russel D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Scheidegger K.A. and Payne G.A. 2003. Unlocking the secrets behind secondary metabolism: A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. J. Toxicol.-Toxin Rev. 22: 423-459.
- Stevens R (1974) Mycology Guidebook University of Washington Press, Seattle
- Takahara H., Tsuji G., Kubo Y., Yamamoto M., Toyoda K., Inagaki Y., Ichinose Y. and Shiraishi T. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii*. J Gen. Plant Pathol. 70: 93-96.
- Tanaka Y., Murata N. and Kato H. 1979. Behaviour of nuclei and chromosomes during ascus development in the matting between either rice–strain or weeping lovegrass – strain and ragi – strain of *Pyricularia*. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 45: 182-191.

- Taniwaki M.H., Pitt J.I., Teixeira A.A. and Lamanaka 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.
- Tsuji G., Fujii S., Fujihara N., Hirose C., Tsuge S., Shiraishi T. and Kubo Y. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 230-239.
- Yu J-H. and Keller N. 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 437-458.
- Yu J-H., Wieses J. and Adams T.H. 1996. The *Aspergillus* FlbA domains protein antagonizes and allows development. *EMBO J.* 15: 5184-5190.

Table 1. Sequences and characteristics of the primers used for TAIL-PCR (Combier et al. 2003).

Primer name	Nucleotide sequence (5'to 3')	Melting temperature (°C)
RB1	GGCACTGGCCGTCGTTTTACAAC	64
RB2	AACGTCGTGACTGGGAAAACCCT	62
RB3	CCCTTCCCAACAGTTGCGCA	61
AD2	NGTCGASWGANAWGAA	47

W=A or T; N=A, T, C or G; S= G or C.

Table 2. Number of hygromycin-resistant *Aspergillus westerdijkiae* colonies obtained after *Agrobacterium*-mediated transformation. Acetosyringone added (IM+AS condition) or not (IM-AS condition) in pre-treating of bacterial cells prior to co-cultivation. Results represent three independent experiments.

Number of Hyg B colonies obtained after co-cultivation with acetosyringone.				
Condition	Conidia concentration	Three experiments.		
		I	II	III
IM-AS	10 ⁵	10	9	13
IM-AS	10 ⁶	36	26	14
IM+AS	10 ⁵	16	16	29
IM+AS	10 ⁶	47	27	33

Table 3. Ochratoxin A levels ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) from five mutants and the wild-type strain.

Strains	Ochratoxin A ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	% relative
Wild-type strain	120.7	100
T10 mutant	1.3	1.1
TS18 mutant	3.2	2.6
T22 mutant	21.6	17.9
T62 mutant	23.6	19.5
T74 mutant	39.0	32.3

Figure Legends

Figure 1. Appearance of typical *A. westerdijkiae* transformation plates after co-culture with *Agrobacterium tumefaciens* for 36h, and growth on M-100 + 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ hygromycin B + 150 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ mefoxin for 5 days.

Figure 2. Southern analysis of 10 random selected *Aspergillus westerdijkiae* transformants. Genomic DNA was restricted with *Sst*I and electrophoresed on a 0.8% agarose gel. For hybridization a 0.6 kb fragment of *hph* gene labelled with digoxigenin was used. wt means: untransformed wild-type strain; c⁺ means: positive control, plasmid pPK2.

Figure 3. Wild type strain, and mutants having different morphological characteristics. T10 and TS18 mutants had significantly reduced ochratoxin A production in comparison to wild-type strain.

Figure 4. Screening for fluorescence (OTA production) on coconut milk agar. (a) wild-type strain; (b) mutant defective for ochratoxin production.

Figure 5. Sequences of the T-DNA insertion junctions from T10 and TS18 mutants. The top line shows part of the T-DNA sequence from pPK2. Upper case letters denote nucleotides of the T-DNA border. Flanking genomic sequences are indicated by italics. Dots represent truncations of the T-DNA ends.



Figure 1

C+ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 wt

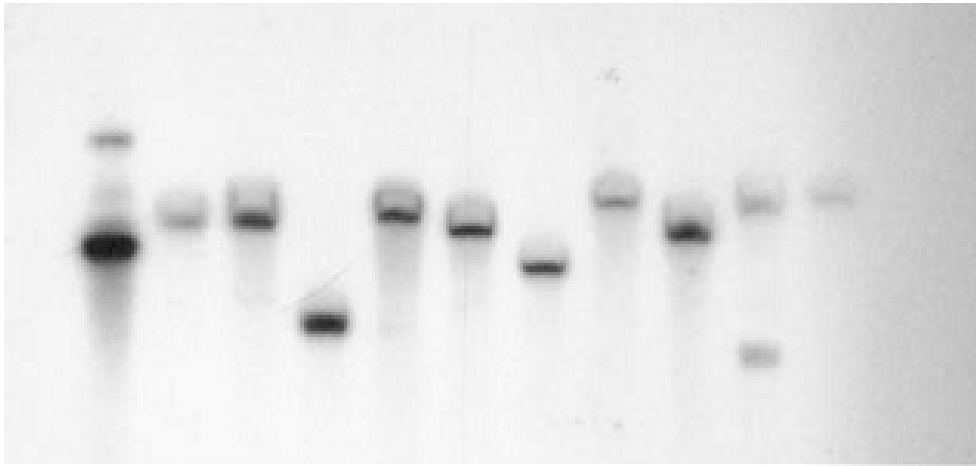


Figure 2

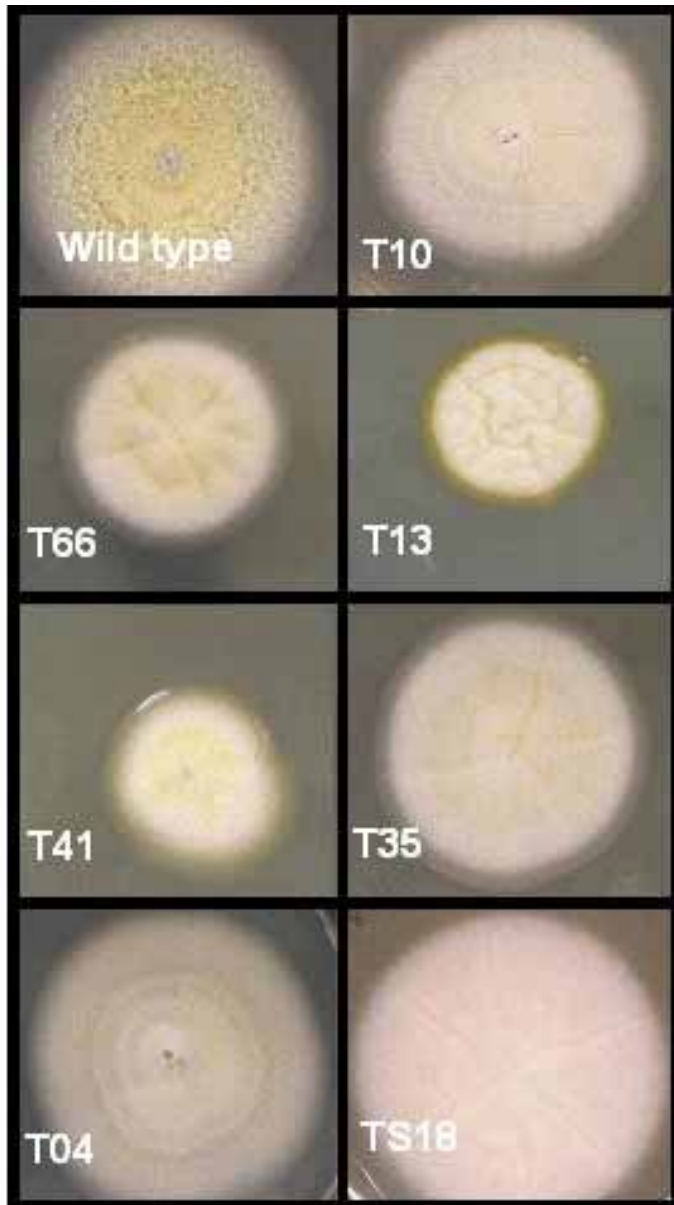


Figure 3

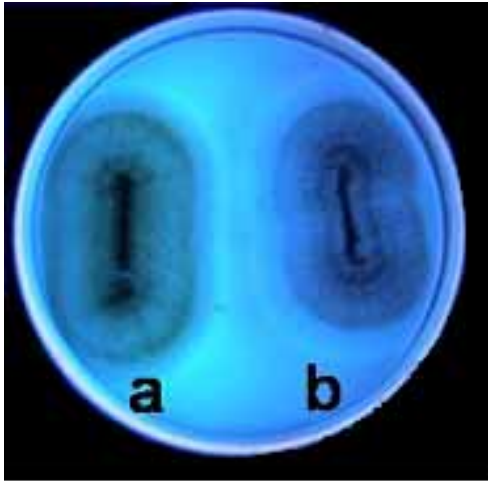


Figure 4

Transformants	Plasmid T-DNA sequence	Fungal sequence
	cagttaaactatcagtgt TGACAGGATATATTGGCGGGTAAAC	
T10	cagttaaactatcagtgt TGA.....	<i>tagacatcttactcggcaggatgttact</i>
TS18	cagttaaactatcagtgt TGA.....	<i>tcctaccgaagaggagttcagatcgg</i>

Figure 5

6 CONCLUSÕES

❖ A transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* é uma eficiente metodologia para a transformação do fungo ocratoxigêncio *Aspergillus westerdijkae*. Permite a obtenção de um grande número de transformantes, a maioria deles com integrações únicas do T-DNA, e estáveis mitoticamente.

❖ A transformação genética mediada por *A. tumefaciens* é uma eficiente metodologia para a geração de mutantes insercionais de *A. westerdijkae*. Mutantes com significativa redução na produção de ocratoxina A podem ser selecionados em frequência relativamente alta (0,33%), o que suporta a idéia de que se trata de uma estratégia interessante para a identificação de genes envolvidos na biossíntese ou regulação desta micotoxina em *A. westerdijkae*;

❖ Uma monooxygenase e um fator de transcrição da família jumonji parecem estar envolvidos na biossíntese e/ou regulação da biossíntese de ocratoxina A em *A. westerdijkae*, porém estudos adicionais são necessários para comprovar esta evidência preliminar.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOZA-GOMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina Hyphomycetes*) isolates. **Scientia Agricola**, 57: 729-732, 2000.
- ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, 64: 903-906, 2001.
- ABUODEH, R. O.; ORBACH, M. J.; MANDEL, M. A.; DAS, A.; GALGIANE, J. N. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. **The Journal of Infectious Diseases**, 181: 2106-2110, 2000.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 635p. 1997.
- AKAMATSU, H.; ITOH, Y.; KODAMA, M.; OTANI, H.; KOHMOTO, K. AAL-toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. **Phytopathology**, 87: 967-972, 1997.
- AMEZQUETA, S.; GONZALES-PENAS, E.; MURILLO, M.; CERAIN, A. L. Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans: effect of shelling. **Food Additives and Contaminants**, 22: 590-596, 2005.
- AMEY, R. C.; ATHEY-POLLARD, A.; BURNS, C.; MILLS, P. R.; BAILEY, A.; FOSTER, G. D. PEG-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. **Mycological Research**, 106: 4-11, 2002.
- ARMALEO, D.; YE, G. N.; KLEIN, T. M.; SHARK, K. B.; SANFORD, J. C.; JOHNSTON, S. A. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Current Genetics**, 17(2): 97-103, 1990.
- BAILEY, A. M.; MENA, G. L.; HERRERA-ESTRELA, L. Transformation of four pathogenic *Phytophthora* spp. by microprojectile bombardment on intact mycelia. **Current Genetics**, 23: 42-46, 1993.
- BALZERGUE, S.; DUBREUCQ, B.; CHAUVIN, S.; Le CLAINCHE, I.; Le BOULAIRE, F.; de ROSE, R.; SAMSON, F.; BIAUDET, V.; LECHARNY, A.; CRUAUD, C.; WEISSENBACH, J.; CABOCHE, M.; LEPINIEC, L. Improved PCR-walking for large-scale isolation of plant T-DNA borders. **Biotechniques**, 30: 496-498, 2001.

BATTILANI, P. & PIETRI, A. Ochratoxin A in grapes and wine. **European Journal of Plant Pathology**, 108: 639-643, 2002.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **Internacional Journal of Food Microbiology**, 2666: 1-8, 2002.

BAYMAN, P.; BAKER, J. L.; DOSTER, M. A.; MICHAILIDES, T. J.; MAHONEY, N. E. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 68 (5): 2326-2329, 2002.

BELLÍ, N.; MARÍN, S.; DUAIGÜES, A.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Ochratoxin A in wines, musts, and grape juices from Spain. **Journal of Science Food Agricultural**, 84: 591-594, 2004.

BENÍCIO, V.; ARAÚJO, E.; SOUTO, F. M. de; BENÍCIO, M. J.; FELISMINO, D. C. Identificação e características culturais de espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de sementes de feijão no Estado da Paraíba. **Fitopatologia Brasileira**, 28: 180-183, 2003.

BEVAN, M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. **Nucleic Acids Research**, 12: 8711-8721, 1984.

BOGO, M. R.; VAINSTEIN, M. H.; ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E.; SCHRANK, A. High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisoplae*. **FEMS Microbiology Letters**, 142: 123-127, 1996.

BOLKER, M.; BOHNERT, H. U.; BRAUN, K. H.; GORL, J.; KAHMANN, R. Tagged pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). **Molecular and General Genetics**, 248: 363-371, 1995.

BORÉM, A. Melhoramento de plantas. Viçosa: UFV, **Imprensa Universitária**, 453, 1998.

BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, 71: 139-144, 2001.

BRANDHORST, T. T.; ROONEY, P. J.; SULLIVAN, T. D.; KLEIN, B. Molecular genetic analysis of *Blastomyces dermatitidis* reveals new insights about pathogenic mechanisms. **International Journal of Medical Microbiology**, 292: 363-371, 2002.

BRASILEIRO, A. C. M. Cultivo e conservação de *Agrobacterium*. **Manual de Transformação Genética de Plantas**, cap. 4: 65-74, 1998.

BRASILEIRO, A. C. M. & LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. **Manual de Transformação Genética de Plantas**, cap. 5: 75-92, 1998.

BROWN, D. H.; J. R.; SLOBODKIN, I. V.; KUMAMOTO, C. A. Stable transformation and regulated expression of an inducible reporter construct in *Candida albicans* using restriction enzyme-mediated integration. **Molecular and General Genetics**, 251: 75-80, 1995.

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

BUNDOCK, P.; den DULK-RAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P. J. J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, 14(13): 3206-3214, 1995.

BUNDOCK, P. & HOOYKAAS, P. J. J. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 93: 15272-15275, 1996.

BUNDOCK, P.; MROCZEK, K.; WINKLER, A. A.; STEENSMA, H. Y.; HOOYKAAS, P. J. J. T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. **Molecular and General Genetics**, 261: 115-121, 1999.

CAMPOY, S.; PEREZ, F.; MARTIN, J. F.; GUTIERREZ, S.; LIRAS, P. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Current Genetics**, 43: 447-452, 2003.

CASE, M. E.; SCHWEIZER, M.; KUSHNER, S. R.; GILES, N. H. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, 76: 5259- 5263, 1979.

CHADHA, B. S. & GARCHA, H. S. Mixed cultivation of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus ochraceus* for improved cellulase production. **ACTA Microbiology Hungarica**, 39: 61-67, 1992.

CHEN, K. C.; YIN, W. S.; TIU, C.; HOUNG, J. Y. 11 alpha-hydroxylation of progesterone using modified alginate-immobilized cells. **Enzyme Microbiology Technology**, 16: 551-555, 1994.

CIEGLER, A. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid y members of the *Aspergillus ochraceus* group. **Canadian Journal of Microbiology**, 18: 63-636, 1972.

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**, 220: 141-148, 2003.

COTTAGE, A.; YANG, A.; MAUNDERS, H.; de LACY, R. C.; RAMSAY, N. A. Identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions by PCR walking. **Plant Molecular Biology Reporter**, 19: 321-327, 2001.

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

DABOUSSI, M. J.; DJEBALLI, A.; GERLINGER, C.; BLAISEAU, P. L.; BOUVIER, I.; CASSAN, M.; LEBRUM, M. H.; PARISOT, D.; BRYGOO, Y. Transformation of seven species of filamentous fungi using the nitrate reductase gene of *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics**, 15: 453-456, 1989.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; CHIACCHIERA, S. M.; PALACIO, G.; ROSA, C. A. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, 19: 1065-1072, 2002.

DEGEFU, Y. & HANIF, M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Helminthosporium turcicum*, the maize leaf-blight fungus. **Archives of Microbiology**, 180: 279-284, 2003.

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

De GUZMAN, F. S.; BRUSS, D. R.; RIPPENTROP, J. M.; GLOEB, K. B.; GLOEB, J. B. Ochrindoles A-D: new bis-indolyl benzenoids from the sclerotia of *Aspergillus ochraceus* NRRL 3519. **Journal of Natural Products**, 57(5): 634-639, 1994.

DOBINSON, K. F.; GRANT, S. J.; KANG, S. Cloning and targeted disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. **Current Genetics**, 45: 104-110, 2003.

FINCHAM, J. R. S. Transformation in fungi. **Microbiology Review**, 53: 148-170, 1989.

FITZGERALD, A. M.; MUDGE, A. M.; GLEAVE, A. P.; PLUMMER, K. M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological Research**, 107(7): 803-810, 2003.

FLOWERS, J. L.; VAILLANCOURT L. J. Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of *Colltotrichum graminicola*. **Current Genetics**, 48(6): 380-388, 2005.

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

FUNGARO, M. H. P.; RECH, E.; MUHLEN, G. S.; VAINSTEIN, M. H.; PASCON, R. C.; de QUEIROZ, M. V.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. **FEMS Microbiology Letters**, 1: 293-298, 1995.

FUNGARO, M. H. P.; MAGNANI, M.; VILAS-BOAS, L. A.; VISSOTTO, P. C.; FURLANETO, M. C.; VIEIRA, M. L. C.; TANIWAKI, M. H. Genetic relationships among Brazilian strains of *Aspergillus ochraceus* based on RAPD and ITS sequences. **Canadian Journal of Microbiology**, 50: 985-988, 2004.

GAO, X. X. & YANG, Q. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Chaetomium globosum* and its T-DNA insertional mutagenesis. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, 45(1): 129-131, 2005.

GARDINER, D. M. & HOWLETT, B. J. Negative selection using thymidine kinase increases the efficiency of recovery of transformants with targeted genes in the filamentous fungus *Leptosphaeria maculans*. **Current Genetics**, 45: 249-255, 2004.

GARDINER, D. M.; COZIENSEN, A. J.; WILSON, L. M.; SOLEDADE, M.; PEDRAS, C.; HOWLETT, B. J. The sirodesmin biosynthetic gene cluster of the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. **Molecular Microbiology**, 53: 1307-1318, 2004.

GODIO, R. P.; FOUQUES, R.; GUDIÑA, E. J.; MARTÍN, J. F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the antitumor clavarinic acid-producing basidiomycete *Hypholoma sublateritium*. **Current Genetics**, 46(5): 287-94, 2004.

GRANADO, J. D.; KERTESZ-CHALOUPOKOVA, K.; AEBI, M.; KUES, U. Restriction enzyme-mediated DNA integration in *Coprinus cinereus*. **Molecular and General Genetics**, 256: 28-36, 1997.

GRIMALDI, B.; de RAAF, M. A.; FILETICI, P.; OTTONELLO, S.; BALLARIO, P. *Agrobacterium*-mediated gene transfer and enhanced green fluorescent protein visualization in the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*: a first step towards truffle genetics. **Current Genetics**, 48: 69-74, 2005.

GRITZ, L. & DAVIES, J. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, 25(2-3):179-88, 1983.

HAGGBLOM, P. Production of ochratoxin A in barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum*: effect of fungal growth, time, temperature, and inoculum size. **Applied and Environmental Microbiology**, 43: 1205-1207, 1982.

HAJDUKIEWICZ, P.; SVAB, Z.; MALIGA, P. The small versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. **Plant Molecular Biology**, 25: 989-994, 1994.

HANIF, M.; PARDO, A. G.; GORFER, M.; RAUDASKOSKI, M. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. **Current Genetics**, 41: 183-188, 2002.

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

HOFFMAN, B. & BREUIL, C. Disruption of the subtilase gene, *albin1*, in *Ophiostoma piliferum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 70: 3898-3903, 2004.

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

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

International Agency for Research on Cancer (IARC), J. I. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances. Food Items and Constituents, heterocyclic Amines and Mycotoxins.** France, Lyon, 489-521, 1993.

KADO, C. I. Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. **Critical Review in Plant Sciences**, 10: 1-32, 1991.

KANG, S. & METZENBERG, R. L. Insertional mutagenesis in *Neurospora crassa*: Cloning and molecular analysis of the preg+ gene controlling the activity of the transcriptional activator NUC-1. **Genetics**, 133: 193-202, 1993.

KASTER, K. R.; BURGETT, S. G.; RAO, R. N.; INGOLIA, T. D. Analysis of a bacterial hygromycin B resistance gene by transcriptional and translational fusions and by DNA sequencing . **Nucleic Acids Research**, 11(19): 6895-911, 1983.

KELLNER, E. M.; ORSBORN, K. I.; SIEGEL, E. M.; MENDEL, M. A.; ORBACH, M. J.; GALGIANI, J. N. *Coccidiodes posadasii* contains a single 1,3-beta-glucan synthase gene that appears to be essential for growth. **Eukaryot Cell**, 4: 111-120, 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**, 42(6): 483-92 ,2005.

KUSPA, A. & LOOMIS, W. F. Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 89: 8803-8807, 1992.

KUSPA, A. & LOOMIS, W. F. REMI-RFLP mapping in the *Dictyostelium* genome. **Genetics**, 138: 665-674, 1994.

LACORTE, C. & MANSUR, E. Transferência de genes através da *Agrobacterium tumefaciens*: avaliação da compatibilidade patógeno-hospedeiro. **Boletim da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas**, 21: 2-7,1993.

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. **Applied and Environmental Microbiology**, 67: 3630-3635, 2001.

LEAL C. V.; MONTES B. A.; MESA A. C.; RUA A. L.; CORREDOR M.; RESTREPO A., MCEWEN J.G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, 42(4): 391-395, 2004.

LECLERQUE, A.; WAN, H.; ABSCHÜTZ, A.; CHEN, S.; MITINA, G.V.; ZIMMERMANN, G.; SCHAIRER, H.U. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Current Genetics** 45: 11-119, 2004.

LEE, H. B. & MAGAN, N. Impact of environmental and interspecific interactions between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, 61: 11-16, 2000.

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

LIMA, I. G. P.; DUARTE, R.T.D.; FURLANETO, L.; BARONI, C.H.; FUNGARO, M.H.P.; FURLANETO, M. Transformation of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. **Canadian Journal of Microbiology**, (submetido), 2005.

LIU, Y. G.; MITSUKAWA, N.; OOSUMI, T.; WHITTIER, R. F. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. **The Plant Journal**, 8: 457-463, 1995.

LOPPNAU, P.; TANGUAY, P.; BREUIL, C. Isolation and disruption of the melanin pathway polyketide synthase gene of the softwood deep stain fungus *Ceratocystis resinifera*. **Fungal Genetics and Biology**, 41: 33-41, 2004.

LU, S.; LYNGHOLM, L.; YANG, G.; BRONSON, C.; YODER, O. C.; TURGEN B. G. Tagged mutations at the *Tox 1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 91: 12649-12656, 1994.

MACDONALD, S. J.; ANDERSON, S.; BRERETON, P.; WOOD, R. Determination of ochratoxin A in currants, raisins, sultanas, mixed dried fruit, and dried figs by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, 86: 1164-1171, 2003.

MALONEK, S. & MEINHARDT, F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morganii*. **Current Genetics**, 40: 152-155, 2001.

MANTLE, P. G. & CHOW, A. M. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**, 56: 105-109, 2000.

MANTLE, P. G. Risk assessment and the importance of ochratoxins. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 50: 143-146, 2002.

McCLELLAND, C. M.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. High frequency transformation of *Cryptococcus neomorfans* and *Cryptococcus gattii* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Fungal Genetics and Biology**, 42: 904-913, 2005.

MEYER, V.; MUELLER, D.; STROWIG, T.; STAHL, U. Comparasion of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. **Current Genetics**, 43: 371-377, 2003.

MICHIELSE, C. B.; ARENTSHORST, M.; RAM, A. F. J.; van den HONDEL, C. A. M. J. J. *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. **Fungal Genetics Biology**, 42: 9-19, 2005a.

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**, 48: 1-17, 2005b.

MICHIELSE, C. B.; RAM, A. F. J.; HOOYKAAS, P. J. J.; van der HONDEL, C. A. M. J. J. Role of bacterial virulence proteins in *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus awamori*. **Fungal Genetics and Biology**, 41: 571-578, 2004a.

MICHIELSE, C. B.; SALIM, K.; RAGAS, P.; RAM, A. F. J.; KUDLA, B.; JARRY, B.; PUNT, P. J.; van der HONDEL, C. A. M. J. J. Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Molecular genetics and Genomics**, 271: 499-510, 2004b.

MONFORT, A.; CORDERO, L.; MAICAS, S.; POLAINA, J. Transformation of *Mucor miehei* results in plasmid deletion and phenotypic instability. **FEMS Microbiology Letters**, 224: 101-106, 2003.

MORIOKA L.R., FURLANETO, M.C., BOGAS A.C., POMPERMAYER, O.S., DUARTE R.T., CARNEIRO M.L., WATANABE M.A.E. AND FUNGARO M.H.P. Efficient genetic transformation system for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. **Current. Microbiology**, 2006, *in press*.

MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin. **Food Additives and Contaminants**, 13: 5-9, 1996.

MULLINS, E. D.; CHEN, X.; ROMAINE, P.; RAINA, R.; GEISER, D. M.; KANG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, 91(2): 173-180, 2001.

MULLINS, E. D. & KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular & Molecular Life Sciences**, 58: 2043-2052, 2001.

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

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**, 15: 531-535, 2004.

PARDO, A. G.; HANIF, M.; RAUDASKOSKI, M.; GORFER, M. Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Mycology Research**, 106: 132-137, 2002.

PARDO, E.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. **International Journal of Food Microbiology**, 95: 79-88, 2004.

PARDO, A. G.; KEMPPAINEN, M.; VALDEMOROS, D.; DUPLESSIS, S.; MARTIN, F.; TAGU, D. T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. **Revista de la Asociacion Argentina de Microbiologia**, 37(2): 69-72, 2005.

PARK, S. M. & KIM, D. K. Transformation of a filamentous fungus *Cryphonectria parasitica* using *Agrobacterium tumefaciens*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 9: 217-222, 2004.

POHLAND, A. E. Mycotoxins in review. **Food Additives and Contaminants**, 10: 17-28, 1993.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MacDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, 5: 141-148, 1953.

QUEENER, S. W.; INGOLIA, T. D.; SKATRUD, P. L.; CHAPMAN, J. L.; KASTER, K. R. A system for genetic transformation of *Cephalosporium acremonium*. In: Schlessinger, D. (Ed.), **Microbiology, American Society for Microbiology**. 468-472, 1985.

RAPER, K. B. & FENNEL, D. I. The genus *Aspergillus*. **Williams e Wilkins**, Baltimore, 1965.

RHO, H. S.; KANG, S.; LEE, Y. H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. **Molecules and Cells**, 12: 407-411, 2001.

ROBBERS, J. E.; HONG, S.; TUIITE, J.; CARLTON, W. W. Production of xanthomegnin and viomellein by species of *Aspergillus* correlated with mycotoxicosis produced in mice. **Applied and Environmental Microbiology**, 36: 819-823, 1978.

RODRÍGUES-TOVAR, A. V.; RUIZ-MEDRANO, R.; HERRERA-MARTÍNEZ, A.; BARRERA-FIGUEROA, B. E.; HIDALGO-LARA, M. E.; REYES-MÁRQUEZ, B. E.; CABRERA-PONCE, J. L.; VALDÉZ, M.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B. Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Journal of Microbiological Methods**, 63(1): 45-54, 2005.

ROGERS, C. W.; CHALLEN, M. P.; GREEN, J. R.; WHIPPS, J. M. Use of REMI and *Agrobacterium*-mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus, *Coniothyrium minitans*. **FEMS Microbiology Letters**, 241: 207-214, 2004.

ROGERS, S. G.; HORSH, R. B.; FRALEY, R. T. Gene transfer I plants: production of transformed plants using Ti plasmid vectors. In: WEISSBACH, A.; WEISSBACH, H., ed. **Plant molecular biology**, Academic Press, 627-640. (Methods in Enzymology, 118), 1986.

ROLLAND, S.; JOBIC, C.; FEVRE, M.; BRUEL, C. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidi-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. **Current Genetics**, 44: 164-171, 2003.

RUIZ-DIEZ, B. A review – Strategies for the transformation of filamentous fungi. **Journal of Applied Microbiology**, 92:189-195, 2002.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particle Science Technology**, 5: 27-37, 1987.

SAVKA, M.A., BLACK, R.C., BINNS, A.N., FARRAND, S.K. Translocation and exudation of tumor metabolites in crown galled plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 9 (4): 310-313, 1996.

SCHIESTL, R. H. & PETES, T. D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy Science**, 88: 7585-7589, 1991.

SCHIMIDT, H.; EHRMANN, M.; VOGEL, R. F.; TANIWAKI, M. H.; NIESSEN, L. Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR- Primers based on AFLP. **System Applied Microbiology**, 26: 138-146, 2003.

SCOTT, P. M. & KANHERE, S. R. Determination of ochratoxin A in beer. **Food Additives and Contaminants**, 12: 591-598, 1995.

SEONG, K.; HOU, Z.; MILES TRACY, H.; KISTLER, C; XU, J. R. Random insertional mutagenesis identifies genes associated with virulence in the wheat scab fungus *Fusarium graminearum*. **Phytopathology**, 95 (7): 744-750, 2005.

SHI, Z.; CHRISTIAN, D.; LEUNG, H. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme mediated integration of plasmid DNA. **Phytopathology**, 85: 329-333, 1995.

SHOTWELL, O. L.; GOULDEN, M. L.; HESSELTINE, C. W. Survey of U.S. wheat for ochratoxin and aflatoxin. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, 59(1): 122-4, 1976.

SINGER, T. & BURKE, E. High-throughput TAIL-PCR as a tool to identify DNA flanking insertions. **Methods in Molecular Biology**, 236: 241-272, 2003.

St. LEGER, R. J.; SHIMIZU, S.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Co-transformation of *Metarhizium anisopliae* by electroporation or using gene-gus to produce stable GUS transformants. **FEMS Microbiology Letters**, 131: 289-294, 1995.

STACK, M. E. & MISLIVEC, P. B. Production of xanthomegnin and viomellein by isolates of *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium cyclopium* and *Penicillium viridicatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 36: 552-554, 1978.

STAFFORD, H. A. Crown gall disease and *Agrobacterium tumefaciens*: a study of the history, present knowledge, missing information, and impact on molecular genetics. **Botanical Review**, 66: 101-118, 2000.

STEVENS, R. 1974. **Mycology Guidebook University of Washington Press**, Seattle, 2002.

STOEV, S. D. The role of ochratoxin A as a possible cause of Balkan endemic nephropathy and its risk evaluation. **Veterinary and Human Toxicology**, 40: 352-360, 1998.

SUÁREZ-QUIROZ, M. L.; GONZALES-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, 21: 629-634, 2004.

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**, 71: 1798-1802, 2005.

SULLIVAN, T. D.; ROONEY, P. J.; KLEIN, B. S. *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. **Eukariotic Cell**, 1: 895-905, 2002.

SUN, C.; KONG, Q.; XU, W. Efficient transformation of *Penicillium chrysogenum* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 for cloning of *Vitreoscilla* hemoglobin gene. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, 5 (1): 21-28, 2002.

SWEIGARD, J. A.; CARROLL, A. M.; FARRALL, L.; CHUMLEY, F. G.; VALENT, B. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 11: 404-412, 1998.

TAKAHARA, H.; TSUJI, G.; KUBO, Y.; YAMAMOTO, M.; TOYODA, K.; INAGAKI, Y.; ICHINOSE, Y.; SHIRAISHI, T. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii*. **Journal of General Plant Pathology**, 70: 93-96, 2004.

TANAKA, Y.; MURATA, N.; KATO, H. Behavior of nucleic acid and chromosomes during ascus development in the matting between either rice – strain or weeping lovegrass – strain and ragi – strain of *Pyricularia*. **Annals of Phytopathology Society of Japan**, 45: 182-191, 1979.

TANGUAY, P & BREUIL, C. Transforming the sapstaining fungus *Ophiostoma piceae* with *Agrobacterium tumefaciens*. **Canadian Journal of Microbiology**. 49: 301-304, 2003.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; URBANO, G. R., TEIXEIRA, A. A. LEITÃO, M. F. F. Influence of water activity on mould growth and ochratoxin A production in coffee. **19th ASIC Coffee Conference Trieste**, Italy, 14-18 May, 2001.

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**, 82: 173-179, 2003.

THON M. R.; NUCKLES, E. M.; VAILLANCOURT, L. J. Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 13(12): 1356-1365, 2000.

TSUJI, G.; FUJII, S.; FUJIHARA, N.; HIROSE, C.; TSUGE, S.; SHIRAISHI, T.; KUBO, Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. **Journal of General Plant Pathology**, 69: 230-239, 2003.

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; LEITÃO, M. F. F.; VICENTINI, M. C. Occurrence of ochratoxin A – producing fungi in raw brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, 64 (8): 1226-1230, 2001.

Van ATTIKUM, H.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J. J. Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. **EMBO Journal**, 20: 6550-6558, 2001.

VAN DER MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxin A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus*, Wilh. **Journal of the Chemical Society**, 7083-7088, 1965a.

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

VARGA, J.; KEVEI, E.; TÓTH, B.; KOZAKIEWICZ, Z.; HOEKSTRA, R. F. Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. **Canadian Journal of Microbiology**, 46: 593-599, 2000a.

VARGA, J.; TÓTH, B.; RIGÓ, K.; TÉREN, J.; HOEKSTRA, R. F.; KOZAKIEWICZ, Z. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Circumdati* based on sequences of the internal transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. **Fungal genetics and Biology**, 30: 71-80, 2000b.

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

VIJN, I. & GOVERS, F. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant Pathology**, 4: 459-467, 2003.

ZALACAIN, M.; GONZALEZ, A.; GUERRERO, M. C.; MATTALIANO, R. J.; MALPARTIDA, F. & JIMENEZ, A. Nucleotide sequence of hygromycin B phosphotransferase gene of *Streptomyces hygrosopicus*. **Nucleic Acids Research**, 14: 1565-1581, 1986.

ZAMBRYSKI, P.; HOOS, H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; van MONTAGU, M.; SCHELL, J. Ti Plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **EMBO Journal**, 2: 2143-2150, 1983.

ZEILINGER, S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Current Genetics**, 45: 54-60, 2003.

ZHANG, A.; LU, P.; DAHL-ROSHAK, A. M.; PARESS, P. S.; KENNEDY, S.; TKACZ, J. S.; AN, Z. Efficient disruption of a polyketide synthase gene (*pks1*) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*. **Molecular genetics and Genomics**, 268: 645-655, 2003.

ZIMMERLI, B. & DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, 13: 655-668, 1996.

ZWIERS, L. & de WAARD, M. A. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Current Genetics**, 39: 388-393, 2001.

WALTON, F. J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, 57(5):1381-96, 2005.

WARD, E. R. & BARNES, W. M. Transformation of *Aspergillus awamori* and *A. niger* by electroporation. **Experimental Mycology**, 13: 289-293, 1989.

WEI, L.; GUANGQIN, G.; GUOCHANG, Z. *Agrobacterium*-mediated transformation: state of the art and future prospect. **Chinese Science Bulletin**, 45(17): 1537-1546, 2000.

WELD, R. J.; EADY, C. C.; RIDGWAY, H. J. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Microbiological Methods**, 2005, *in press*.

ANEXOS

ANEXO 1: Soluções e Meios de Cultura

1) Meio mínimo solidificado – MM

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Agar	15,0 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Ajustar o pH para 6,8 utilizando NaOH 1M. Autoclavar o meio e armazenar à temperatura ambiente.

2) Meio completo solidificado – MC

MM sólido acrescido de:

Peptona	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Extrato de Levedura	0,5 g
Solução de Vitaminas	1,0 mL

Ajustar o pH para 6,8 utilizando NaOH 1M. Autoclavar o meio e armazenar à temperatura ambiente.

3) Solução de Vitaminas

Ácido nicotínico	0,1 g
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	0,01 g
Tiamina	0,05 g
Biotina	0,2 mg

Piridoxina	0,05 g
Riboflavina	0,1 g
H ₂ O destilada estéril	100 mL

Ferver a solução em banho-maria (100°C) por 15 minutos. Em seguida, estocar em frasco âmbar a 4°C.

4) Meio Luria-Bertani (LB) líquido

Triptona	10,0 g
Extrato de Levedura	5,0 g
NaCl	5,0 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Ajustar o pH para 7,0 utilizando NaOH 1M. Autoclavar o meio e armazenar à temperatura ambiente.

5) Meio Luria-Bertani (LB) solidificado

LB líquido acrescido de:

Ágar	15,0 g
------	--------

Ajustar o pH para 6,8 utilizando NaOH 1M. Autoclavar o meio e armazenar à temperatura ambiente.

6) Meio de sais (2,5X) - (COVERT et al., 2001)

KH ₂ PO ₄	3,625 g
K ₂ HPO ₄	5,125 g
NaCl	0,375 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,250 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,165 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0062 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,250 g

H ₂ O destilada	1000 mL
----------------------------	---------

Autoclavar o meio e armazenar à temperatura ambiente.

7) Solução KOH 5 M

KOH	7,013 g
H ₂ O destilada	25 mL

Manter a solução em temperatura ambiente.

8) Solução de MES (2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid) 1 M

MES	19,52 g
H ₂ O destilada	80 mL

Ajustar o pH para 5,3 com KOH 5M, e completar o volume para 100 mL. Em seguida, a solução deve ser esterilizada por filtração (filtro de 0,45 µm). Aliquotar a solução em frascos com 9 mL e estocar a -20°C.

9) Acetoseríngona (AS) 10 mM (3',5'-dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone)

Acetoseríngona	0,01962 g
H ₂ O destilada estéril	10 mL

Agitar a mistura por 1 hora. Em seguida, ajustar o pH para 8,0 com KOH 5M. Esterilizar a solução por filtração (filtros de 0,45 µm), alíquotada em frascos com 9 mL e estocada a -20°C.

10) Meio de indução (MI) líquido

Meio de sais (estoque 2,5X)	80,0 mL
Glicose	0,36 g
Glicerol	1 mL

H ₂ O destilada	200 mL
----------------------------	--------

Autoclavar o meio. Após resfriar a 50°C, adicionar 8 mL da solução de MES (2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid) 1M.

11) Meio de indução (MI) solidificado

Meio de sais (estoque 2,5X)	160 mL
Glicose	0,36 g
Glicerol	2 mL
Agar	6,0 g
H ₂ O destilada	400 mL

Autoclavar o meio e após resfriar a 50°C, adicionar 16 mL da solução de MES (2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid) 1M.

12) Meio de indução + acetoseringona 200 µM (MIAS)

MI solidificado	376 mL
Acetoseringone (AS)	8 mL

Após resfriar o meio de indução solidificado, adicionar a solução de acetoseringone.

13) Solução de micronutrientes

H ₃ BO ₃	30 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	70 mg
ZnCl ₂	200 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	20 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	50 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	200 mg
H ₂ O destilada estéril	500 mL

Homogeneizar os reagentes e estocar a solução a 4°C.

14) Solução de sais (M-100)

Na ₂ SO ₄	4 g
KCl	8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 g
CaCl ₂	1 g
Sol. micronutrientes	8mL
H ₂ O destilada estéril	992 mL

Autoclavar a solução e estocar a 4°C.

15) Mefoxina (100 mg.mL⁻¹)

Mefoxina	1 g
H ₂ O destilada	10 mL

Homogeneizar a solução por agitação, aliquotar (1 mL) em tubos de microcentrífuga estéreis e estocar a -20°C.

16) Canamicina (50 µg.mL⁻¹)

Canamicina	0,5 g
H ₂ O destilada	100 mL

Homogeneizar a solução por agitação, aliquotar (1 mL) em tubos de microcentrífuga estéreis e estocar a -20°C.

17) Estreptomicina (50 µg.mL⁻¹)

Estreptomicina	0,5 g
H ₂ O destilada	100 mL

Homogeneizar a solução por agitação, aliquotar (1 mL) em tubos de microcentrífuga estéreis e estocar a -20°C.

18) Meio seletivo para colônias transformantes resistentes à higromicina B, M-100 (STEVENS, 1974)

Glicose	10 g
KNO ₃	3 g
Solução de sais (M-100)	62,5 mL
Agar	15 g
H ₂ O destilada	937,5 mL

Autoclavar o meio e, após resfriamento (no máximo 40°C) adicionar:

Mefoxina (100 mg.mL ⁻¹)	3 mL
Higromicina (50 mg.mL ⁻¹)	concentração determinada no MIC

A concentração final de Mefoxina será de 150 mg.mL⁻¹. A concentração final de Higromicina será aquela determinada no MIC.

19) HCl 1N

HCl concentrado	82,5 mL
H ₂ O destilada	1000 mL

Estocar em frasco escuro à temperatura ambiente.

22) Corante Giemsa

Giemsa	0,07%
Tampão fosfato	50mM
Glicerol	3%
Metanol	3%

Ajustar o pH para 6,9 e estocar em frasco escuro à temperatura ambiente.

23) Tween 80

Tween	1 mL
H ₂ O destilada	1000 mL

Autoclavar e estocar a 4° C.

24) Tris-HCl 1 M pH 7,4

Tris	12,1 g
H ₂ O destilada	100 mL

Dissolver o Tris em 80mL de H₂O destilada. Após ajustar o pH para 7,4 adicionando HCl concentrado e em seguida completar o volume final para 100mL. Autoclavar a solução e estocar a 4°C.

25) Tampão de corrida TEB 10X

Trizma-Base	54,0 g
H ₃ BO ₃	27,5 g
EDTA	4,65 g
H ₂ O destilada	500 mL

26) Solução de brometo de etídio

Brometo de etídio	0,01 g
H ₂ O destilada	10,0 mL

Agitar a solução por várias horas e estocar a 4°C.

27) Gel de agarose 0,8 %

Agarose A-0169 (GIBCO BRL)	0,8 g
TEB (1x)	100 mL

Aquecer a mistura até completa dissolução da agarose. Deixar esfriar e verter em cuba de eletroforese.

28) Cloreto de sódio 3M

NaCl	8,76g
H ₂ O destilada	100 mL

Autoclavar a solução e estocar à – 4°C.

29) Solução depurinizante HCl 0,2 N

HCl	4,97 mL
H ₂ O destilada	295, 3 mL

Preparar a solução na hora do uso.

30) Solução para desnaturação do DNA em gel de agarose

NaOH	20,0 g
NaCl	87,66 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Autoclavar e estocar à temperatura ambiente.

31) Solução para neutralização do DNA em gel de agarose

Tris-HCl 2 M pH 7,2	500 mL
NaCl 3M	500 mL

O pH será ajustado para 7,2 com NaOH.

32) Tris-HCl 2 M pH 7,2

Trizma-Base	242,2 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Ajustar o pH para 7,2 com HCl concentrado e estocar a 4°C.

33) Tampão de transferência SSC (20 X)

NaCl	175,3 g
Citrato	88,2 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 1 M.

34) Dodecil Sulfato de Sódio(SDS) 10%

SDS	10,0 g
H ₂ O destilada	100 mL

Manter a solução à temperatura ambiente.

35) Solução de Lise

NaOH 10 N	2 mL
SDS 10%	1 mL
H ₂ O milli Q	100 mL

Preparar solução na hora do uso.

36) Solução de neutralização para extração de plasmídeo

KOAc 5M	30 mL
C ₂ H ₄ O ₂	5,75 mL
H ₂ O milli Q	14,25 mL

Preparar e estocar a 4°C.

37) Clorofil

Clorofórmio	24 mL
Álcool isoamílico	1 mL

A solução não deve ser autoclavada. Estocar a 4° C.

38) Clorofane

Fenol	1 mL
Clorofil	1 mL

A solução não deve ser autoclavada. Estocar a 4°C.

39) Fenol

A solução de fenol equilibrado utilizada foi de origem comercial (UC-DNA/ULTRA CHEM).

40) Solução SSC 2x

SSC 20x	10 mL
SDS 10%	0,1 g
H ₂ O destilada	completar para 100 mL

Misturar os reagentes. Preparar na hora do uso.

41) Solução SSC 0,5x

SSC 20x	2,5 mL
SDS 10%	0,1 g
H ₂ O destilada	completar para 100 mL

Misturar os reagentes. Preparar na hora do uso.

42) Tampão de Lavagem

Ácido Maleico 0,1M	11,61 g
NaCl 0,15M	8,77 g
Tween 20 0,3%	3 mL
H ₂ O destilada	completar para 1000 mL

Ajustar o pH para 7,5 com pastilhas de NaOH. Autoclavar e estocar à temperatura ambiente.

43) Tween 20

Tween	0,3 mL
Tampão Maleato	100 mL

44) Tampão de detecção

NaCl 0,1 M	0,58 g
Tris-HCl 0,1 M	1,21 g
H ₂ O destilada	100 mL

Ajustar pH para 9,5 com HCl.

45) Tampão de Ácido Maleico

Ac. Maleico 0,1 M	1,16 g
-------------------	--------

NaCl 0,15M	0,88 g
H ₂ O destilada	100 mL

Ajustar pH para 7,5. manter a temperatura ambiente.

46) Meio Leite de coco – Agar

Leite de coco (Sococo)	200 mL
Agar	16 g
H ₂ O destilada	600 mL

Homogeneizar a mistura. Ajustar o pH para 6,9 , autoclavar e plaquear tão logo esfriar (50° C).

47) Meio Agar Sacarose Extrato de Levedura (YESA)

Extrato de levedura	20 g
Sulfato de magnésio	0,5 g
Sacarose	150 g
Agar	20 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Autoclavar e estocar a temperatura ambiente e em local escuro.

ANEXO 2: Normas do Periódico *Antonie van Leeuwenhoek* para envio e preparação do artigo científico

Antonie van Leeuwenhoek

Manuscript Preparation

Antonie van Leeuwenhoek welcomes research papers, review papers and short communications.

Research papers describing original research should not exceed ten pages of printed text, including tables, figures and references (one page of printed text = approx. 600 words).

Reviews not exceeding 25 pages of printed text, including tables, figures and references. Prospective authors are invited to contact the Editor-in-Chief with suggestions for reviews.

Short Communications not exceeding five pages of printed text should be prepared following the general style guidelines below but should not be divided into separate text sections. Short communications should be clearly labelled as such, before the Title on the first page of the manuscript.

Papers already published or in press elsewhere will not be accepted. If any part of the subject matter or experiments included in a manuscript submitted to the Journal have been the subject of any prior publication, this prior publication must be identified. Papers of restricted local importance will not be accepted.

The Journal requires the submission of manuscripts using our On-line submission procedure (see "Preparing manuscripts for On-line Submission" below). Submitting your text On-line will expedite publication. ALL manuscripts should conform to the following guidelines:

1. Manuscripts should be written in standard English using British spelling. Authors for whom English is not their first language are strongly advised to have their manuscripts reviewed by someone proficient in the language prior to submission. Poorly written or formatted papers may be returned directly to the author before review. Papers should be mainly written in the past tense, particularly the Materials & Methods and the Results.
2. Manuscripts should be typed clearly, double-spaced throughout on one side of A4 paper with margins of 3 cm. All pages (including the tables, figures, legends and references) must be numbered consecutively.
3. The manuscript should be arranged in the following order.

Title page (page 1)

The title should be brief but informative and clearly relevant to the content. A subtitle may be used to supplement and thereby shorten an excessively long main title. Papers must not form part of a numbered series.

The author's full name(s) should be given with first names in full and all initials (if more than one, use '&' before the last name and indicate to whom correspondence should be addressed). Affiliation(s) and Present Address(es) should be indicated through the use of superscript numbers.

Full postal, telephone, fax and e-mail address details should be given for the corresponding author.

Key words/Abstract/Abbreviations (page 2)

Key words should be provided (a maximum of 6, in alphabetical order, suitable for indexing).

Abstract (brief and informative, not to exceed 250 words). No abbreviations should be used in the abstract.

Abbreviations (arranged alphabetically, only those which are not familiar and/or commonly used).

Main text

The text should be presented under the following headings: Introduction (including a consideration of the current literature and the objectives of the study), Materials & Methods (with sufficient detail to allow the work to be repeated), Results, Discussion and Conclusions. Results and Discussion may be combined if appropriate.

Tables should be placed after the References, followed by Figure Legends and finally Figures.

New paragraphs should be clearly indicated by indentations. The relative importance of headings and subheadings should be made clear by the use of bold and/or italic text as necessary. Artificial word breaks at the ends of lines must be avoided. Where non-standard abbreviations are to be used extensively, give each in full followed by the abbreviation in parentheses at the first time of usage. Include all abbreviations on the second page (see above). The use of footnotes should be avoided. However, if essential, they should be typed on the appropriate page, but clearly separated from the text with a line above them.

Citations of personal communications and unpublished data should be avoided, unless absolutely necessary. Such citations should appear in the text only, in parentheses, as in the following examples:

(Dean Harrington, personal communication)

(Andrea Hamilton, unpublished data).

Tables and Figures should be kept to a minimum and should not be used where data can be adequately described by text alone. Data must be presented in Tables or Figures and not duplicated between each.

Names of microbial species and genera should be given in italics. As a guide for acceptable style please consult a recent issue of the journal. The use of bacterial names and the proposal of new taxa should follow the conventions of the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (<http://ijs.sgmjournals.org/>).

Genetic sequence data will only be considered acceptable if accompanied by an accession number for an appropriate data bank (e.g. EMBL). This should be given at the end of the main body of text, preceding the acknowledgements.

Acknowledgements (including funding agencies and help from other colleagues) should follow the main text and precede the references.

References

Literature references should be listed alphabetically after the main text. Citations in the text should be referred to by author name and year of publication, enclosed in parentheses, e.g.

(Smith 1989; White et al. 1990).

Abbreviate titles of periodicals according to the style of the Bibliography Guide for Editors and Authors (Biosis, Chemical Abstract Service and Engineering Index, Inc., 1974).

References should contain: author(s) name(s) followed by author(s) initials, year, title of article (only first word and proper nouns capitalized), abbreviated journal title, volume number and inclusive page numbers. A recent issue of the journal and the following examples should be used for style guidance: Gonzalez A.E., Martinez A.T., Almendros G. and Grinbergs J. 1989. A study of yeasts during the delignification and fungal transformation of wood into cattle feed in Chilean rain forest. *Antonie van Leeuwenhoek*. 55: 221-236

Trijbels-Smeulders M.A.J.M., Adriaanse A.H., Gerards L.J. and Kimpen J.L.L. 2003. Strategy to prevent neonatal early-onset group B streptococcal disease in the Netherlands. *Rev. Med. Microbiol.* 14: 35-39.

Books must include the location and name of the publisher. A recent issue of the journal and the following examples should be used for style guidance:

Books (edited by someone other than author of article)

Goodfellow M. 1992. The family Nocardaceae. In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W & Schleifer K H (Eds.) *The Prokaryotes* (pp 1188 1213). Springer Verlag, New York.

Books (Monographs)

Hicks C.R. 1973. *Fundamental Concepts in the Design of Experiments*. Holt, Rinehard and Winston, New York.

Citations relating to the use of Internet sources should be used minimally and only where the source is clearly reputable e.g. significant organisations. The name of the

host organisation should be indicated and the URL should be given in the text only enclosed in parentheses. However, the URL for databases and on-line tools for bioinformatics should be given and where possible accompanied by an appropriate literature citation. The following examples are given for style guidance.

World Health Organisation (<http://www.who.int/en/>)

PROSITE (Gattiker et al. 2002; <http://ca.expasy.org/prosite>)

National Center for Biotechnology Information BLAST server (Altschul et al. 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

Tables

Each table should be typed on a separate page. Tables should be numbered with Arabic numerals, followed by a title in bold font. A short explanatory text should follow the title such that the table can be understood without reference to the main text. Horizontal rules should be indicated, and verticals avoided. Table footnotes should be marked with superscript numbers. Each table must be mentioned in the text.

Reproducibility of all results should be indicated noting how many times experiments were repeated and whether mean or representative results are shown. Valid statistical tests of significance should be applied where appropriate.

Tables may be edited by the publisher to permit more compact typesetting.

Figure Legends

These should follow the Tables on a separate page. Each figure should be mentioned in the text.

Figures and their legends should be identified by Arabic numbers and headed "Figure 1" etc., followed by a title in bold font. A short explanatory text should follow the title such that the figure may be understood without reference to the main text. Where multi-part figures are used, each part should be clearly identified in the legend, preferably with (lower case) letters.

Reproducibility of all results should be indicated noting how many times experiments were repeated and whether mean or representative results are shown. Valid statistical tests of significance should be applied where appropriate.

Figures

Line drawings must be in black and white and should not contain shading. Extremely small type should be avoided as figures are often reduced in size.

Do not give magnification or scales in the figure legends: instead draw bar scales directly on the figures.

Colour plates will be inserted only at the author's expense. Quotes will be provided for each individual case.

Abbreviations and units

SI units should be used, e.g.: mg, g, kg, km, m, cm, mm, ppm, cpm, qmCi (microCurie), l (litre), ml, s (second), min (minute), h (hour), mol, m³, kg per ha or kg ha⁻³ (the minus index form is always to be used in tables).

Gene names should be presented in italic font.

Proofs and offprints

The author will be sent an offprint order form and 2 proofs for proofreading. 1 Set of corrected proofs together with the manuscript should be returned to the Publisher.

Papers will usually be published within six months after acceptance. PDFs of proofs will be made available online as "forthcoming papers" prior to printed publication. Final papers will be made available both on-line and in print.

50 offprints will be supplied free of charge.

Preparing Manuscripts for Online Submission

Online Manuscript Submission

To keep the review time as short as possible (no postal delays!), Springer now requires authors, editors and reviewers of Antonie van Leeuwenhoek to use our fully

web-enabled online manuscript submission and review system. Our online manuscript submission and review system offers authors the option to track the progress of the review process of manuscripts in real time. Manuscripts should be submitted to: <http://anto.edmgr.com>.

The online manuscript submission and review system for Antonie van Leeuwenhoek offers easy and straightforward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats:

for manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX

for figures - TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript.

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout + disk.

In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

New feature

The journal offers a new feature called Article Plus: the possibility to add electronic addenda to your publication. This can be any type of electronic material - e.g. data, pictures, sounds, movies - as long as it is presented in an generally accessible format. Please contact the publisher should you have any electronic material you

wish to add as a supplement to your publication. The material will be hosted on a site provided by Kluwer, and a fixed URL will be included in the text of the printed paper.

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit <http://www.springeronline.com/openchoice> to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.