



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DANIELE SARTORI

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À PRODUÇÃO  
DE OCRATOXINA A EM *ASPERGILLUS WESTERDIJKIAE***

---

Londrina  
2009

**DANIELE SARTORI**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À PRODUÇÃO  
DE OCRATOXINA A EM *ASPERGILLUS WESTERDIJKIAE***

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

Orientador: Dra. Maria Helena Pelegrinelli  
Fungaro

Co-Orientador: Dra. Maria Angélica Ehara  
Watanabe

Londrina  
2009

**DANIELE SARTORI**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À PRODUÇÃO  
DE OCRATOXINA A EM *ASPERGILLUS WESTERDIJKIAE***

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro  
Universidade Estadual de Londrina, Centro de  
Ciências Biológicas, Departamento de Biologia  
Geral.

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate  
Universidade de São Paulo – Escola Superior de  
Agricultura Luiz de Queiroz

---

Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro  
de Biotecnologia.

---

Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono  
Universidade Estadual de Londrina, Centro de  
Ciências Exatas, Departamento de Bioquímica.

---

Prof. Dra. Márcia Cristina Furlaneto  
Universidade Estadual de Londrina, Centro de  
Ciências Biológicas, Departamento de  
Microbiologia.

Londrina, 31 de julho de 2009.

**À Dra. Maria Helena P. Fungaro, Gilberto  
J. Sartori e Clarice F. Sartori,  
*DEDICO.***

## **AGRADECIMENTOS**

### **Agradeço a (aos)...**

Dra. Maria Helena P. Fungaro, orientadora, exemplo de sabedoria e profissionalismo, pela oportunidade, confiança e amizade.

Laboratórios sob coordenação das Dra. Elisa Yoko Hirooka e Elisabete Yuque Sataque Ono.

Laboratório sob coordenação da Dra. Marilene Henning Vainstein e Dr. Augusto Schrank.

Laboratório sob coordenação do Dr. Emanuel Maltempi de Souza.

Laboratório sob coordenação do Dr. Carlos Alberto Labate.

Laboratórios da Universidade Estadual de Londrina sob coordenação das Dras. Célia Guadalupe T.J. Andrade, Leda Maria K. Sodré, Márcia Cristina Furlaneto e Maria Angélica Ehara Watanabe.

Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira, pela colaboração científica nos manuscritos.

Dr. André Luiz Martinez pela preciosa colaboração no início deste trabalho.

Coordenação do curso de Pós-Graduação em Microbiologia.

Todos os docentes do curso de pós-graduação em Microbiologia.

Universidade Estadual de Londrina;

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio financeiro;

Especial a Dra. Josiane Faganelo, Ms. Lívia K. Rosa e Silva, Dr. Alexander de Andrade e Dr. Luciano Huergo.

Tatiana Ávila Miguel, Daniele Doro e Nelson pelo auxílio fornecido nas análises da Ocratoxina A.

Companheiros de trabalho Carla Beatriz Fier, Daniel Ferri, Fernando Yuldi Ashikaga, Francine Mathias de Paula, Luis Gustavo Morello, Lara Munique Ferracin, Ligia Uno Lunardi, Maria Rosana F. de Paula e Roberta Losi Guembarovsky.

Ricardo secretário do programa de pós-graduação em Microbiologia.

Técnicos João Pereira e Osvaldo.

Familiares e amigos que indiretamente participaram desta caminhada para a realização deste trabalho.

**Muito obrigada a todos...**

**A mente que se abre para uma nova idéia, jamais voltará ao seu tamanho original “Albert Einstein”.**

**SARTORI, Daniele. Identificação de genes associados à produção de ocratoxina a em *Aspergillus Westerdijkiae*. 2009. 105f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.**

## RESUMO

Micotoxinas, metabólitos secundários de fungos, são compostos tóxicos encontrados em uma grande variedade de alimentos que, quando ingeridos, podem colocar em risco a saúde humana e animal. Dentre as diversas micotoxinas, especial interesse tem sido dado à ocratoxina A (OA), produzida por algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Esta micotoxina é encontrada com frequência principalmente em alimentos como grãos e uvas e, quando ingerida e acumulada, pode causar efeitos como, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, imunossupressão e carcinogenicidade. Ocratoxinas são formadas a partir de pentacetídeos cíclicos, derivados de dihidroisocumarina e ligados a L-fenilalanina, entretanto, informações sobre a síntese e a regulação da OA ainda são limitadas. Este trabalho teve por objetivo identificar genes e proteínas com expressão diferencial entre linhagens produtoras e não produtoras de OA, com auxílio das técnicas de Análise da Expressão Diferencial (RDA), Análise Proteômica, e PCR em Tempo Real. Inicialmente, foram obtidos fragmentos gênicos (aproximadamente 400 pb) diferencialmente expressos entre a linhagem produtora (UEL91) e não produtora (ITAL163) de OA, cultivadas em meio permissivo (YES). Aproximadamente 260 transcritos foram obtidos, dos quais três oxidases denominadas de P450-AL, P450-PH e OXI-1 foram de especial interesse. As oxidases P450-AL e OXI-1 apresentaram maior expressão diferencial (32 e 20 vezes, respectivamente), o que foi confirmado por PCR em Tempo Real. Por isso, genes codificadores destas duas oxidases foram avaliados quanto à associação entre a quantidade de OA e de transcritos expressos em meio de cultura permissivo (YES), semi-permissivo (CY) e restritivo (EM) à produção de OA. Foi encontrada associação entre o nível de transcritos e a presença de OA para ambos os genes, embora em diferentes magnitudes. Em um segundo estudo, foi usado uma linhagem mutante de *Aspergillus westerdijkiae* (ITAL142-T10) com reduzida produção de OA. Este mutante possui um gene interrompido pela integração de um T-DNA, similar ao loco An09g05800 de *Aspergillus niger*, que codifica um possível fator de transcrição PHD (Rum1), envolvido em eventos regulatórios mediados pela cromatina. A linhagem mutante (ITAL142-T10) foi usada para a análise proteômica diferencial com a linhagem selvagem (ITAL142), em meio permissivo à produção de OA, com o objetivo de identificar proteínas que estão sob a regulação do fator de transcrição PHD. Dentre 23 proteínas identificadas com maior expressão na linhagem selvagem, a maior frequência foi de proteínas de resposta a stress (36,4%) e da subunidade regulatória 26S do proteossoma (9,1%). Devido a ser usual o compartilhamento de genes regulatórios da biossíntese de micotoxinas e do processo de esporulação em fungos, foi feita uma análise dos conídios (produção e características morfológicas) de ITAL142 e ITAL142-T10 nos meios MEA e YES. Nenhuma alteração quanto à conidiação foi observada em MEA, no entanto, em YES, houve a formação de maior número de conídios. Em seguida, a quantidade de transcritos relacionados às proteínas 14-3-3 e à subunidade regulatória 26S do proteossoma foi analisada via PCR em Tempo Real. Para ambos, foi detectada expressão relativa maior em ITAL142 comparativamente à de ITAL142-T10, confirmando os dados de expressão diferencial observada pela análise proteômica. Em síntese, os dois estudos permitiram identificar genes associados à produção de OA.

**Palavras-chave:** Microbiologia. Aspergilos. Ocratoxinas.

**SARTORI, Daniele. Identificação de genes associados à produção de ocratoxina a em *Aspergillus Westerdijkiae*. 2009. 105f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.**

## ABSTRACT

Mycotoxins, secondary metabolites of fungi, are toxic compounds found in great variety of foods, and when ingested can be very hazardous to animal and human health. Among the diverse mycotoxins, special interest has been given to the ochratoxin A (OA), produced by some species of *Aspergillus* and *Penicillium*. This mycotoxin is frequently found mainly in food such as grains and grapes, and when ingested and accumulated they can cause nephrotoxicity, hepatotoxicity, immunosuppressive and carcinogenic effects. Ochratoxins are formed from cyclic pentaketides, derived from dihydroisocoumarin linked to L-phenylalanine, but information on their biosynthesis and regulation are still limited. The objective of this study was to identify genes and proteins with differential expression between OA producing and non-producing strains, using the techniques Representational Differential Analysis, Proteomic Analysis and Real Time PCR. Initially, differentially expressed genic fragments (400 bp approximately) were obtained between OA producing (UEL91) and non-producing strains (ITAL163) grown in the permissive medium (YES). Approximately 260 transcripts were obtained and three oxidases denoted P450-AL, P450-PH and OXI-1 were of special interest. The oxidases P450-AL and OXI-1 showed a higher differential expression (32 and 20-fold respectively), and this result was confirmed through Real Time PCR. Due to this fact, both oxidases genes were analyzed for the association between the amount of OA produced and transcripts expressed in permissive (YES), semi-permissive (CY) and restrictive (EM) media for the production of OA. Association was found between the level of both gene transcripts and the amount of OA, although in different magnitudes. In a second study, it was used a mutant strain of *Aspergillus westerdijkiae* (ITAL142-T10) with reduced OA production. This mutant has an interrupted gene by a T-DNA integration, similar to the locus An09g05800 of *Aspergillus niger* which codes for a putative transcription factor PHD (Rum1), involved in chromatin-mediated regulatory events. The mutant strain (ITAL142-T10) was used for differential proteomic analysis with the wild type strain (ITAL142) grown in permissive medium for OA production, with the objective of identifying possible proteins under regulation of the transcription factor PHD. Among the 23 proteins with higher levels of expression in the wild type strain, proteins of stress response (36.4%) and the regulatory subunit 26S of the proteasome (9.1%) were the ones with highest frequency. Being usual the sharing of regulatory genes involved in mycotoxin biosynthesis and with the process of fungi sporulation, an analysis of conidia (production and morphological characteristics) was carried in ITAL142 and ITAL142-T10 in MEA and YES media. No alteration was found regarding conidiation in MEA, but a greater number of conidia were observed in YES medium. Then, the proteins, 14-3-3 and the regulatory subunit 26S of the proteasome were transcriptionally analyzed by Real Time PCR. Both transcripts showed higher relative expression in ITAL142 compared to ITAL142-T10, confirming the data of differential expression observed by the proteomic analysis. Thus, both studies brought contributions concerning the elucidation of genes associated with OA biosynthesis.

**Keywords:** Microbiology. *Aspergillus*.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
1.1.1 Fungos produtores de Ocratoxina A.....	13
1.1.2 Marcadores moleculares para detecção de fungos ocratoxigênicos.....	15
1.1.3 Detecção e quantificação de espécies ocratoxigênicas com o uso de sequências não associadas à biossíntese de micotoxinas.....	17
1.1.4 Detecção e quantificação de espécies ocratoxigênicas com o uso de sequências envolvidas em vias biossintéticas de micotoxinas.....	23
1.1.5 <i>Cluster</i> gênico e fatores de transcrição: implicações na produção de micotoxinas.....	26
1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	47
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48
3.1 ARTIGO I – IDENTIFICATION OF GENES DIFFERENTIALLY EXPRESSED BETWEEN OCHRATOXIN-PRODUCING AND NON-PRODUCING STRAINS OF <i>ASPERGILLUS</i> <i>WESTERDIJKIAE</i> .....	49
3.1.1 Abstract.....	51
3.1.2 Introduction .....	52
3.1.3 Material and Methods.....	53
3.1.3.1 Strains and culture conditions .....	53
3.1.3.2 Kinetic studies of ochratoxin A production by UEL91 strain.....	54
3.1.3.3 OA analysis .....	54
3.1.3.4 cDNA subtracted library.....	55
3.1.3.5 Cloning and sequencing of RDA products.....	56
3.1.3.6 RT-real time PCR for gene expression comparisons between OA producer and non-producer strains after grown in permissive medium .....	56
3.1.3.7 Gene expression and OA production.....	57
3.1.4 Results and Discussion.....	58
3.1.4.1 Identification of genes differentially expressed between OA producer and non-producer strains of <i>A. westerdijkiae</i> .....	58

3.1.4.2 Validation of differential gene expression.....	59
3.1.5 References .....	62
3.1.6 Legends.....	67
3.1.7 Tables and Figures.....	68
Table 01 .....	68
Table 02 .....	69
Figure 01.....	70
Figure 02.....	71
Figure 03.....	72
3.2 ARTIGO II – DIFFERENTIAL PROTEOMICS BETWEEN WILD-TYPE AND MUTANT STRAINS OF <i>ASPERGILLUS WESTERDIJKIAE</i> IN PERMISSIVE MÉDIUM OF OCHRATOXIN A.....	73
3.2.1 Abstract.....	74
3.2.2 Introduction .....	75
3.2.3 Materials and Methods .....	77
3.2.3.1 Identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions.....	77
3.2.3.2 Strains and culture conditions .....	78
3.2.3.3 Quantification of ochratoxin A (ITAL142 and ITAL142-T10 strains).....	78
3.2.3.4 Protein extraction.....	79
3.2.3.5 Two-dimensional electrophoresis (2D) .....	80
3.2.3.6 2D Image analysis .....	80
3.2.3.7 MALDI-TOF mass spectrometry .....	81
3.2.3.8 RT-Real Time PCR .....	81
3.2.3.9 Scanning Electron Microscopy (SEM).....	82
3.2.4 Result and Discussion.....	83
3.2.5 References .....	91
3.2.6 Legends.....	96
3.2.7 Tables and Figures.....	97
Table 01 .....	97
Table 02 .....	98
Table 03 .....	99
Figure 01.....	100
Figure 02.....	101
Figure 03.....	102

Figure 04..... 103

**4 CONSIDERAÇÕES FINAIS** ..... 104

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos são capazes de produzir metabólitos secundários utilizados em sua sobrevivência e diferenciação celular. Dentre os metabólitos secundários incluem-se as micotoxinas que são moléculas de baixa massa molecular e com grande diversidade em estrutura química e atividade biológica. São compostos tóxicos de efeitos nocivos à saúde animal e humana. Diversas micotoxinas podem ser sintetizadas por uma espécie fúngica, mas nem todos os fungos são capazes de produzir micotoxinas; além disso, o tipo e a quantidade da micotoxina podem estar relacionados à linhagem fúngica, às condições ambientais de desenvolvimento do organismo produtor e aos nutrientes disponíveis. Entre as inúmeras micotoxinas descritas, quatro destacam-se por sua importância agroeconômica devido à crescente contaminação de produtos destinados à alimentação humana e animal: zearalenona, ocratoxina A, fumonisina e aflatoxina.

Objeto de estudo neste trabalho, a ocratoxina A (OA), é produzida por algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Esta micotoxina vem sendo frequentemente encontrada em alimentos de origem animal e vegetal, destacando-se grãos de café, cereais, especiarias, nozes, uvas, figos e leite. Efeitos como, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, imunossupressão e carcinogenicidade têm sido associados com a ingestão de alimentos contaminados com OA. Frente ao risco da OA para a saúde humana, a Comissão Européia tem estabelecido regulamentações para os níveis de tolerância da OA em alguns alimentos variando entre  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , conforme o tipo de alimento. Diversos estudos têm surgido com o objetivo de desenvolver metodologias para o controle desta micotoxina na cadeia alimentar. Dentre esses esforços, incluem-se aqueles destinados ao desenvolvimento de métodos visando à detecção dos fungos produtores de OA em alimentos.

No Brasil, *Aspergillus westerdijkiae* tem sido relatado como a principal espécie fúngica responsável pela contaminação de alimentos, especialmente café, com OA. Relatos recentes apontam, no entanto, que nem todos os isolados desta espécie são capazes de produzir OA, ou seja, a habilidade de produzir OA é restrita a alguns isolados, aproximadamente 77%.

Os métodos analíticos para a detecção de OA em alimentos são conclusivos e não preventivos, informando que a toxina já foi produzida. Igualmente, métodos para detecção de espécies ocratoxigênicas têm sido descritos, mas a presença de um fungo em uma amostra alimentar não necessariamente indica a presença de OA. A formação de OA depende

fortemente de condições ambientais, tais como, substrato, atividade de água, pH e temperatura.

Métodos que quantifiquem a expressão de genes relacionados à biossíntese de OA poderiam ter função preventiva, uma vez que os genes relacionados à biossíntese de micotoxinas são frequentemente expressos dias antes da sua produção. A dificuldade de desenvolvimento destes métodos é decorrente do pouco conhecimento de quais genes estão envolvidos na biossíntese de OA, bem como dos fatores que diferenciam as linhagens produtoras das não produtoras.

Alguns autores têm sugerido que a via biossintética de OA não segue as mesmas etapas em diferentes espécies produtoras. Estudos vêm sendo direcionados à busca de genes envolvidos na biossíntese de OA em diferentes espécies e uma das características que facilitam esta busca é o fato de que, usualmente, os genes da biossíntese de metabólitos secundários apresentam-se dispostos em *clusters*, i.e. adjacentes uns aos outros nos cromossomos fúngicos. Alguns relatos demonstram que os *clusters* de produção de micotoxinas estão situados em regiões subterminais dos cromossomos fúngicos. A funcionalidade dos genes de um *cluster* pode ser mantida em níveis transcricionais, devido a mecanismos de co-regulação de genes, mediados por fatores de transcrição que se ligam em regiões específicas nos promotores gênicos dos *clusters*, desencadeando o funcionamento de diversos genes estruturais. Os fatores de transcrição podem funcionar através de domínios restritos ou específicos que, geralmente, têm regulação positiva com localização, na maioria das vezes, dentro dos *clusters* ou por fatores de domínios amplo ou global, geralmente situados fora dos *clusters*, mas com atuação na regulação de genes dos *clusters*.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo a identificação de genes e proteínas com expressão diferencial entre linhagens produtoras e não produtoras de OA (natural ou mutante para um gene de regulação global), usando técnicas de Análise da Expressão Diferencial (RDA), Análise Proteômica e PCR em Tempo Real.

## 1.1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1.1 Fungos produtores de Ocratoxina A

Fungos filamentosos são capazes de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários, e são ricos em genes codificando proteínas envolvidas na biossíntese dos mesmos (KHALDI et al. 2008). Diferente dos metabólitos primários que são frequentes e de importância vital para sobrevivência, os metabólitos secundários não são necessários para sobrevivência, diferenciação celular e sua síntese é limitada a uma família, gênero, espécie ou até mesmo linhagem fúngica (BENNETT; CIEGLER 1983). Dentre os metabólitos secundários, incluem-se as micotoxinas, que são moléculas orgânicas com baixo peso molecular e com uma grande diversidade na estrutura química e atividade biológica, com propriedades tóxicas, prejudiciais à saúde humana e animal. A principal fonte de micotoxinas está em alimentos de origem vegetal, contaminados durante os procedimentos de colheita, transporte e estocagem (SMITH; HENDERSON 1991). Os riscos a saúde humana se dão não somente através da ingestão de alimentos contaminados oriundos de fontes vegetais, mas também através de alimentos de origem animal, pelo fato de animais terem ingerido alimentos contaminados. Devido as diferentes estruturas moleculares das micotoxinas, sua influência na saúde humana e animal é bastante ampla, abrangendo desde efeitos neurotóxicos, teratogênicos, imunossupressivos, nefrotóxicos, hepatóxicos até carcinogênicos (GEISEN 1998). Aproximadamente 20 diferentes micotoxinas são significantes para a saúde humana (GEISEN 1998; BENNETT; KLICH 2003) existindo necessidade de metodologias rápidas para a detecção de micotoxinas de interesse e dos fungos que as produzem (Russell e Paterson 2006).

Ocratoxinas são uma classe de micotoxinas produzidas por algumas espécies de fungos. Existem três tipos de ocratoxinas, A, B e C, mas a ocratoxina A (7-(L-β-fenilalanil-carbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metil isocumarina – (OA) (Fig. 1) tem a maior toxicidade e ocorre com maior frequência em alimentos. Embora esta micotoxina tenha sido descrita há vários anos atrás (Van Der MERWE et al. 1965), mas somente recentemente tem recebido considerável atenção. Como revisado por Petzinger e Weidenbach (2002), alimentos contaminados com OA são encontrados em abundância em diferentes países. Aproximadamente 57% de 6500 amostras alimentares comercializadas na

Itália continuam OA acima do limite de detecção de  $0,01 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (WOLFF et al. 2000). Exemplos muito importantes são os grãos, incluindo os grãos de café, especiarias, nozes, uvas e figos (BAYMAN et al. 2002; JORGENSEN; JACOBSEN 2002; BATTILANI et al. 2003; TANIWAKI et al. 2003). A OA não é totalmente decomposta durante os estágios de processamento como cozimento, lavagem e fermentação. Devido a isso, a OA tem sido detectada em alimentos processados tais como, pães, cervejas, vinhos, cafés e chocolates (JORGENSEN 1998; VISCONTI et al. 2001).

Os rins são os órgãos alvos para toxigenicidade da OA. Os efeitos nefrotóxicos causados pela OA, têm sido demonstrados em todas as espécies de mamíferos analisadas. Para humanos, existem abundantes evidências relacionando ingestão de OA com graves nefropatias (MANTLE et al. 1993; MAAROUFI et al. 1995; WAFFA et al. 1998). A carcinogenicidade da OA também foi determinada em roedores, entretanto em humanos uma correlação entre carcinogenicidade e exposição à OA não foi até o momento, diretamente comprovada. Baseado neste fato, em 1993, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC 1993) classificou a OA como um possível carcinógeno humano (grupo 2B). Estudos recentes têm documentado significantes alterações da resposta imune. De acordo com Petzinger e Weidenbach (2002), alterações imunológicas provenientes de exposição à OA, vêm ganhando maior atenção desde que a observação destes efeitos tem ocorrido com maior frequência diante da exposição de concentrações menores de OA em relação àquelas que induzem a carcinogenicidade e ou nefrotoxicidade.

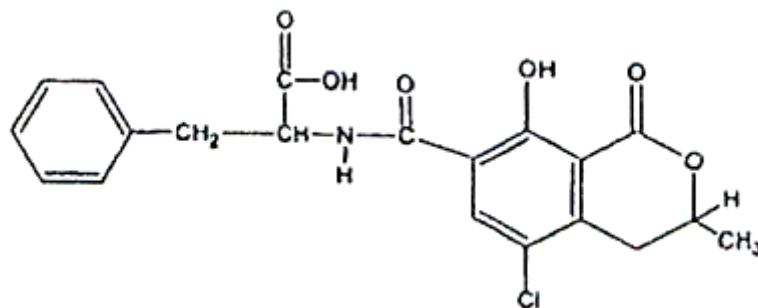
Baseado no risco da OA para a saúde humana a União Européia tem considerado a necessidade de estabelecer regulamentação para o nível máximo de OA tolerado em cereais e seus produtos, frutas secas e derivados, café torrado e solúvel. Para frutas secas, (uva passa) o nível máximo tolerável de OA é  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , mas para uvas o nível máximo permitido estabelecido é de  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Para grãos, como cereais e todos os produtos derivados para consumo humano direto o nível máximo tolerável para OA é de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Finalmente, o nível máximo de OA em café é de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  para grãos de café torrado (Official Journal of The European Union 2005). A Comunidade Européia está no momento considerando o estabelecimento de um nível máximo apropriado para OA em outros alimentos.

Existem espécies particulares de fungos que podem produzir várias micotoxinas, entretanto, nem todas as espécies de fungos podem produzir micotoxinas. O tipo e a quantidade de uma determinada micotoxina estão associados a uma linhagem específica,

bem como condições ambientais para o crescimento e produção de fungos produtores de micotoxinas.

Os fungos produtores de OA economicamente mais importantes foram recentemente revisados por Varga e Kozakiewicz (2006): *Penicillium verrucosum* em cereais (LUND; FRISVAD 2003); *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* em uvas (BATTILANI; PIETRI 2002); *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *A. carbonarius* em café (Bucheli e Taniwaki 2002) e finalmente *Aspergillus alliaceus* em figos (BAYMAN et al. 2002). Entretanto, com auxílio das técnicas de biologia molecular e análise de metabólitos fúngicos resultaram na descrição, por pesquisadores europeus, de algumas espécies novas que são importantes produtoras de OA (FRISVAD et al. 2004). *Aspergillus westerdijkiae*, que foi recentemente desmembrado de *A. ochraceus*, é agora reconhecido como principal espécie produtora de OA em café arábica, enquanto *A. carbonarius* ocorre com frequência em café robusta.

As severas conseqüências da contaminação de alimentos por OA despertam a necessidade de desenvolver metodologias que podem ser eficientes e economicamente viáveis para detectar as espécies produtoras da referida toxina em alimentos.



**Figura 1** – Estrutura química da ocratoxina A.

### 1.1.2 Marcadores moleculares para detecção de fungos ocratoxigênicos

O isolamento e identificação tradicional de fungos ocratoxigênicos provenientes de amostras alimentares envolvem procedimentos laboriosos, e exigem grande conhecimento de taxonomia fúngica de um especialista da área de micologia, uma vez que alguns gêneros contem um grande número de espécies relacionadas. A aplicação das técnicas



de biologia molecular pode auxiliar nestes inconvenientes reduzindo o tempo de análise de vários dias, para algumas horas, além de proporcionar uma identificação precisa. A reação da polimerase em cadeia (PCR) é uma técnica desenvolvida em 1985 para amplificação *in vitro* de segmentos específicos de DNA (SAIKI et al. 1985; MULLIS et al. 1987). Esta técnica tem proporcionado identificação precisa e rápida para detecção de espécies ocratoxigênicas sem a necessidade de isolar culturas puras. É importante ressaltar que a PCR não distingue entre células mortas e vivas, o que pode ser vantajoso no caso de fungos micotoxigênicos, uma vez que, micotoxinas são geralmente muito estáveis (GEISEN 1998).

Para o desenvolvimento de um diagnóstico baseado em PCR, a seleção de uma sequência alvo específica para fungos produtores de uma determinada micotoxina é um processo chave. De acordo com Carter e Vetrie (2004), as sequências alvos designadas para a construção de *primers* de PCR podem ser didaticamente divididas em dois grupos: a) sequências anônimas de DNA e b) genes funcionais. Sequências anônimas de DNA são obtidas de uma amostragem de DNA genômico e podem ou não conter genes funcionais. O desenvolvimento de marcadores a partir de sequências anônimas requer análises comparativas de perfis de DNA entre espécies relacionadas, gerados pelos polimorfismos de DNA amplificados ao acaso (RAPD, do inglês Random Amplified Polymorphic DNA) ou pelos polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP, do inglês Amplified Fragment Length Polymorphism) (WILLIAMS et al. 1990; VOS et al. 1995). Ambas as metodologias tem demonstrado ser instrumentos taxonômicos aplicáveis especialmente em níveis taxonômicos mais baixos. O padrão de amplificação produzido por análise de RAPD e AFLP permite a discriminação entre espécies e até mesmo entre isolados de uma mesma espécie. Polimorfismos são reconhecidos pela presença ou ausência de fragmentos amplificados em cada *loci* de RAPD ou AFLP. Bandas de DNA que estão exclusivamente presentes em todos os isolados de uma determinada espécie podem ser clonadas e sequenciadas. Uma vez que um marcador de RAPD ou AFLP foi sequenciado, este pode ser convertido em um robusto marcador baseado em PCR. Assim, RAPD e AFLP têm sido aplicados com sucesso para revelar sequências marcadoras espécie-específicas. (SCHMIDT et al. 2003; FUNGARO et al. 2004a; SCHMIDT et al. 2004a; SARTORI et al. 2006). Tais sequências têm sido usadas para a construção de *primers* espécie-específicos utilizados para a identificação e detecção de algumas espécies ocratoxigênicas em amostras de produtos destinados à alimentação.

Como mencionado acima, sequências de genes funcionais podem também ser usadas como alvo para o desenho de *primers* de PCR para detectar fungos

micotoxigênicos. Entretanto, diferentemente de outras micotoxinas, o caminho biossintético da OA ainda não foi totalmente caracterizado e conseqüentemente os genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese deste metabólito secundário são praticamente desconhecidos. Devido a este fato, as diversas análises baseadas em PCR que vem sendo desenvolvidas durante os últimos quatro anos, fizeram uso de genes do qual não são associados à biossíntese de micotoxinas, como os genes de RNA ribossomal, genes da beta tubulina e calmodulina (PERRONE et al. 2004; PATIÑO et al. 2005; MORELLO et al. 2007).

### **1.1.3 Detecção e quantificação de espécies ocratoxigênicas com o uso de sequências não associadas à biossíntese de micotoxinas**

A ocratoxina A foi descoberta como um metabólito secundário de linhagens de *A. ochraceus*, que pertence à secção *Circumdati* de *Aspergillus*. Baseando-se em taxonomia polifásica, a qual leva em consideração todos os dados fenotípicos e genotípicos e os integra em um tipo consenso de classificação, 20 espécies podem ser distinguidas dentro da secção *Circumdati*. A taxonomia desta secção permanece em progresso e recentemente Frisvad et al. (2004) propôs a divisão formal da espécie *A. ochraceus* em duas espécies, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*. Várias espécies dentro da secção *Circumdati* são capazes de produzir OA em meio de cultura, mas as espécies responsáveis pela presença de OA em alimentos são *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* (FRISVAD et al. 2004).

*A. westerdijkiae* e *A. ochraceus* são muito similares e vários isolados previamente identificados como *A. ochraceus* são agora reconhecidos como *A. westerdijkiae*, incluindo a linhagem original produtora de OA (NRRL 3174). Amplificação e sequenciamento das regiões ITS1-5,8S-ITS2 de várias linhagens brasileiras de ambas as espécies mostraram variações nucleotídicas específicas caracterizando *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus* (FUNGARO et al. 2004b). Para ITS1, todas as sequências de *A. westerdijkiae* diferiram de *A. ochraceus* por possuir um C ao invés de um T na posição 76 e 80. Em adição, as linhagens de *A. ochraceus* mostraram uma deleção de um T na posição 89. Para ITS2, nucleotídeos específicos na posição 494-495, AT, caracterizaram as linhagens de *A. westerdijkiae*, ao invés de TC em *A. ochraceus*. Entretanto, uma deleção de um T na posição 487 caracterizou linhagens de *A. ochraceus*. Similarmente, por usar sequências de genes de  $\beta$ -tubulina de *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus*, Morello et al. (2007) detectaram 39

polimorfismos únicos de nucleotídeos espécie-específicos, muitos deles (97,4%) em regiões intrônicas 11 substituições nucleotídicas e inserção/deleção heptanucleotídica foram encontradas dentro do íntron 3 (107 pb). No íntron 4 (103 pb) foi encontrado seis substituições, uma inserção/deleção pentanucleotídica e uma inserção/deleção dinucleotídica. Sete substituições foram encontradas no íntron 5 (87 pb).

O primeiro relato de análise diagnóstica por PCR para *A. ochraceus* ocorreu em 2003 (SCHMIDT et al. 2003). Os autores investigaram a relação genética entre 70 linhagens utilizando marcadores AFLP. Um determinado número de bandas de AFLP características para *A. ochraceus* foi detectado. Três daquelas bandas foram clonadas e sequenciadas e posteriormente as sequências de nucleotídeos obtidas foram usadas para a construção de *primers* específicos para *A. ochraceus*. A especificidade dos *primers* OCA-V/OCA-R foi testada com DNA de diferentes linhagens alvo, bem como de espécies relacionadas à *Aspergillus* e *Penicillium* spp. e DNA isolado de grãos de café não infectados. O sucesso do diagnóstico molecular foi claramente demonstrado pelos autores, no entanto, este *primer* é capaz de amplificar sequência de DNA de *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*. Não há demérito aos autores uma vez que os *primers* espécie-específicos foram desenvolvidos antes da divisão formal da espécie *A. ochraceus* nas duas espécies mencionadas acima.

Patiño et al. (2005) desenvolveram PCR específica para detecção de espécies de *A. ochraceus* baseando-se em regiões ITS. O par de *primer* denominado OCRA1/OCRA2 foi desenhado baseando-se em comparações de sequências ITS de várias linhagens de espécies de *Aspergillus*. A especificidade do par de *primer* foi testada em uma série de linhagens de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Botrytis* e *Alternaria* comumente associadas com uvas, cereais e café. Um único fragmento de 400pb foi amplificado somente quando DNA genômico da linhagem de *A. ochraceus* foi usada. Nenhum produto foi observado com o uso de DNA genômico de outros isolados de *Aspergillus* e dos demais gêneros citados. De acordo com os autores a sensibilidade da análise de PCR baseada nas sequências ITS foi mais sensível (1 a 10 pg de DNA molde por reação), do que *primers* baseado em genes de cópia única (0,1 a 1 ng de DNA molde por reação). Os autores não mencionaram sobre a nova espécie *A. westerdijkiae*. Provavelmente o *primer* proposto não distingue entre *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus*.

Com o desenvolvimento de *primers* espécie-específicos para detecção de *A. westerdijkiae*, Morello et al. (2007) explorou a variação genética encontrada entre sequências parciais do gene da  $\beta$ -tubulina obtidas de *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*. Um par de *primer* foi desenhado (Bt2Aw-F/Bt2Aw-R) para amplificar especificamente *A. westerdijkiae*. Um

produto de 347 pb foi visualizado em todos os isolados de *A. westerdijkiae*, mas nenhum produto de PCR foi observado em isolados de *A. ochraceus*. Os *primers* Bt2Aw foram aplicados com sucesso para detectar um produto de 347 pb ao utilizar DNA extraído de grãos de café inoculados com *A. westerdijkiae*.

As espécies ocratoxigênicas *Aspergillus carbonarius* e *A. niger* pertencem à secção *Nigri*, a qual se configura como um grupo importante de espécies em micologia de alimentos. Como mencionado por Samson et al. (2007), os *aspergillus* negros constituem um dos grupos mais complexos, no que se refere à classificação e identificação, e numerosos esquemas taxonômicos tem sido propostos. As diferenças entre algumas espécies pertencentes à secção *Nigri* são muito sutis e sua identificação requer análise molecular. São reconhecidas 16 espécies em *Aspergillus* secção *Nigri* (*A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricaensis*, *A. ellipticus*, *A. ellipsoides*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. homomorphus*, *A. heteromorphus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger*, *A. turingensis*, e *A. vadensis*), o último táxon foi recentemente descrito como uma nova espécie (SAMSON et al. 2004; VRIES et al. 2005). *A. niger* sensu stricto, *A. turingensis*, *A. foetidus* e *A. brasiliensis* são morfologicamente idênticos e tem sido chamado de agregados *A. niger* (PARENICOVÁ et al. 2001). Embora os taxa inclusos no agregado *A. niger* são morfologicamente indistinguíveis, eles diferem na habilidade para produção de OA e outros metabólitos. A capacidade das espécies pertencentes ao agregado *A. niger* produzir OA ainda é incerta, provavelmente devido a sua complexidade na identificação das espécies.

Baseado na análise de PCR-RFLP das regiões ITS1-5,8S-ITS2, os quatro taxa do agregado *A. niger* podem ser classificados em dois padrões (N e T). *A. foetidus* e *A. turingensis* são classificados como tipo T, *A. niger* e *A. brasiliensis* são classificados como tipo N (ACCENSI et al. 1999; ACCENSI et al. 2001). De acordo com estes autores, todas as linhagens produtoras de OA foram classificadas como padrão N, enquanto nenhum dos isolados classificados como padrão T produziu OA. Ueno et al. (1991) descreveram um isolado de *A. foetidus* que foi capaz de produzir OA, entretanto, de acordo com Samson et al. (2004), nenhuma linhagem de *A. foetidus* sensu stricto produz OA. A linhagem CBS 618.78 de *A. foetidus* descrita como uma produtora de OA foi comprovada ser *A. niger* e não *A. foetidus* (SAMSON et al. 2004).

Embora durante vários anos fosse assumido que *A. turingensis* não era capaz de produzir OA (SAMSON et al. 2004), recentemente dois grupos de pesquisadores encontraram isolados produtores de OA desta espécie (MEDINA et al. 2005; PERRONE et al. 2006). Em nosso laboratório nós analisamos vários isolados dentro do agregado *A. niger*

(obtidos de grãos de café brasileiros e frutas secas de origem mundial) e somente *A. niger* sensu stricto foi encontrado como produtor de OA, e nenhum dos isolados de *A. tubingensis* ou *A. foetidus* analisados foram capazes de produzir OA (Dados não publicados). Esta situação demonstra a importância do desenvolvimento de marcadores específicos para a identificação e detecção de uma determinada espécie de fungo ocratoxigênico.

Análise de PCR específica para detecção de espécies de *A. carbonarius* foi desenvolvida por Patiño et al. (2005) baseado nas regiões ITS. O par de *primer* denominado CAR1/CAR2 foi capaz de amplificar um fragmento de 420 pb somente quando DNA genômico da linhagem de *A. carbonarius* foi utilizada. Schmidt et al. (2004a) usaram AFLP para detectar marcadores específicos para *A. carbonarius*. Alguns fragmentos amplificados foram específicos para esta espécie. Os fragmentos marcadores foram clonados, sequenciados e utilizados para o desenvolvimento de *primers* específicos para detectar esta espécie. Os *primers* denominados A1B-fw/A1B-rv e C1B-fw/C1B-rv amplificaram um fragmento de 189 pb e 351 pb, respectivamente, em todos os isolados de *A. carbonarius* testados. Baseado no alinhamento de sequências parciais do gene que codifica para a calmodulina (*cmdA*), Perrone et al. (2004) identificaram regiões apropriadas para desenhar *primers* de PCR específicos para a detecção de linhagens de *A. carbonarius*. O produto amplificado com o *primer* CARBO1/2 produziu um fragmento de 371 pb com sensibilidade de 12 pg ao utilizar DNA genômico puro. Embora a análise de PCR fosse útil para o *screening* de isolados de aspergillus negros em uvas, os autores não a utilizaram para detectar linhagens de *A. carbonarius* diretamente em amostras de uvas.

Várias linhagens representantes de aspergillus negros, incluindo *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. tubingensis* foram analisadas por RAPD e a partir dos resultados, *primers* espécie-específicos foram desenvolvidos para detecção de *A. carbonarius* em grãos de café (FUNGARO et al. 2004a). Foram selecionadas algumas bandas de DNA presentes em todas as linhagens de *A. carbonarius* e ausentes em todas as linhagens de *A. niger* e *A. tubingensis*. Uma das bandas foi clonada e sequenciada, e então utilizadas para o desenho de *primers* espécie-específicos para *A. carbonarius* (OPX7<sub>809</sub>-F/OPX7<sub>809</sub>-R). Com o uso deste *primer* os autores detectaram um fragmento de 809 pb com a obtenção de DNA extraído de grãos de café inoculados com linhagens de *A. carbonarius*. Nenhuma reação cruzada foi observada usando DNA obtido de grãos de café inoculados com outras espécies relacionadas de aspergillus negros. Similarmente, baseado em marcadores RAPD, Sartori et al. (2006) desenvolveram *primers* específicos para detecção de *A. niger*. O *primer* denominado OPX7<sub>372F</sub>/ OPX7<sub>372R</sub> proporcionou um fragmento de 372 pb em todos os isolados de *A. niger*

stricto sensu, e nenhum produto de amplificação foi observado em reações usando DNA de espécies relacionadas. Esta análise de PCR foi aplicada com sucesso para detectar *A. niger* em grãos de café.

O Brasil é o maior produtor e exportador de café no mundo. Estudos relativos a fungos com o potencial para produção de OA e colonização de grãos de café brasileiros mostraram que *A. ochraceus* (agora *A. westerdijkiae*), *A. carbonarius* e *A. niger* são as principais espécies. Diante desta observação nosso grupo desenvolveu uma análise de PCR multiplex útil para detectar as três espécies fúngicas diretamente de amostras deste produto (SARTORI et al. 2006). O procedimento de PCR Multiplex (m-PCR) é caracterizado pela amplificação simultânea de mais de uma sequência alvo em uma única reação de PCR, decrescendo o número de reação a ser desenvolvida para acessar a possível presença de diferentes espécies em amostras alimentares. Sartori et al. (2006), primeiramente analisaram o valor da análise de m-PCR com DNA obtido de grãos de café inoculados com aquelas três espécies fúngicas. Os produtos amplificados de 260 pb, 809 pb e 372 pb, em uma única reação de PCR confirmaram a presença de *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger*, respectivamente. O sucesso da análise de PCR multiplex também foi analisado usando amostras de café coletadas de armazéns.

*Penicillium verrucosum* tem sido isolado de cereais com certa frequência, e é o principal fungo produtor de OA em regiões de clima frio (PITT; HOCKING 1997). Esta espécie é morfológicamente muito similar a *P. nordicum*, isolado principalmente de alimentos proteínicos como queijos e carnes fermentadas (LARSEN et al. 2001; CASTELLÀ et al. 2002). *P. nordicum* é um alto produtor de OA *in vitro*, mas até agora a habilidade desta espécie para produzir OA em seu ambiente natural é desconhecida (BOGS et al. 2006).

Por usar RAPD, AFLP e sequenciamento das regiões ITS, Castellà et al. (2002) caracterizaram dois grupos de linhagens de *Penicillium* produtoras de OA, os quais diferem em sua habilidade para produzir esta micotoxina, com o grupo I contendo principalmente linhagens com alta produção, e o grupo II contendo linhagens com produção moderada ou sem produção. As linhagens do grupo I de origem alimentícia, tal como queijos e produtos cárneos, enquanto linhagens do grupo II originárias de plantas. As sequências das regiões ribossomais ITS1-5,8S-ITS2 foram similares, exceto pela troca de dois nucleotídeos em várias linhagens de cada grupo. O grupo I foi reconhecido como *P. nordicum* e o grupo II como *P. verrucosum*. Os autores não tomaram como objetivo o desenho de *primers* espécie-específicos para detectar uma ou outra espécie de *Penicillium*.

Embora a PCR convencional seja uma ferramenta válida para detecção e monitoramento de fungos micotoxigênicos, esta ainda não é apropriada para quantificar uma dada espécie de fungo em amostras alimentares. Pequenas diferenças na eficiência da reação em cada ciclo podem resultar em uma diferença substancial na quantidade de produto final e então a extrapolação para a concentração inicial do molde na amostra é muito difícil de fazer (HILL; 1996). Felizmente, a introdução da tecnologia de PCR em Tempo Real tem aumentado a precisão dos resultados de PCR comparado àqueles obtidos por métodos convencionais, possibilitando novos caminhos para quantificar fungos ocratoxigênicos em alimentos. A PCR em Tempo Real é mais sensível que a PCR clássica e não requer o uso de eletroforese. A análise pode ser concluída com menos de 5 horas. Este atributo de PCR em Tempo Real reduz significativamente o tempo e o trabalho manual, tornando-se apropriada para análises em grande escala.

O uso de fluoróforos é comum para muitos daqueles métodos e é descrito em detalhes por Boysen et al. (2000). Com a utilização da PCR em Tempo Real é possível detectar um aumento na emissão de fluorescência durante a reação que é teoricamente proporcional a um número inicial de cópias da sequência alvo. A quantidade inicial de DNA molde é inversamente proporcional aos parâmetros medidos em cada reação, o qual é denominado ciclo de *threshold* ( $C_t$ ). O valor de  $C_t$  é o ciclo da PCR em que o sinal da fluorescência ultrapassa o *background* e atinge o *threshold*. A aplicação deste método para amostras naturalmente contaminadas permite uma estimativa do grau de infecção por uma dada espécie.

Pelo fato de *A. westerdijkiae* produzir consistentemente grandes quantidades de OA, Morello et al. (2007) avaliaram o potencial da técnica de PCR em Tempo Real para a quantificação desta espécie em grãos de café. Uma curva padrão de PCR em Tempo Real foi obtida com decréscimo da quantidade inicial de DNA total de *A. westerdijkiae* (20; 10; 5; 1; 0,5 e 0,1 ng por reação) mostrando uma boa correlação ( $r^2 = 0,982$ ). Grãos de café foram inoculados com  $10^6$  conídios de *A. westerdijkiae* e incubados por 192 horas a 28°C. A extração de DNA e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada a cada 48 horas. Uma alta correlação foi observada entre dados de UFC e quantidade de DNA fúngico em grãos de café. A sensibilidade deste método para detectar *A. westerdijkiae* em grãos de café também foi verificada pelos autores. Ao utilizar diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ ) de DNA extraído de grãos de café inoculados após 48 horas de incubação, foi detectado um sinal positivo até a diluição  $10^{-5}$ , o qual significa menos do que 10 cópias e mais que uma única cópia do genoma haplóide de *A. westerdijkiae*. Este valor também significa menos que

10 genomas haplóides por 0,1 gramas de grãos de café. O nível de sensibilidade detectado pela técnica de PCR em Tempo Real foi 100 vezes superior a técnica de UFC.

Uma análise quantitativa de PCR em tempo real foi desenvolvida para detectar e quantificar *A. carbonarius* em uvas como uma possível ferramenta para prever o potencial ocratoxigênico (MULÈ et al. 2006). Os *primers* espécie-específicos e as sondas usadas pelos autores foram derivados de regiões conservadas do gene da calmodulina de *A. carbonarius*. A quantificação do DNA genômico do fungo em uvas contaminadas naturalmente foi desenvolvida usando o fluoróforo TaqMan versus a medida espectrofométrica de DNA (Log10) obtida por curva de calibração com uma amplitude linear de 50 a  $5 \times 10^{-4}$  ng de DNA. Uma correlação positiva ( $r^2=0,92$ ) foi encontrada entre quantidade de DNA de *A. carbonarius* e concentração de OA em amostras de uvas naturalmente contaminadas.

A sensibilidade do método de PCR para detecção de microrganismos é crucial. Infelizmente, não existe padronização nas unidades de descrição de sensibilidade da PCR em Tempo Real. Alguns autores quantificam a sensibilidade como o mínimo de picogramas de DNA que pode ser detectado (BLUHM et al. 2002; SCHMIDT et al. 2004b; PATIÑO et al. 2005) outros quantificam pela porcentagem mínima de grãos infectados em uma amostra (SCHMIDT et al. 2004b), e mais recentemente o número de genomas haplóides foi também usado (MULÈ et al. 2006). Para eliminar incertezas relativas à sensibilidade e permitir a comparação de dados experimentais, um único método para o cálculo da sensibilidade poderia ser adotado. Em nosso ponto de vista, o número de genomas haplóides por grama de uma determinada amostra é a maneira mais conveniente para indicar a sensibilidade da técnica de PCR.

#### **1.1.4 Detecção e quantificação de espécies ocratoxigênicas com o uso de sequências envolvidas em vias biossintéticas de micotoxinas**

Conforme informações baseadas na estrutura da OA a necessidade de várias enzimas envolvidas em reações chave na formação da OA são esperados (LEBRIHI et al. 2003; GEISEN et al. 2004; ATOUI et al. 2006; O'CALLAGHAN et al. 2006; BOGS et al. 2006; BOTTON et al. 2008; BACHA et al. 2009; GALLO et al. 2009). Dentre as enzimas, espera-se uma policetídeo sintase para síntese do grupo dihidroisocumarina da OA, formado



por um pentacetídeo cíclico originado provavelmente de acetato e malonato da via biossintética de policetideos (O'CALLAGHAN et al. 2003).

A diversidade de genes que codificam policetideos sintases em *A. carbonarius* foi investigada por Atoui et al. (2006). Duas sequências não conservadas entre espécies fúngicas no domínio aciltransferase de um gene policetideo sintase, denominado *Ac12RL3*, foram usadas como alvos para a síntese de *primers* apropriados para detecção específica de *A. carbonarius* pelo método da PCR. O *primer*, Ac12RL\_OAF/ Ac12RL\_OAR gerou um produto de PCR de 141 pb em todos os isolados de *A. carbonarius* e resultado positivo não foi observado para nenhuma das outras espécies estudadas (Atoui et al. 2007). A especificidade do par de *primer* foi empregada com sucesso para a quantificação direta de *A. carbonarius* em amostras de uvas.

Com o objetivo de quantificar *A. carbonarius* em amostras de uvas, Atoui et al. (2006) usaram os mesmos *primers* descritos acima (Ac12RL\_OAF/Ac12RL\_OAR) para amplificação via PCR em Tempo Real. Os autores encontraram uma correlação positiva ( $r^2=0.81$ ) entre quantidade de DNA de *A. carbonarius* e concentração de OA em 72 amostras de uvas.

Um sistema baseado em PCR em Tempo Real da sequência *OApksPN* foi usado para monitorar crescimento e produção de OA em *P. nordicum* em trigo (Geisen et al. 2004). Uma forte correlação entre número de cópias do gene *OApksPN* e unidade formadora de colônias (UFC) foi observada pelos autores.

Existem vários métodos analíticos para detecção de OA e o nível desta micotoxina pode realmente ser precisamente medido em alimentos, mas este tipo de análise somente é útil para amostra que a toxina já está presente. Similarmente vários métodos para detecção de espécies ocratoxigênicas tem sido descritos, mas a presença de um fungo ocratoxigênico em uma amostra alimentar não indica a produção de OA. A formação de OA depende fortemente das condições ambientais, tal como substrato, atividade de água, pH e temperatura. Baseado nestes pontos, mais importante para monitorar a magnitude da OA em alimentos ou a presença de uma espécie fúngica em uma dada amostra poderia ser a medida da taxa de expressão de genes micotoxigênicos, porque esses genes são frequentemente expressos alguns dias antes da produção da micotoxina e assim poderia prevenir a produção de OA. Este tipo de análise é mais apropriado como indicativa de risco (SCHMIDT-HEYDT; GEISEN 2007). De acordo com alguns autores a análise da expressão de genes de biossíntese de micotoxinas é uma chave importante, podendo ser útil como ponto de controle crítico em

conceitos de HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) para indústria alimentícia (GEISEN et al. 2004; NIESSEN 2007).

A mais relevante descrição de clonagem e caracterização de um gene policetídeo sintase putativo (*pks*) de *Aspergillus* envolvido na biossíntese de OA foi feita por O'Callaghan et al. (2003). Os autores usaram uma estratégia molecular denominada SSH - Supressão da Hibridação Subtrativa, baseada em PCR. Uma sequência predita de aminoácidos de um clone de 1,4 Kb compartilhou 28–35% de identidade com regiões aciltransferases de genes policetídeo sintase de fungos encontrada nos banco de dados. Baseados em estudos de transcrição reversa os autores mostraram que este gene *pks* é expresso somente sob condições permissivas de OA e somente durante estágios precoces a síntese de micotoxinas. Um mutante no qual o gene *pks* foi interrompido não foi capaz de sintetizar OA. Em seguida, os autores examinaram a produção de OA por *A.ochraceus* cultivado sob diferentes condições ambientais e nutricionais. Quantificações dos transcritos acumulados do gene *pks* mostraram que a transcrição deste gene está ligada a produção de OA (O'CALLAGHAN et al. 2006). Como revisado Niessen (2007), os dados obtidos por O'Callaghan da University College Cork (Ireland) resultaram em uma patente inicial (IE 20030095) e posteriores patentes, mundial (WO 2004/072224) e europeia (IE 20030095). A patente reivindica o uso da sequência para a detecção de produtores de OA e para estratégias de *primer walking*. Entretanto, ela é importante para verificar que este gene é realmente mais expresso por uma linhagem positiva sob condições permissivas de OA, no entanto, nenhuma informação é indicada sobre a expressão deste gene em linhagens não produtoras de OA.

Investigações preliminares desenvolvidas por nosso grupo, mostraram que o gene *pks* descrito por O'Callaghan et al. (2003), é na realidade significativamente mais expresso por *A. westerdijkiae* quando cultivado em condições permissivas para produção de OA, do que quando cultivado em condições restritivas para a produção desta toxina. Entretanto, quando uma linhagem negativa é cultivada em condições permissivas para a produção da OA, o gene *pks* é similarmente expresso, embora não tenha produção de OA (dados não publicados). Este fato, provavelmente ocorre porque outros metabólitos secundários podem compartilhar este gene *pks*. Esta observação significa que a elucidação de genes diferencialmente expressos entre linhagens produtoras de OA e não produtoras ainda é necessária.

Com o uso de *primers* degenerados Geisen et al. (2004) detectaram e caracterizaram uma porção de um gene policetídeo sintase de *Penicillium nordicum*. Todas as linhagens analisadas de *P. nordicum* possuíam o fragmento, entretanto, linhagens relacionadas

à espécie ocratoxigênica *P. verrucosum* não. A análise da expressão deste gene demonstrou que este é altamente induzido sob condições de produção de OA, mas somente para baixos níveis de produção de OA. Além disso, uma forte congruência entre a expressão do gene *OApksPN* e a produção de OA em trigo foi observada pelos autores.

A tecnologia de microarranjos de DNA adequada para analisar a expressão gênica em nível global, pode ser útil para detectar fungos micotoxigênicos antes da produção de micotoxinas. Para este tipo de análise, o RNA mensageiro de uma dada amostra é usado para gerar uma amostra padrão, determinada “alvo”, o qual é hibridizado com um grande número de sequências de DNA, imobilizadas em uma superfície sólida em ordem arranjada. Schmidt-Heydt e Geisen (2007) desenvolveram um microarranjo que contém oligonucleotídeos homólogos para genes de várias espécies de fungos responsáveis para a biossíntese de micotoxinas e conseqüentemente ampla cobertura de genes relevantes para biossíntese de micotoxinas. O microarranjo de DNA desenvolvido por aqueles autores contém oligonucleotídeos para a via biossintética da fumonisina, da aflatoxina, da ocratoxina, do tricoteceno e da patulina.

Uma recente contribuição foi revelada pelo grupo de Fungaro (dados não publicados) que se dedicou a procurar diferenças no genoma de *A.niger*, que poderiam ser úteis para distinguir linhagens toxigênicas de não toxigênicas. O resultado desta busca foi a identificação de um gene *pks* localizado no cromossomo 3 de *A.niger* (depositado no banco de dados do NCBI como An15g07920), específico para linhagens produtoras de OA. Como esta espécie é frequentemente utilizada na indústria alimentícia e encontrada com frequência em produtos agrícolas, o uso deste gene *pks* como um marcador molecular para discriminar linhagens de *A.niger* com habilidade para produzir OA contribuirá para a adoção de medidas de controle de qualidade e prevenção da OA nestes produtos.

### **1.1.5 Cluster gênico e fatores de transcrição: implicações na produção de micotoxinas**

Uma das vantagens inerentes à busca de genes envolvidos na produção de metabólitos secundários e conseqüente busca de marcadores micotoxigênicos específicos é a sua frequente disposição em *clusters*, adjacentes um ao outro nos cromossomos fúngicos. Isto quer dizer que a maioria dos genes que codificam proteínas envolvidas nos diversos passos do processo de biossíntese de uma dada toxina são dispostos lado a lado nos cromossomos

fúngicos. O número de genes que se organizam em um *cluster* é variável entre os metabólitos, com relatos da participação de dois a até vinte genes formando um *cluster* (Keller et al. 2005).

A elucidação de genes de biossíntese de micotoxinas ganhou importantes contribuições nos anos de 1960 com a descoberta da aflatoxina, mas foi somente na década de 1990 que, estudos referentes aos *clusters* gênicos obtiveram maior avanço proporcionado pelas tecnologias de sequenciamento de genomas.

Uma das informações de grande importância obtida com estes estudos foi a conservação e localização dos *clusters* dos genes de biossíntese de micotoxinas, como os genes da biossíntese da aflatoxina e a sua localização em um *cluster* que ocupa uma região genômica de 70Kb, situado próximo ao telômero do cromossomo 3 (WOLOSHUK et al. 1994; BROWN et al. 1996; YU et al. 2000; YU et al. 2004; PAYNE et al. 2006). Outros exemplos são encontrados nas enzimas envolvidas na biossíntese da esterigmatocistina em *A.nidulans* formando um *cluster* gênico de 60Kb e os *clusters* gênicos de 29Kb e 45Kb para a biossíntese de tricoteceno e fumonisina em *Fusarium spotrichioides* (BROWN et al. 2004) e *Fusarium verticillioides*, respectivamente (PROCTOR et al. 2003). A clusterização fez com que diversos modelos tenham surgido para explicar esta disposição dos genes envolvidos em biossíntese de metabólitos secundários em fungos filamentosos.

Um dos primeiros e únicos modelos propostos para a clusterização até o surgimento dos projetos genoma, foi a transferência horizontal de *clusters* provenientes de procariotos. No entanto, este modelo foi comprovadamente aceito apenas para os genes de biossíntese da penicilina (LANDAN et al. 1990). A recente descoberta de elementos transponíveis flanqueando ou inseridos em *clusters* propõe um novo modelo, o qual postula que a formação dos *clusters* seria devido à presença destes elementos no genoma (NIERMAM et al. 2005). Estudos recentes têm demonstrado que, a maioria destes *clusters* gênicos se localiza em regiões cromossômicas subterminais, próximas aos telômeros, como é o caso dos genes de biossíntese da aflatoxina citada acima. As regiões subteloméricas de cromossomos fúngicos são caracterizadas por alta divergência e frequente formação de rearranjos, contendo genes relacionados à especialização de nichos, aplicáveis a regra dos metabólitos secundários, produzidos sob processos adaptativos a determinadas condições ambientais (NIERMAM et al. 2005; GALAGAN et al. 2005; REHMEYER et al. 2006; FAIRHEAD; DUJON, 2006; PERRIN et al. 2007). As análises genômicas comparativas de espécies de *Aspergillus* indicam que as regiões telômero-proximais apresentam alta diversidade de rearranjos não somente entre espécies de *Aspergillus*, mas também entre diferentes linhagens de uma mesma espécie (NIERMAM et al. 2005; RONNING et al. 2005), fato este que contribui no esclarecimento de

diferenças que fazem com que determinada linhagem de uma espécie seja produtora de uma referida micotoxina, enquanto outra não a produz.

Associado à informação de localização subterminal dos *clusters* nos cromossomos, Roze et al. (2007) demonstraram que a organização física dos genes dentro de um *cluster* também apresenta influências quanto à produção de micotoxinas em determinadas linhagens ou espécies. Os autores verificaram que a disposição física dos genes responsáveis pela biossíntese de aflatoxina e esterigmatocistina (ST/AF) em linhagens de *A.nidulans* que não produz nenhuma das micotoxinas, não é a mesma encontrada em linhagens de *A.flavus*, que produzem as duas micotoxinas.

De todas as proposições referentes à localização e funcionalidade dos *clusters* gênicos, a comprovação mais consistente até o momento é de que a funcionalidade dos genes de um *cluster* é mantida em níveis transcricionais, devido a mecanismos de co-regulação de genes. O controle transcricional destes genes estruturais dos *clusters* é mediado por proteínas (fatores de transcrição) que se ligam a regiões específicas nos promotores gênicos de um *cluster*, sendo ativados ou reprimidos simultânea e independentemente de genes fora do *cluster* (KELLER et al. 2005; SHWAB; KELLER 2008). Além disso, a sequência de ligação dos elementos regulatórios nos promotores gênicos, apresentam diferenças quanto a disposição das bases que a compõe, como no caso do regulador transcricional aflR, que embora apresente função conservada em *A.nidulans* e *A.flavus*, não desempenha papel regulatório em *A.nidulans*, devido a diferença de bases que os promotores apresentam em sua região alvo, específica para a ligação dos fatores de transcrição (YU et al. 1996; LEE et al. 2006; CARBONE et al. 2007).

Os fatores de transcrição responsáveis pelo desencadeamento funcional de diversos genes estruturais contidos em *clusters* são agrupados em várias famílias conforme a similaridade de seus domínios em relação à sua interação com o DNA. As famílias mais comuns incluem proteínas binucleares de zinco, *clusters* binucleares de cisteína, receptores de esteróides, homeodomínios, zíper de leucina entre outros. Quanto a sua ação os mecanismos regulatórios dependentes de fatores transcricionais podem funcionar de duas maneiras: através de fatores de transcrição com domínios restritos ou específicos, que geralmente tem regulação positiva com localização na maioria das vezes dentro dos *clusters* e os fatores de domínios amplo ou global, geralmente situados fora dos *clusters*, mas com atuação na regulação de genes dos *clusters*, podendo até mesmo regular com auxílio de moléculas sinalizadoras (proteína G, MAP quinases) que estão sob influência de condições ambientais (temperatura, pH, luz e fontes nutricionais) (KELLER et al. 2005; YU et al. 2005).

Um representante clássico (melhor caracterizado até o momento) é o regulador transcricional aflR, envolvido na biossíntese de aflatoxina e esterigmatocistina. O gene que codifica a proteína regulatória AflR apresenta um domínio binuclear de zinco, característico para interações entre proteína e DNA. A proteína produzida pelo gene *aflR*, enquadra-se nas proteínas binucleares de zinco do tipo  $Zn(II)_2Cys_6$ , que são constituídas por seis resíduos de cisteína ligados a dois átomos de zinco, característica única de proteínas regulatórias restritas a fungos e que contém somente uma unidade *zinc finger* capaz de ligar dois átomos de zinco (MACPHERSON et al. 2006). Estas proteínas são características de vias regulatórias dentro de *clusters*. Um exemplo clássico de *S. cerevisiae* é a proteína GAL4 que é um ativador transcricional de genes envolvidos no catabolismo da galactose (YU et al. 1996; MACPHERSON et al. 2006). Em geral um ou dois átomos de zinco são ligados por resíduos de cisteína ou histidina proporcionando a estabilização do domínio e contribuindo na estrutura e função deste tipo de proteína regulatória (LAITY et al. 2001).

No caso da proteína AflR, a ativação da transcrição ocorre pelo reconhecimento e ligação da proteína binuclear de zinco a uma sequência palindrômica de DNA situada na região promotora do *cluster* gênico da aflatoxina e esterigmatocistina (ST/AF) (PAYNE; BROWN 1998). Estudos demonstraram que a eliminação do gene *aflR* resultou em concomitante perda da transcrição de genes estruturais do *cluster* de ST/AF e consequentemente redução na produção destes metabólitos (YU et al. 1996).

O produto do gene *aflR* está limitado principalmente a regulação de genes estruturais localizados dentro do *cluster* da esterigmatocistina e aflatoxina, exemplo característico de reguladores sob controle transcricional da proteína binuclear de zinco, embora recentemente tenha sido identificados genes no genoma de *A. parasiticus*, situados fora do *cluster* ST/AF, e que estão sob regulação da proteína aflR (PRICE et al. 2006). Similar a este tipo de fator de transcrição encontra-se também a proteína regulatória GliZ de *A. fumigatus* que coordena a expressão de genes do *cluster* da gliotoxina (BOK et al. 2006), a proteína MclR de *Penicillium citrinum* co-regulando genes da biossíntese da compactina (ABE et al. 2002), o fator de transcrição ZFR1 e Fum21 regulando genes do *cluster* da fumonisina em *Fusarium verticillioides* (FLAHERTY; WOLOSHUK 2004; BROWN et al. 2007).

O outro mecanismo de regulação transcricional, de domínio amplo ou global, é caracterizado pelo fator de transcrição do tipo  $Cys_2His_2$ . Estas proteínas  $Cys_2His_2$  também referidas como proteínas binucleares de zinco, constituem o tipo mais frequente de fator de transcrição em eucariotos, encontrada desde leveduras até humanos (MACPHERSON

et al. 2006). Este tipo de fator de transcrição pode atuar regulando metabólitos secundários positiva ou negativamente, e os genes co-regulados por estes fatores podem ser localizados dentro ou fora do *cluster* de metabólitos secundários (PROCTOR et al. 1995).

Exemplos de proteínas regulatórias com domínio Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> foi encontrado em *Fusarium sporotrichioides*, tal como a proteína Tri6 que regula a produção de tricoteceno (PROCTOR et al. 1995), proteína ToxE que regula a produção de HC-toxina de *Cochliobolus carbonum* (PEDLEY; WALTON 2001), e proteínas CreA, AreA e PacC regulatórias em resposta a fatores ambientais como fontes de carbono, nitrogênio e pH, respectivamente (DOWZER; KELLY 1989; TILBURN et al. 1995; WILSON et al. 1998; CHANG et al. 2000).

A regulação sob controle externo ou global em fungos, em muitos casos faz uso de moléculas sinalizadoras, os chamados pontos juncionais, que são proteínas comuns no mecanismo regulatório envolvendo mais de um processo celular. Os fatores de transcrição que atuam como sinalizadores de regulação global, geralmente participam da regulação transcricional de processos acoplados à produção e ou inibição de micotoxinas com desenvolvimento sexual e/ou assexual do fungo. Em fungos filamentosos os primeiros relatos inerentes à relação existente entre desenvolvimento e produção de micotoxinas, ocorreram a partir de 1997 quando Hick et al. (1997) descreveram a atuação da proteína G como uma molécula sinalizadora em *A. nidulans*, desencadeando a expressão de genes referentes à esporulação assexual e produção de metabólitos secundários.

Em anos subsequentes, diversos trabalhos foram desenvolvidos com a finalidade de conhecer como estas moléculas sinalizadoras interagem no processo regulatório. A proteína G, uma proteína de transcrição global e comum para uma variedade de eucariotos é formada por três subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e encontra-se acoplada a um receptor GPCR. A ativação da proteína ocorre quando o receptor GPCR catalisa GTP a GDP, dissociando a subunidade  $\alpha$  da proteína G. Esta dissociação promove a sinalização de uma grande variedade de mensageiros secundários que são responsáveis por iniciar diversas respostas celulares (MORRIS; MALBON 1999). Em fungos, a sinalização mediada pela dissociação da subunidade  $\alpha$  da proteína G, chamada de FadA, promove uma cascata de eventos *downstream* por duas vias sinalizadoras iniciadas por moléculas de adenilato ciclase e proteína quinase (PKA), ou então, pelas moléculas adenilato ciclase e uma cascata de proteínas quinases ativadoras mitogênicas (MAPK) (BOLKER 1998). A proteína G também está sob controle *upstream*, participando deste processo diversos elementos como as proteínas sinalizadoras RGS, que funcionam aumentando a atividade GTPase na subunidade  $G\alpha$  (FadA), resultando

em maior taxa de hidrólise de GTP a GDP nesta subunidade. Desta forma, os elementos *upstream* à proteína G, contribuem para a coordenação funcional e global de processos biológicos fundamentais que são desencadeados *downstream* à dissociação da proteína G como o crescimento vegetativo, esporulação, produção de pigmentos, micotoxinas e patogenicidade (LENGELER et al. 2000; CHIDIAC e Roy 2003).

EM espécies de *Aspergillus*, a proteína G possui papel essencial coordenando o crescimento da hifa, desenvolvimento sexual/assexual e produção de metabólitos secundários. A dissociação de FadA da proteína G, ativa moléculas efetoras *downstream* para proliferação inibindo o desenvolvimento sexual e ou assexual e como consequência bloqueando a produção de micotoxinas. Como resposta a este processo, entram em ação proteínas responsáveis pela atenuação da dissociação de FadA. A proteína FlbA, é um tipo de proteína RGS (atenuadora), cuja ação se dá *upstream* a proteína G. Esta proteína FlbA, aumenta a atividade GTPase tornando FadA inativo (HICKS et al. 1997; LENGELER et al. 2000). A perda de função do gene *flbA* resulta em colônias conhecidas como fenótipos *fluffy*, deficientes na formação de conidióforos e somente com crescimento vegetativo. O gene *brlA* codifica um regulador de transcrição que governa a ativação de genes responsáveis pelo desenvolvimento e formação do conidióforo. O fenótipo *fluffy* é caracterizado por seis genes do qual dois genes *fluG* e *flbA* foram encontrados estarem envolvidos na regulação do desenvolvimento assexual e produção de esterigmatocistina em *A.nidulans*, com o gene *fluG* agindo *upstream* ao gene *flbA* (WIESER et al. 1994). No entanto, o gene *fluG* está envolvido na síntese de uma proteína extracelular que ativa a produção de esterigmatocistina e conidiação, mas a superexpressão do gene *fluG* induz a expressão do gene *brlA* e consequente conidiação, mas não induz a produção de esterigmatocistina indicando que existem elementos regulatórios *upstream* à proteína G e independentes do gene *fluG* que são ativados para a produção desta micotoxina (HICKS et al. 1997). Esta via de regulação com a participação da proteína G atuando como uma molécula juncional, responsável tanto pela regulação do crescimento vegetativo ou desenvolvimento sexual/assexual como a produção de micotoxinas se constitui em uma das melhores caracterizações de reguladores de transcrição com atuação global.

Uma outra via sinalizadora de regulação global parece envolver processos de remodelagem cromossômica, embasada em eventos epigenéticos. O representante característico dos reguladores globais de metabólitos secundários é o fator de transcrição nuclear LaeA de *A. nidulans*. A proteína regulatória LaeA foi recentemente sugerida participar de eventos de remodelagem da cromatina de *clusters* de metabólitos, devido a sua



homologia com metiltransferases histônicas (BOK; KELLER 2004; YU; KELLER 2005). Dados recentes, revelam que a deleção de um gene que codifica uma histona deacetilase (HdaA) em *A.nidulans*, causou uma elevada e precoce expressão de genes de pequenos *clusters* situados em regiões telômero-proximais, além de potencializar a produção de esterigmatocistina e penicilina (SHWAB et al. 2007). Segundo a revisão de Brosh et al. 2008, análises subsequentes de regiões flangeadoras aos *clusters* gênicos não foram afetadas nas linhagens mutantes, sugerindo que a supressão transcricional é estritamente direcionada. Em um outro estudo realizado por Roze et al. (2007), eles observaram que durante a transcrição de genes da aflatoxina, a acetilação da histona H4 foi significativamente maior em regiões correspondentes aos sítios promotores dos genes do *cluster* biossintético de aflatoxina em *A. parasiticus*.

Em fungos filamentosos, os processos regulatórios transcricionais mediados por eventos epigenéticos como a modulação da cromatina, envolve a interação de domínios presentes em proteínas que atuam como fatores de transcrição. Como exemplo encontram-se as proteínas com domínios jumonji C (JmjC) em mamíferos, identificada como enzima de desmetilação histônica de resíduos de lisina. Homólogos aos domínios JmjC são os homeodomínios de plantas (PHD). Os domínios PHD também conhecidos como PHD *fingers* localizados em proteínas nucleares, apresentam regiões características de proteínas do tipo *zinc finger* C<sub>4</sub>HC<sub>3</sub>, uma variante do tradicional C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (Mellor et al. 2006). No entanto, em fungos filamentosos os estudos relativos aos domínios JmjC e PHD não são suficientes para esclarecer quais domínios são responsáveis pela remodelagem da cromatina (MELLOR 2006; BIENZ 2006; BROSCHE et al. 2008).

Os processos regulatórios em fungos filamentosos são dependentes não somente dos fatores genéticos, mas da associação destes fatores com os fatores ambientais, tipicamente transmitidos através de moléculas sinalizadoras como as proteínas binucleares de zinco do tipo Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> (HYNES 1975; DOWZER; KELLY 1989; TILBURN et al., 1995).

Um dos exemplos de regulação sob influências ambientais que vem sendo caracterizado, é o da proteína velvet (VeA) em *A.nidulans*, cujo gene *veA* é necessário para a produção de escleródio (KATO et al. 2003). Em condições de luz, os níveis da proteína VeA são baixos, e como consequência o desenvolvimento assexuado é induzido e genes de biossíntese de ST são reprimidos. Em contraste, na ausência de luz os níveis da proteína VeA são altos e esta proteína age como uma “ponte” entre as proteínas LaeA e VelB, formando um complexo heterotrimérico que induz genes envolvidos na biossíntese de ST (BAYRAM et al. 2008).

Influenciado por variações de pH encontra-se a proteína regulatória PacC que em pHs ácidos apresenta uma conformação inativa e é incapaz de se ligar ao sítio alvo. Em pHs alcalinos, esta proteína é clivada produzindo uma forma ativa. A forma ativa pode se ligar a promotores de genes alvo, ativando a expressão de alguns genes e reprimindo a expressão de outros (genes que se expressam em pHs ácidos) (KELLER; HOHN 1997; ESPESO et al. 2000). Ehrlich et al. (1999), mostrou que as regiões promotoras do gene *aflR* de *A.parasiticus* contem pelo menos um sítio putativo de ligação a PacC, mostrando a possibilidade da regulação da AF/ST pela proteína PacC. A proteína PacC também foi encontrada como um regulador de genes envolvidos na produção de penicilina. Em pHs elevados, PacC ativa a expressão do gene isopenicilina N sintase, envolvido na biossíntese deste metabólito (ESPESO et al. 1993; TILBURN et al. 1995).

Uma outra proteína conhecida como AreA também participa do processo regulatório mediante fontes nutricionais. AreA é uma proteína repressora de ação positiva de genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio. O fator de transcrição GATA reconhece sequências específicas em regiões promotoras de genes sob este controle (WILSON; ARST 1998). Apesar do pouco conhecimento relativo à participação do gene *AreA* nos processos regulatórios, sabe-se que em *A.parasiticus*, AreA se liga a uma região localizada entre o genes *aflR* e *aflJ* (CHANG et al. 2000) e segundo Liu e Chu (1998), a expressão do gene *aflR* neste fungo foi inibida com a adição de nitrato. Em *Fusarium verticillioides* também foi demonstrado que a produção de fumonisina 1 está sob controle do gene *AreA* (KIM; WOLOSHUK 2008).

A diversidade de fatores influenciando a regulação da produção de micotoxinas reflete a ampla complexidade e versatilidade que os fungos apresentam para se adaptarem às diferentes condições de sobrevivência. Até o momento, nenhum dos genes comprovadamente descritos está envolvido na regulação de genes estruturais da biossíntese da OA. Os únicos relatos existentes de possíveis genes envolvidos na regulação da produção de OA foram obtidos por Färber e Geisen (2004) e Botton et al. (2008). Nestes estudos os autores encontraram fragmentos parciais de genes com similaridade a fatores de transcrição sob condições permissivas e ou restritivas à produção de OA, no entanto, nenhum estudo foi conduzido a fim e comprovar o envolvimento destes genes na regulação da OA.

As contribuições obtidas nos últimos cinco anos têm proporcionado grandes avanços inerentes à elucidação de genes envolvidos na biossíntese desta micotoxina. As inúmeras informações geradas com o sequenciamento de genomas associados a ampla variedade de tecnologias moleculares, envolvendo a detecção e quantificação de transcritos e

proteínas diferencialmente expressos, revelam uma visão otimista quanto à completa elucidação da via biossintética da OA e consequente desenvolvimento de metodologias passíveis de controlar a entrada de ocratoxina A na cadeia alimentar.

## 1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y.; ONO, C.; HOSOBUCHI, M.; YOSHIKAWA, H. Functional analysis of *mlcR*, a regulatory gene for ML-236B (compactin) biosynthesis in *Penicillium citrinum*. **Molecular Genetics and Genomics**, v.268, p.352-361, 2002.

ACCENSI, F.; CAÑO, J.; FIGUEIRA, L.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. **FEMS Microbiology Letters**, v.180, p.191-196, 1999.

ACCENSI, F.; ABARCA, M.L.; CAÑO, J.; FIGUEIRA, L.; CABAÑES, F.J. Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.79, p.365-370, 2001.

ATOUI, A.; DAO, P.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A. Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.50, p.448-493, 2006.

ATOUI, A.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. **International of Food microbiology**, v.115, p.313-318, 2007.

BACHA, N.; ATOUI, A.; MATHIEU, F.; LIBOZ, T.; LEBRIHI, A. *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene “*aoks1*” is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. **Fungal Genetics and Biology**, v.46, p.2423-2427, 2009.

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

BATTILANI, P.; PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; LANGUISCO, L.; GIORNI, P.; KOZAKIEWICZ, Z. Occurrence of ochratoxin A - producing fungi in grapes grown in Italy. **Journal of Food Protection**, v.66, p.633-636, 2003.

BAYMAN, P.; BAKER, J.L.; DOSTER, M.A.; MICHAILIDES, T.J.; MAHONEY, N.E. Ochratoxin production by the species *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2326–2329, 2002.

BAYRAM, O.; KRAPPMANN, S.; NI, M.; BOK, J.W.; HELMSTAEDT, K.; VALERIUS, O.; BRAUS-STROMEYER, KWON, N.; KELLER, N.P.; YU, J-H.; BRAUSI, G.H. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. **Science**, v.320, p.1504-1506, 2008.

BENNETT, J.W.; CIEGLER, A. **Secondary metabolism and differentiation in fungi**. Marcel Dekker Inc., 1983.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.497-516, 2003.

BIENZ, M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. **Trends in Biochemical Sciences**, v.31, p.35-40, 2006.

BLUHM, B.H.; FLAHERTY, J.E.; COUSIN, M.A.; WOLOSHUK, C.P. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene and fumonisin producing species of *Fusarium* in corn meal. **Journal of Food Protection**, v.65, p.1955-1961, 2002.

BOGS, C.; BATTILANI, P.; GEISEN, R. Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p.39-47, 2006.

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

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

BÖLKER, M. Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v.25, p.143-156, 1998.

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

BOYSEN, M.E.; JACOBSEN, J.; SCHNURER, J. Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1523-1526, 2000.

BROSCH, G.; LOIDL, P.; GRAESSLE, S. Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v.32, p. 409-439, 2008.

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

BROWN, D.W.; DYER, R.B.; MACCORMICK, S.P.; KENDRA, D.F.; PLATTNER, R.D. Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. **Fungal Genetics and Biology**, v.41, p.454-462, 2004.

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

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

CARBONE, I.; RAMIREZ-PRADO, J.H.; JAKOBEK, J.L.; HORN, B.W. Gene duplication modularity and adaptation in the evolution of the aflatoxin gene cluster. **BMC Evolutionary Biology**, v.7, p.111, 2007.

CARTER, P.N.; VETRIE, D. Applications of genomic microarrays to explore human chromosome structure and function. **Human Molecular Genetics**, v.13, p.297-302, 2004.

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

CHANG, P.K.; YU, J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E. Characterization of the *Aspergillus parasiticus* major nitrogen regulatory gene area. **Biochemica and Biophysica Acta**, v.1491, p.263-266, 2000.

CHIDIAC, P.; ROY, A.A. Activity, regulation, and intracellular localization of RGS proteins. **Receptors Channels**, v.9, p135-147, 2003.

COMMISSION REGULATION No. 1881/2006 Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L 364/4-364/24. CX/CF 08/2/1, 19 December 2006.

DOWZER, C.E.; KELLY, J.M. Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. **Current Genetics**, v.15, p.457-459, 1989.

EHRlich, K.C.; MONTALBANO, B.G.; CARY, J.W. Binding of the C6-zinc cluster protein, AflR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. **Gene**, v.230, p.249-257, 1999.

ESPESO, E.A.; TILBURN, J.; ARST, H.N.J.; PEÑALVA, M.A. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. **EMBO Journal**, v.12, p.3947-3956, 1993.

ESPESO, E.A.; RONCAL, T.; DIEZ, E.; RAINBOW, I.; BIGNELL, E.; ALVARO, J.; SUAREZ, T.; DENISON, S.H.; TILBURN, J.; ARST, H.N.J.; PEÑALVA, M.A. On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. **EMBO Journal**, v.19, p.719-728, 2000.

FAIRHEAD, C.; DUJON, B. Structure of *Kluyveromyces lactis* sub-telomeres: duplications and gene content. **FEMS Yeast Research**, v.6, p.428-441, 2006.

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

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

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

FUNGARO, M.H.P.; VISSOTTO, P.C.; SARTORI, D.; VILAS-BOAS, L.A.; FURLANETO, M.C.; TANIWAKI, M.H. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. **Current in Microbiology**, v.49, p.123-127, 2004a.

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**, v.50, p.985-988, 2004b.

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

GALAGAN, J.E.; CALVO, S.E.; CUOMO, C.; MA, L.J.; WORTMAN, J.R. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A.fumigatus* and *A.oryzae*. **Nature**, v.438, p.1105-1115, 2005.

GEISEN, R. PCR methods for the detection of mycotoxin producing fungi. In: BRIDGE, P.D.; ARORA, K.K.; REDDY, C.A.; ELANDER, R.P. (eds) **Applications of PCR in micology**. Cambridge, UK: CAB International, 1998, p.243-266.

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

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

HILL, W.E. The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, p.123-173, 1996.

HYNES, M.J. Studies on the role of the *areA* gene in the regulation of nitrogen catabolism in *Aspergillus nidulans*. **Australian Journal of Biological Science**, v.28, p.301-313, 1975.

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

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

JORGENSEN, K.; JACOBSEN, J.S. Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992-1999. **Food Additives and Contaminants**, v.19, p.1184-1189, 2002.

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

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

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

KHALDI, N.; COLLEMARE, J.; LEBRUN, M.; WOLFE, K.H. Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi. **Genome Biology**, v.9, p.R18.1-R18.10, 2008.

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

LAITY, J.H.; LEE, B.M.; WRIGHT, P.E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. **Current Opinion of Structure Biology**, v.11, p.39-46, 2001.

LANDAN, G.; COHEN, G.; AHARONOWITZ, Y.; SHUALI, Y.; GRAUR, D.; SHIFFMAN, D. Evolution of isopenicillin N synthase genes may have involved horizontal gene transfer. **Molecular Biology and Evolution**, v.7, p.399-947, 1990.

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

LEBRIHI, A.; MATHIEU, F.; BORGIDA, L.P.; GUYONVARCH, A.M. **Method for the detection of ochratoxin A or citrinin-producing fungi**. European patent n°. EP1329521, 2003.



LEE, C.Z.; LIOU, G.Y.; YUAN, G.F. Comparison of the *aflR* gene sequences of strains in *Aspergillus* section *Flavi*. **Microbiology**, v.152, p.161-170, 2006.

LENGELER, K.B.; DAVIDSON, R.C.; D'SOUZA, C.; HARASHIMA, T.; SHEN, W.C.; Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.746-785, 2000.

LIU, B.H.; CHU, F.S. Regulation of *aflR* and its product, *AflR* associated with aflatoxin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3718-3723, 1998.

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

MAAROUFI, K.; ACHOUR, A.; BETBEDER, A.M.; HAMMAMI, M.; ELLOUZ, F.; CREPPY, E.E.; BACHA, H. Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. **Archives in Toxicology**, v.69, p.552-558, 1995.

MACPHERSON, S.; LAROCHELLE, M.; TURCOTTE, B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.70, p.583-604, 2006.

MANTLE, P.G.; MCHUGH, K.M. Nephrotoxic fungi in foods from nephropathy households in Bulgaria. **Mycological Research**, v.97, p.205-212, 1993.

MEDINA, A.; MATEO, R.; LÓPEZ-OCAÑA, L.; VALLE-ALGARRA, F.M.; JIMENEZ, M. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4696-4702, 2005.

MELLOR, J. It takes a PHD to read the histone code. **Cell**, v.126, p.22-24, 2006.

MORELLO, L.G.; SARTORI, D.; MARTINEZ, A.L.O.; VIEIRA, M.L.C.; TANIWAKI, M.H.; FUNGARO, M.H.P. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of  $\beta$ -tubulin gene by using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.270-276, 2007.

MORRIS, A.J.; MALBON, C.C. Physiological regulation of G protein-linked signaling. **Physiological Reviews**, v.79, p.1373-1430, 1999.

MULÉ, G.; SUSCA, A.; LOGRIECO, A.; STEA, G.; VISCONTI, A. Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. **International Journal of Food Microbiology**, p.S28-S34, 2006.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.155, p.335-335, 1987.

NIERMAN, W.C.; PAIN, A.; ANDERSON, M.J.; WORTMAN, J.R.; KIM, H.S. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v.438, p.1151-1156, 2005.

NIESSEN, L. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.38-46, 2007.

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

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

PARENICOVÁ, L.; SKOUBOE, P.; FRISVAD, J.; SAMSON, R.; ROSSEN, L.; HOOR-SUYKERBYUK, M.T.; VISSER, J. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.521-527, 2001.

PATIÑO, B.; GONZÁLEZ-SALGADO, A.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T.; VÁZQUEZ, C. PCR detection assays for the ochratoxin producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, p.207-214, 2005.

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

PAYNE, G.A.; NIERMAN, W.C.; WORTMAN, J.R.; PRITCHARD, B.I.; BROWN, D.; DEAN, R.A.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E.; MASHIDA, M.; YU, J.J. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A.oryzae*. **Medical Mycology**, v.44, p.9-11, 2006.

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

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

PERRONE, G.; SUSCA, A.; STEA, G.; MULÉ, G. PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p.641-649, 2004.

PERRONE, G.; MULÉ, G.; SUSCA, A.; BATTILANI, P.; PIETRI, A.; LOGRIECO, A. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.680-685, 2006.

PETZINGER, E.; WEINDENBACH, A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. **Livestock Production Science**, v.76, p.245-250, 2002.

PITT, J.L.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. Blackie Academic and Professional, London, 1997.

PRICE, M.S.; YU, J.H.; NIERMAN, W.C.; KIM, H.S.; PRITCHARD, B.; JACOBUS, C.A.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E.; PAYNE, G.A. The aflatoxin pathway regulator AflR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. **FEMS Microbiology Letters**, v.255, p.275-279, 2006.

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

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

REHMEYER, C.; LI, W.; KUSABA, M.; KIM, Y.S.; BROWN, D.; STABEN, C.; DEAN, R.; FARMAN, M. Organization of chromosome ends in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. **Nucleic Acids Research**, v.34, p.4685-4701, 2006.

RONNING, C.M.; FEDOVORA, N.D.; BOWYER, P.; COULSON, R.; GOLDMAN, G.; KIM, H.S.; TURNER, G.; WORTMAN, J.R.; YU, J.; ANDERSON, M.J.; DENNING, D.W.; NIERMAN, W.C. Genomics of *Aspergillus fumigatus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.22, p.223-228, 2005.

ROZE, L.V.; ARTHUR, A.E.; HONG, S.Y.; CHANDA, A.; LINZ, J.E. The initiation and pattern of spread of histone H4 acetylation parallel the order of transcriptional activation of genes in the aflatoxin cluster. **Molecular Microbiology**, v.66, p.713-726, 2007.

RUSSELL, R.; PATERSON, M. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. **Process Biochemistry**, v.41, p.1467-1474, 2006.

SAIKI, R.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.; HORN, G.T.; EHRlich, H.A.; ARNHEIM, M. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.239, p.487-491, 1985.

SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.A.M.P.; KUJIPERS, A.F.A.; FRANK, J.M.; FRISVAD, J.C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v.50, p.45-61, 2004.

SAMSON, R.A.; NOOMIN, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. **Studies in Mycology**, v.59, p.129-145, 2007.

SARTORI, D.; FURLANETO, M.C.; MARTINS, M.K.; PAULA, M.R.F.; PIZZIRANI-KLEINER, A.; TANIWAKI, M.H.; FUNGARO, M.H.P. PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. **Research in Microbiology**, v.157, p.350-354, 2006.

SCHMIDT, 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. **Systematic Applied and Microbiology**, v.26, p.138-146, 2003.

SCHMIDT, H.; TANIWAKI, M.H.; VOGEL, R.F.; NIESSEN, L. Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.899-909, 2004a.

SCHMIDT, H.; BANNIER, M.; VOGEL, R.F.; NIESSEN, L. Detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* in green coffee by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, p.464-469, 2004b.

SCHMIDT-HEYDT, M.; GEISEN, R. A microarray for monitoring the production of mycotoxins in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p.131-140, 2007.

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

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

SHWAB, E.K.; BOK, J.W.; TRIBUS, M.; GALEHR, J.; GRAESSLE, S. Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. **Eukariotic Cell**, v.6, p.1656-1664, 2007.

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

TILBURN, J.; SARKAR, S.; WIDDICK, D.A.; ESPESO, E.A.; OREJAS, M. The *Aspergillus* PacC zinc-finger transcription factor mediates regulation of both acid-expressed and alkaline-expressed genes by ambient pH. **EMBO Journal**, v.14, p.779-790, 1995.

UENO, Y.; KAWAKURA, O.; SUGIURA, Y.; HORIGUCHI, K.; NAKAJIMA, M.; YAMAMOTO, K.; SATO, S. Use of monoclonal antibodies enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera coffee products and toxin-producing fungi. In: CASTEGNERO, M.; PLESTINA, R.; DIRHEIMER, G.; CHERNOZEMSKY, I.N.; BARTSCH, H. (eds), **Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours**, IARC – Sci. – Publ., Lyon, France, 1991, p.71-75.

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**, v.205, p.1112-1113, 1965.

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

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CEWNTONZE, G. Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis with fluorometric detection: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.8, p.1818-1827, 2001.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.

VRIES, R.P. de; FRISVAD, J.C.; VAN DE VONDERVOORT, P.J.I.; BURGERS, K.; KUIJPERS, A.F.A.; SAMSON, R.A.; VISSER, J. *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.87, p.195-203, 2005.

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

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

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

WAFI, E.W.; YAHYA, R.S.; SOBH, M.A.; ERAKY, I.; EL-BAZ, M.; EL-GAYAR, H.A.; BEBBEDER, A.M.; CREPPY, E.E. Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study. **Human & Experimental Toxicology**, v.17, p.124-129, 1998.

WIESER, J.; LEE, B.N.; FONDON, J.W.; ADAMS, T.H. Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics**, v.27, p.62-69, 1994.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6536, 1990.

WILSON, R.A.; ARST, H.N.; Mutational analysis of AREA, a transcriptional activator mediating nitrogen metabolic repression in *Aspergillus nidulans* and a member of the "streetwise" GATA family of transcription factor. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.586-597, 1998.

WOLFF, J.; BRESCH, H.; CHOLMAKOV-BODECHTEL, C.; ENGEL, G.; GARAI, M.; MAJERUS, P.; ROSNER, H.; SCHEUR, R. Ochratoxin A: contamination of foods and consumer exposure. **Archives für Lebensmittelhygiene**, v.51, p.81-128, 2000.

WOLOSHUK, C.P.; FOUTZ, K.R.; BREWER, J.F.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E.; PAYNE, G.A. Molecular characterization of aflR, a regulatory *locus* for aflatoxin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.2408-2414, 1994.

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo o isolamento e a identificação de transcritos gênicos diferencialmente expressos entre a linhagem produtora (UEL91) de *A. westerdijkiae* e a não produtora (ITAL163) de ocratoxina A (OA) em meio permissivo à produção da referida toxina; também, a validação da expressão diferencial de três genes identificados como potencialmente envolvidos na biossíntese de OA e a averiguação da associação entre o nível de transcrição destes genes com a quantidade de OA produzida em diferentes meios de cultura.

Como segundo objetivo, este estudo visou à caracterização do gene interrompido em um mutante de *A. westerdijkiae* (ITAL142-T10), obtido em trabalho prévio por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, com reduzida capacidade de produção de OA e a realização de proteômica comparativa entre a linhagem selvagem (ITAL142) e o referido mutante. Considerando que o gene nocauteado no mutante é um possível regulador de transcrição global (*rum1*), este procedimento tinha por objetivo a identificação de proteínas e seus respectivos genes que estão sob controle do fator de transcrição *rum1*.



### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão deste trabalho serão apresentados na forma de artigos científicos.

**3.1 ARTIGO I: Identification of genes differentially expressed between ochratoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus westerdijkae***

Artigo enviado ao periódico científico: *Research in Microbiology*.

**Identification of genes differentially expressed between ochratoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus westerdijkae***

**Daniele Sartori<sup>a</sup>, Augusto Schrank<sup>b</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>b</sup>, Marta Hiromi Taniwaki<sup>c</sup>, Elisa Yoko Hirooka<sup>a</sup>, Elisabete Yurie Sataque Ono<sup>a</sup>, Maria Angélica Ehara Watanabe<sup>a</sup>, Maria Helena P. Fungaro<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup>*Universidade Estadual de Londrina, P.O. Box 6001, 86051-990, Londrina, Brazil; Zip code 86051-990, E-mail: [fungaro@uel.br](mailto:fungaro@uel.br), Tel: 55-43-3371-5731*

<sup>b</sup>*Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P.O. Box 15005, 91501-970, Porto Alegre, Brazil;*

<sup>c</sup>*Instituto de Tecnologia de Alimentos, P.O. Box 139, 13073-001, Campinas, Brazil.*

\*corresponding author

### 3.1.1 ABSTRACT

Approximately 70% of *Aspergillus westerdijkiae* strains are able to produce ochratoxin A (OA), a nephrotoxic and carcinogenic mycotoxin that has been found in cereal and food commodities, such as coffee, beer and wine. Despite its importance, there is presently no information available about which genes are differentially expressed between ochratoxin-producing and non-producing strains or on the regulation of the ochratoxin genes. Using a Representational Difference Analysis (RDA) approach, we identified two genes encoding oxidoreductases (P450-AL and OXI-1) that are differentially expressed between OA-producing and non-producing strains of *A. westerdijkiae*. In addition, we observed that the relative expression of the P450-AL and OXI-1 genes by an OA producer strain was 18 and 1.8-fold higher respectively when grown in a permissive medium compared to a restrictive one.

*Keywords:* ochratoxin; *Aspergillus westerdijkiae*; RDA; oxidoreductases

### 3.1.2 INTRODUCTION

*Aspergillus westerdijkiae* is a new species of fungus that was dismembered from the *Aspergillus ochraceus* taxa [8]. Several strains of *A. westerdijkiae* produce ochratoxin A (OA), a nephrotoxic and carcinogenic mycotoxin that has been found in cereal and food commodities such as coffee, beer and wine. Contamination of coffee beans with OA was first reported in 1974 [13] and has been subsequently confirmed by several other reports. More recently, our group found that *A. westerdijkiae* is the main OA producing species found in Brazilian coffee beans (*Coffea arabica*) [17].

Several methods for the detection of ochratoxigenic species, including *A. westerdijkiae*, have recently been described [3,9,10,17,19,25]. However, the presence of an ochratoxigenic fungal species in a sample does not necessarily mean that the toxin itself is present. As is the case with other mycotoxins, the substrate upon which the fungus grows, as well as the moisture content and temperature can determine whether the mycotoxin will be produced. Moreover, there are considerable differences between strains of ochratoxigenic species with respect to their ability to produce toxin. We have previously shown that 30% of *A. westerdijkiae* strains isolated from coffee beans are unable to produce detectable amounts of OA [17].

As previously proposed [10,20,26], the ability to assay for the expression of key genes involved in mycotoxin production would be advantageous for monitoring the presence of OA in foods because gene expression usually occurs prior to the production of toxin and would consequently enable early detection and warning about potential contamination. Therefore, the identification and characterization of genes related to OA biosynthesis has been pursued by different laboratories [2,5,10,12,21].

OA is a polyketide-derived secondary metabolite consisting of a chlorinated isocoumarin derivative linked to L-phenylalanine [18]. Despite its importance, the OA

biosynthetic pathway is poorly understood. Polyketides are a large class of secondary metabolites assembled by the activity of polyketide synthases (PKS) via a common mechanism that involves the sequential condensation of small carboxylic acids. Important functional groups are added to polyketide skeletons in post-PKS tailoring steps to complete the final molecules [6,23]. Only portions of three genes thought to be involved in the OA biosynthesis pathway, one polyketide synthase and two P450 monooxygenases, have been cloned and sequenced [21,22]. Furthermore, there is currently no information available about which genes are differentially expressed in ochratoxin-producing and non-producing strains, or about the regulation of the ochratoxin genes.

Representational Difference Analysis (RDA), as first described by Lisitsyn et al. [14], is a powerful differential hybridization method used to identify unique DNA sequences between two complex and highly related genomes. This approach was successfully adapted by Hubank and Schatz [11] for the identification of specific differentially expressed genes (cDNA RDA), and it has been employed for expression profiling in fungi species [4,7,16,24].

In the present study, our aim was to identify differences in gene expression between *A. westerdijkiae* OA-producing and non-producing strains grown under permissive conditions for OA production.

### **3.1.3 MATERIALS AND METHODS**

#### *3.1.3.1 Strains and culture conditions*

The *Aspergillus westerdijkiae* strains UEL91 (OA producer) and ITAL163 (OA non-producer) were used for the construction of the RDA library. Both strains were isolated from Brazilian coffee beans [9,28] and maintained on potato dextrose agar. For the construction of

the RDA library, conidia were inoculated (at an approximate density of  $10^7$  mL<sup>-1</sup>) into 250-mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of yeast extract-sucrose medium (YES). The strains were grown at 25 °C for 96 h in darkness without shaking. Mycelia were harvested by filtration, washed with distilled water, and immediately frozen in liquid nitrogen prior to RNA extraction. An aliquot of YES medium was simultaneously collected and further analyzed for the presence of OA.

#### *3.1.3.2 Kinetic studies of ochratoxin A production by UEL91 strain*

For kinetic studies of OA production in the UEL91 strain, a 100 µL aliquot of the culture spore suspension ( $10^7$  spores mL<sup>-1</sup>) was transferred to 100 mL of YES. The flasks were incubated in darkness at 25 °C for 2, 4, 6, 8, or 10 days. After each time point, the OA content of culture broths was measured by high performance liquid chromatography. Based on the results of this trial, all strains utilized in this study were cultivated in YES media for 96 hours. The mycelia were used for mRNA extraction and aliquots of the supernatant were used for OA quantification.

#### *3.1.3.3 OA analysis*

To extract OA, an aliquot of 200 µL of the culture was mixed with 800 µL of methanol and vortexed. After 10 min, the extracts were filtered (Millex HV 0.2 µm, Millipore JBR610245) and used for OA determination. OA was analyzed by a reversed-phase isocratic HPLC system (LC10-AD pump, RF 535 fluorescence detector, Shimadzu, Japan) using a Nucleosil 100 C18 column (5 µm, 4 x 250 mm, Merck, Germany). Excitation and emission wavelengths were 335 and 475 nm, respectively. The mobile phase was

acetonitrile/water/acetic acid (99:99:2) pH 3.0 and the flow rate was 0.80 mL min<sup>-1</sup>. OA concentration was determined using a standard curve ranging from 10 to 100 ng/mL.

#### 3.1.3.4 cDNA subtracted library

After the UEL91 and ITAL163 strains were grown for 96 hours at 25 °C in YES medium, an aliquot of medium (200 µL) from each was recovered and used for determination of OA production as described above. Mycelia were frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder in a mortar. This powder was used for isolation of total RNA as described by Sokolovsky et al. [27]. cDNA was prepared from total RNA using the SMART PCR Synthesis Kit (Clontech Laboratories) according to the manufacturer's instructions. As recommended by the manufacturer, the first strand cDNA synthesis was performed with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies) using 1 µg of total RNA as the template. An aliquot of 5 µL of first strand cDNA was used as the template for the second strand synthesis.

The RDA was performed according to a modification of the protocol previously described by Dutra et al. [7]. Briefly, cDNA from an OA producing strain (UEL91) was used as the tester and cDNA from OA non-producing strain (ITAL163) was used as the driver. A double-stranded cDNA sample of each strain was digested with *Mbo*I (Invitrogen Life Technologies), but only the tester cDNA was ligated to the JBam24/12 adapters (Table 1). The first differential product (DP1) was obtained by hybridization (18h at 67 °C) of the tester and driver cDNAs mixed at a 1:10 ratio, followed by PCR amplification using JBam24 primer. To generate the second (DP2) differential product, RBam24/12 adapters were ligated to the tester and the hybridization was performed at a 1:100 tester/driver ratio. In all steps, the resulting products were purified using the GFX kit (GE Healthcare, UK).



### *3.1.3.5 Cloning and sequencing of RDA products*

The final RDA products (DP2) were cloned using the TOPO TA Cloning for Sequencing Kit (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Cloned inserts were sequenced with the DYEnamic™ ET dye Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotec, Inc.) for Megabace 1000. Sequence quality was analyzed and the contig assembly was performed by using PhredPhrap-Consed Software. The resulting sequences were compared to the Genbank database using the BLASTX and BLASTN algorithms [1] at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Sequences returning matches with an *E*-value  $\leq 10^{-5}$  were annotated and classified based on their putative molecular function and/or biological process.

### *3.1.3.6 RT Real Time PCR for gene expression comparisons between OA producer and non-producer strains after grown in permissive medium*

For quantitative Real Time RT-PCR, RNA from the strains UEL91 and ITAL163, grown for 96 hours at 25 °C on YES medium, was extracted using Trizol reagent (Invitrogen). First-strand cDNA synthesis was performed with reverse transcriptase (RT M-MLV, Invitrogen) using 1 µg of total RNA as the template as according to the manufacturer's protocol.

Real Time PCR reactions were performed in a PTC 200 DNA Engine Cycler using a Chromo4 Detection System (MJ Research). The oligonucleotides utilized in these experiments are listed in Table 1. The Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen Life Technologies) was used as the reaction mixture to which 0.4 µM of each primer and 2 µL of template cDNA was added to make a final volume of 25 µL. The PCR

thermal cycling conditions were as follows: an initial step at 95 °C for 5 min, and 40 cycles at 95 °C for 20 sec, 60 °C for 15 sec and 72 °C for 20 sec, followed by 95°C 10 sec and 40 °C 1 min. A melting curve analysis was consistently performed at the end of the reaction to check for primer-dimer artifacts and contamination. In addition, in all experiments, appropriate negative controls containing no template were subjected to the same procedure to exclude or detect any possible contamination. The data were normalized to glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (G3PDH) cDNAs amplified in each set of PCRs experiments. The relative expression data were obtained using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method as described by Livak and Schmittgen [15]. All the experiments were performed with two independent cultures, and each cDNA sample was analyzed in two technical replicates for each primer pair.

### 3.1.3.7 Gene expression and OA production

Real Time quantitative RT-PCR was also used to measure the expression of two identified genes by the OA producer strain after growth in conditions restrictive for OA production and in two different permissive conditions. First, *A. westerdijkiae* UEL91 was grown for sporulation at 25 °C on potato dextrose agar for 7 days. Conidia (approximately  $10^7$  mL<sup>-1</sup>) were inoculated into 100 mL of three different media: YES (20 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 150 g L<sup>-1</sup> sucrose); Czapek – CY (1.0 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.0 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 10 mL Czapek) and EM (10 g L<sup>-1</sup> Malt extract). The CY and EM media were supplemented with casein (0.5 g L<sup>-1</sup>) and urea (3.0 g L<sup>-1</sup>). The three media were adjusted to pH 5.0 via the addition of acetic acid. The flasks were incubated in darkness at 25 °C for 96 h. Mycelia were harvested by filtration, frozen in liquid nitrogen and then stored in -80 °C before RNA extraction. Filtered medium was used for OA extraction and quantification. RNA of

mycelium obtained from strains cultured in different media was extracted and analyzed by Real Time PCR as described above.

### 3.1.4 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1.4.1 Identification of genes differentially expressed between OA producer and non-producer strains of *A. westerdijkiae*

Here we describe the application of cDNA RDA to identify genes differentially expressed between OA producer and non-producer strains of *A. westerdijkiae*. A significant quantity of OA was produced by the UEL91 strain in YES liquid medium while the ITAL163 strain did not produce detectable levels of OA in any of the conditions tested. Despite this difference, the two strains presented high genetic similarity, as revealed by their RAPD profiles (Fig. 1). This fact confirms that these conditions are adequate to identify genes differentially expressed in OA producer and non-producer strains while minimizing the detection of transcripts not related to OA biosynthesis. Based on the kinetics of OA production, 96 hours was chosen as the time point for extracting total RNA for library construction, as expression of mRNA is expected prior to OA production. The UEL91 strain RNA was used to synthesize the tester cDNA population and ITAL163 strain RNA was used to synthesize the driver cDNA population. Two sequential subtractive reactions using different tester/driver ratios were carried out for library construction. The cDNA pool in the second RDA round, which predominantly migrated in the 400 bp in length region, was cloned and sequenced. Approximately 260 raw ESTs expected to be enriched in the UEL91 strain were successfully sequenced. BLASTX searches against the public databases showed that of these, 205 ESTs (79%) exhibited significant similarities with proteins of *known functions* to

deposited sequences with known functions, 28 ESTs (11%) had matches to hypothetical proteins, and the remaining 27 ESTs (10%) had no significant hits. EST alignment resulted in a total of 14 non-redundant consensus sequences, which were compared to the Genbank database using the BLASTX algorithm. Only the sequences returning matches with an *E*-value  $\leq 10^{-5}$  were annotated and classified based on their putative molecular function and/or biological process using the gene ontology classification system. Table 2 lists the identity of the sequences isolated.

#### 3.1.4.2 Validation of differential gene expression

A number of studies are currently underway to identify genes that are essential for OA biosynthesis. O'Callaghan et al. [21] have cloned part of OA *pks* gene (a polyketide synthase) required for OA biosynthesis in *A. ochraceus* and confirmed its involvement in this pathway by gene inactivation. The same group measured transcript accumulation of the *pks* gene by *A. ochraceus* grown under different nutritional and environmental conditions and found that *pks* transcription is tightly linked to OA production [22]. Notably, in our experiments, we did not identify any *pks* gene sequences. As our study represents the first application of RDA in *A. westerdijkiae*, it was important to validate these results. To this end, we performed quantitative real time RT-PCR analysis to confirm that the *pks* gene studied by O'Callaghan et al. [21] is not expressed significantly more by the UEL91 strain than the ITAL163 strain in YES liquid medium. Before the above experiment was conducted, it was first confirmed that expression of the *pks* gene is significantly increased when *A. westerdijkiae* is grown under permissive conditions for OA production than under restrictive conditions (data not shown). However, when the negative strain was cultivated under conditions permissive for OA production, the *pks* gene expression was similar to that of a positive strain, though no toxin

production occurred (Fig. 2). Therefore, we found that while this *pks* gene is involved in OA biosynthesis (as already shown by O'Callaghan et al. [21]), its expression is not restricted to OA producer strains.

Among all of the genes identified using RDA (Table 2), those that encode oxidoreductases particularly attracted our attention. Oxidoreductases include a very broad group of enzymes consisting of oxygenases, oxidases, peroxidases, reductases and dehydrogenases. This family of enzymes may act on PKS products and can catalyze cascades of reactions which generate a vast structural diversity of molecules. Currently, various oxygenases are known to be involved in oxidative modifications of many secondary metabolites, including several mycotoxins. The most common oxygenases are cytochromo P-450 monooxygenases, flavin-dependent mono and dioxygenases and anthrone oxygenases. Exhaustive studies on aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) biosyntheses, a polyketide-derived *Aspergillus* mycotoxin, revealed that six cytochromo P-450 monooxygenases are involved [29]. It has also been suggested that two putative p450-type monooxygenase genes, p450-H11 and p450-B03, may be involved in OA biosynthesis in *A. ochraceus* [22].

To confirm that the three putative oxidoreductase genes identified in the present study (denoted P450-AL, P450-PH and OXI-1) are differentially expressed in the OA producer strain, we used quantitative Real Time RT-PCR to compare transcription levels between the UEL91 and ITAL163 strains after growth in permissive YES liquid medium. As shown in Fig. 3A, all three genes tested were confirmed to have higher transcript levels in the OA producer strain UEL91. Because the expression of genes P450-AL and OXI-1 were markedly higher (32 and 20-fold respectively) in the OA producer strain compared to the non-producer strain, we investigated the association between the amount of OA produced and the expression levels of both of these transcripts 96 hours after inoculation in restrictive medium (EM), semi-permissive medium (CY) and permissive medium (YES). A correlation between

the amount of OA produced and amount of transcript expressed was observed for both genes (Fig. 3B). The highest amount of OA was detected in YES medium (1182 ng mL<sup>-1</sup>), followed by that detected in CY medium (152 ng mL<sup>-1</sup>). As expected, OA was not produced in the restrictive medium (EM). Relative gene expression of the OXI-1 gene obtained from mycelium grown in YES medium was 18-fold higher than that obtained from mycelium grown in EM medium. Accordingly, the expression of the OXI-1 gene from mycelium grown in semi-permissive medium was intermediary to the levels observed in permissive and restrictive conditions. Similar results were observed for the expression of the P450-AL gene, although with different magnitudes. Relative gene expression of the P450-AL gene in permissive medium was 1.8-fold higher than that obtained from restrictive medium. In the semi-permissive medium, intermediate transcript levels of the P450-AL gene were found.

We report here the results of the first effort to identify genes that are differentially expressed between OA producer and non-producer strains of *A. westerdijkiae*. While promising, this initial discovery requires confirmation using strains with worldwide origins before the genes described here can be considered as early detection markers of OA for testing purposes.

### 3.1.5 REFERENCES

- [1] Altschul S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- [2] Atoui, A., Dao, P., Mathieu, F., Lebrihi, A (2006) Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 448-493.
- [3] Atoui, A., Mathieu, F., Lebrihi, A (2007) Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 313-318.
- [4] Bailão, A.M., Schrank, A., Borges, C.L., Dutra, V., Molinari-Madlum, E.E.W.I., Felipe, M.S.S., Mendes-Giannini, M.J.S., Martins, W.S., Pereira, M., Soares, C.M.A. (2006) Differential gene expression b *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: Representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microb. Infect.* 8, 2686-2697.
- [5] Bogs, C., Battilani, P., Geisen, R. (2006) Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyze the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 39-47.

- [6] Brown, D.W., Yu, J.H., Kelnar, H.S., Fernandes, M., Nesbitt, T.C., Keller, N.P., Adams, T.H., Leonard, T.J. (1996) Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 1418-1422.
- [7] Dutra, V., Nakazato, L., Broetto, L., Schrank, I.S., Vainstein, M.H., Schrank, A. (2004) Application of representational difference analysis to Identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. Res. Microbiol. 155, 245-251.
- [8] Frisvad, J.C., Frank, J.M., Houbraken, J., Kujipers, A.F.A. (2004) New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. Studies Mycol. 50, 23-43.
- [9] Fungaro, M.H.P., Vissotto, P.C., Sartori, D., Vilas-Boas, L.A., Furlaneto, M.C., Taniwaki, M.H. (2004) A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. Curr. Microbiol. 49, 123-127.
- [10] Geisen, R., Mayer, Z., Karolewicz, A., Färber, P. (2004) Development of a real time PCR system for detection of *P. nordicum* and for monitoring ochratoxin A production in foods based on the ochratoxin polyketide synthase gene. Syst. Appl. Microbiol. 27, 501-507.
- [11] Hubank, M., Schatz, D.G. (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. Nucleic Acids Res. 22, 5640-5648.
- [12] Lebrihi, A., Mathieu, F., Borgida, L.P., Guyonyarch, A.M. (2003) Method for the detection of ochratoxin A or citrinin-producing fungi. European patent No. EP1329521.



- [13] Levi, C.P., Trenk, H.L., Mohr, H.K. (1974) Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *J. Assoc. Off. Anal.* 57, 866-870.
- [14] Lisitsyn, N.A., Lisitsyn, N.M., Wigler, M. (1993) Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259, 946-951.
- [15] Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25, 402-408.
- [16] Miyazaki, Y., Nakamura, M., Babasaki, K. (2005) Molecular cloning of developmentally specific genes by representational difference analysis during the fruiting body formation in the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Fungal Genet. Biol.* 42, 493-505.
- [17] Morello, L.G., Sartori, D., Martinez, A.L.O., Vieira, M.L.C., Taniwaki, M.H., Fungaro, M.H.P. (2007) Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of  $\beta$ -tubulin gene by using real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 270-276.
- [18] Moss, M.O. (1996) Mode of formation of ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 13, 5-9.
- [19] Mulé, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G., Visconti, A. (2006) Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *Int. J. Food Microbiol.* S28-S34.

- [20] Niessen, L. (2007) PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 38-46.
- [21] O'Callaghan, J., Caddick, M.X., Dobson, D.W. (2003) A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology* 149, 3485-3491.
- [22] O'Callaghan, J., Stapleton, P.C., Dobson, A.D.W. (2006) Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genet. Biol.* 43, 213-221.
- [23] Rix, U., Fischer, C., Remsing, L.L., Rohr, J. (2002) Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 19, 542-580.
- [24] Rosa e Silva, L.K., Staats, C.C., Goulart, L.S., Morello, L.G., Fungaro, M.H.P., Schrank, A., Vainstein, M.H. (2008) Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Res. Microbiol.* 159, 221-229.
- [25] Sartori, D., Furlaneto, M.C., Martins, M.K., Paula, M.R.F., Pizzirani-Kleiner, A., Taniwaki, M.H., Fungaro, M.H.P. (2006) PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Res. Microbiol.* 157, 350-354.
- [26] Schmidt-Heydt, M., Geisen, R. (2007) A microarray for monitoring the production of mycotoxins in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 131-140.

- [27] Sokolovsky, V., Kaldenhoff, R., Ricci, M., Russo, V. (1990) Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Newsl. 37, 41.
- [28] Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Teixeira, A.A., Iamanaka, B.T. (2003) The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. Int. J. Food Microbiol. 82, 173-179.
- [29] Yu, D.J., Bhatnagar, D., Cleveland, T.D. (2004) Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. FEBS Lett. 564, 126-130.

### 3.1.6 LEGENDS

Table 1. List of primers used in this study.

Table 2. EST identification from OA producer (UEL91) and non-producer (ITAL163) strains of *Aspergillus westerdijkiae*.

Fig. 1 RAPD profiles of *A.westerdijkiae* strains UEL91 and ITAL163 with primers OPX3, OPX7 and OPX13 (Invitrogen, Life Technologies). The molecular weight was Ladder 1Kb DNA plus (Invitrogen, Life Technologies)

Fig. 2 Transcript pattern of *pks* gene in UEL91 and ITAL163 strains. Strains were cultured in YES liquid medium for 4 days. The RNA concentration was normalized using the Ct value obtained for the GAPDH gene.

Fig. 3 Validation of the proposed differentially expressed ESTs. A) Validation of three putative oxidoreductases genes. Relative expression (Real Time RT-PCR) of oxidoreductase (OXI-1), cytochrome P450 (P450-AL) and cytochrome P450 phenylacetate hydroxylase (P450-PH) in the UEL91 strain grown in YES medium liquid. B) Validation of OA production and relative expression (Real Time RT-PCR) of both transcripts (P450-AL and OXI-1 genes) four days after inoculation in restrictive medium (EM), semi-permissive medium (CY) and permissive medium (YES) in the UEL91 strain. The RNA concentration was normalized using the Ct value obtained for the GAPDH gene.

### 3.1.7 TABLES AND FIGURES

Table 1.

<b>Name</b>	<b>Sequence 5' – 3'</b>	<b>Annealing temperature (°C)</b>
JBam-12	GATCCGTTTCATG	-
JBam-24	ACCGACGTCGACTATCCATGAACG	-
Rbam-12	GATCCTCGGTGA	-
Rbam-24	AGCACTCTCCAGCCTCTCTCACCGAG	-
P450-AL-F	TTGTAGGGTTGCTGCGATT	60
P450-AL-R	GCCAACAACAAGGAAAGCC	60
P450-PH-F	GTTGCTCTATCCACCGTTCT	60
P450-PH-R	CTTTACAGTTCTTCGCCTCG	60
Oxi-1-F	CCAAACTGTGCGAAATGCGG	60
Oxi-1-R	GACGAGACGAAGAACGGCGA	60
G3PDH-F	CGGCTTCGGTCGTATTGG	60
G3PDH-R	TGGAGGAGGGGATGATGTT	60

Table 2

Putative molecular function and/or biological process <sup>a</sup>	Description	Best hit/ accession number <sup>b</sup>	<i>E</i> value <sup>c</sup>	Identify (%)	Redundancy
Catabolism/ protein	Proteasome component	<i>Neosartorya fischeri</i> XP001266317	2e <sup>-35</sup>	92%	68
Metabolism	Pre 6 putative AMP-binding enzyme	<i>Aspergillus fumigatus</i> XP749893.2	43e <sup>-90</sup>	57%	60
	N-glycosyl-transferase	<i>Neosartorya fischeri</i> XP001267340	4e <sup>-107</sup>	86%	23
Metabolism/ carrier electron	Cytochrome P450 family protein putative	<i>Neosartorya fischeri</i> XP001260447	1e <sup>-96</sup>	61%	20
Intracell sinalizator	Cell division control protein Cdc25 putative	<i>Aspergillus clavatus</i> XP001275908	1e <sup>-54</sup>	71%	20
Glutamate metabolism	Glutamate decarboxylase	<i>Aspergillus oryzae</i> JC7915	2e <sup>-83</sup>	94%	7
Metabolism/ carrier electron	pyridine nucleotide- disulphide oxidoreductin family protein	<i>Aspergillus fumigatus</i> CAE47920	3e <sup>-116</sup>	90%	5
Metabolism/ carrier electron	Cytochrome P450 phenylacetate hydroxylase putative	<i>Neosartorya fischeri</i> XP001264888	2e <sup>-81</sup>	81%	1
Protein folding/electron carrier activity	Oxidoreductin	<i>Aspergillus clavatus</i> XP001276620	7e <sup>-44</sup>	96%	1
	Predicted protein	<i>Aspergillus terreus</i> XP001215009.1	1e <sup>-13</sup>	47%	1
	conserved hypothetical protein	<i>Aspergillus fumigatus</i> XP752544	9e <sup>-45</sup>	65%	16
	conserved hypothetical protein	<i>Aspergillus fumigatus</i> XP753856	4e <sup>-43</sup>	68%	5
	conserved hypothetical protein	<i>Neosartorya fischeri</i> XP001265177	3e <sup>-40</sup>	82%	2
	conserved hypothetical protein	<i>Aspergillus nidulans</i> XP661540	3e <sup>-18</sup>	49%	2

<sup>a</sup> Putative molecular function and/or biological process.

<sup>b</sup> Accession number of the gene products in the GenBank database.

<sup>c</sup> *E* value according to information from BLASTX searches of the non redundant database at NCBI.

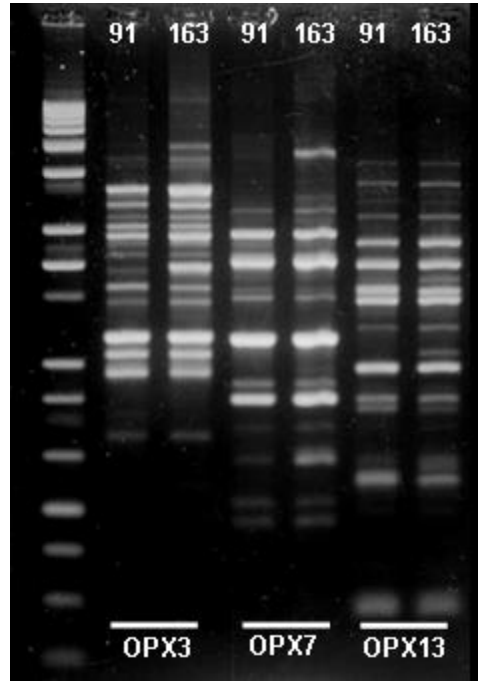


Fig.1

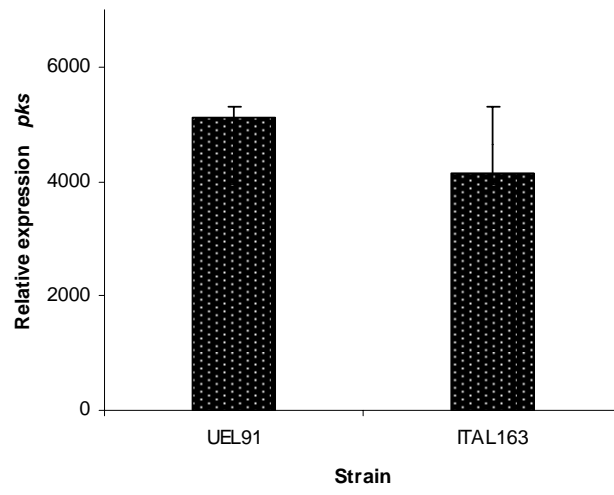


Fig.2



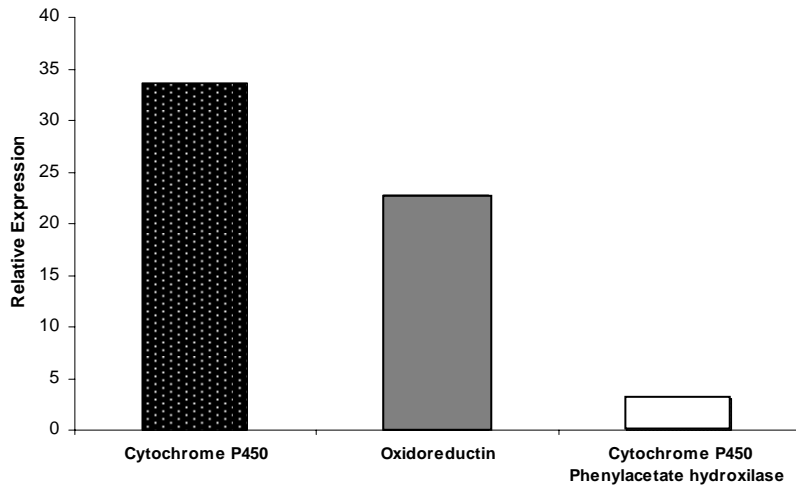


Fig.3A

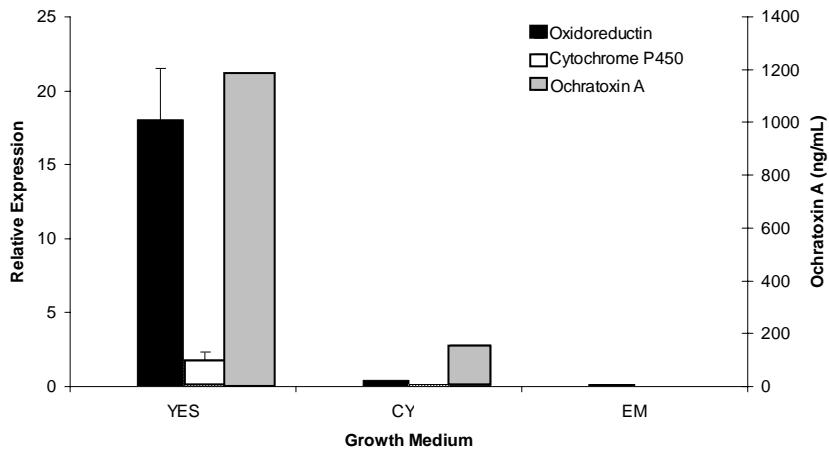


Fig.3B

**3.2 ARTIGO II: Differential proteomics between wild-type and mutant strains of  
*Aspergillus westerdijkiae* in permissive medium of ochratoxin A**

Artigo em preparação.

**Differential proteomics between wild-type and ochratoxin-deficient mutant strains of  
*Aspergillus westerdijkae***

**3.2.1 ABSTRACT**

An *Aspergillus westerdijkae* mutant strain with a drastic reduction in biosynthesis of ochratoxin A has an interrupted gene similar to the An09g05800 locus of *Aspergillus niger* annotated as encoding a putative PHD (Rum1) transcription factor. This gene has been described as involved in chromatin-mediated regulatory processes. The analysis of the genomic context of *A. niger*, showed that the gene *rum1* is not linked to any gene clusters related with mycotoxin biosynthesis. Here, we have developed a differential proteomic analysis between the wild-type (ITAL142) and the mutant (ITAL142-T10) strain grown in medium conducive to OA production, with the purpose of identifying proteins that may be under regulation of the PHD transcription factor. Out 23 proteins identified in ITAL142, those found most frequently were stress response proteins (36.4%) and the 26S proteasome regulatory subunit (9.1%). In filamentous fungi, mycotoxin production and sporulation processes may share regulatory elements. Then, an analysis on the production and morphology of conidia was carried in both strains in MEA and YES media. No alteration was found regarding conidiation in MEA, but a greater number of conidia were observed in YES medium. Transcriptional analysis of the proteins 14-3-3 proteins and the regulatory subunit 26S of the proteasome identified by proteomic approach, showed that the both transcripts levels were higher in the wild-type strain compared to the mutant with the inactivated *rum1* gene. This study is the first to show proteomic alterations in ochratoxigenic fungi due to mutation in a regulatory gene

### 3.2.2 INTRODUCTION

Ocratoxina A (OA) is one of the most abundant food-contaminating mycotoxins. The widespread occurrence of OA in diverse foodstuffs (coffee beans, grapes, wheat, beer and wine, among others) is hazardous to human and animal health. Among the main effects caused by the accumulation of this mycotoxin are nephrotoxicity, immunosuppression and carcinogenicity. OA production is restricted to two genera of fungi: *Aspergillus* and *Penicillium*.

In none of the species of the above mentioned fungi the biosynthetic pathway of OA has been completely explained. However, information on the molecular structure and hypothetical biosynthetic pathways of OA demonstrates the necessity of enzymes such as polyketide synthases, cyclases, chloro peptidases or halogenases, and a nonribosomal peptide synthesis (Moss 1998; Harris and Mantle 2001). Until the present day, only a small number of genes were postulated to be involved in the biosynthetic pathway of OA in *Aspergillus* and *Penicillium* species (O'Callaghan et al. 2003; Geisen et al. 2004; Karolewicz and Geisen 2005; Atoui et al. 2006; Bogs et al. 2006; Botton et al. 2008; Bacha et al. 2009 and Gallo et al. 2009). Additionally, none of the identified genes was proved to play a role in the regulation of structural genes involved in OA biosynthesis, with the exception of Färber and Geisen (2004) and Botton et al. (2008) reports that identified partial gene fragments similar to transcription factors involved in OA production under both favorable and restricted conditions. However, no study was carried out to prove the involvement of these genes in OA regulation.

Many studies concerning the regulation of mycotoxin production indicate the contribution of transcription factors. Proven examples include aflR protein that contributes to aflatoxin biosynthesis (Ehrlich et al. 1999), Tri6 and Tri10 proteins to trichothecenes (Tag et

al. 2001; Peplow et al. 2003), and ToxE protein to HC-toxin biosynthesis (Pedley and Walton 2001).

Transcription factors are proteins that regulate gene expression through connections with specific sites in gene promoters (Keller et al. 2005; Shwab and Keller 2008). Studies comparing sequences and structures of transcription factors demonstrated that many of these proteins may be grouped into various families based on their similarity to DNA binding domains. Two families of transcription factors play a role in the process of mycotoxin biosynthesis regulation: the  $Zn(II)_2Cys_6$  family, which is exclusive to fungi and typical of regulatory pathways and usually located inside gene clusters (Keller et al. 2005; MacPherson et al. 2006) and the  $C_2H_2$  family that is typical of global regulatory pathways of genes located inside or outside of mycotoxin biosynthetic gene cluster (Proctor et al. 1995; MacPherson et al. 2006). Generally, transcription factors of the  $C_2H_2$  family in filamentous fungi also participate in the regulation of the development process (Calvo et al. 2002).

Little information on the influence of genetic and environmental factors on OA production is available (O'Callaghan et al. 2006). The majority of regulatory pathways described in mycotoxin-producing fungi occur at transcription levels; however, post-transcriptional events may also contribute to the formation of the regulatory complex. Information on common pathways within the regulatory processes may be partially revealed using proteomic analysis, which has become an important tool in the study of molecular regulatory events that occur within cells in different physiological states (Kim et al. 2008).

In this study, the interrupted gene of the ochratoxin-deficient mutant was identified as coding for a putative protein similar to a PHD-type transcription factor. A comparative proteomic analysis between the wild-type and mutant strains of *A. westerdijkiae* was carried out in attempt to reveal proteins involved in production or regulation of OA.

### 3.2.3 MATERIALS AND METHODS

#### 3.2.3.1 Identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions

The T-DNA flanking region was extended by using an adaptation of the PCR-walking methodology as described by Cottage et al. (2001). Following the manufacturer's instructions, genomic DNA (100 ng) was partially digested for 3 h at 37 °C with 5 U *EcoRV*, a blunt-cutting restriction enzyme (New England Biolabs) in a final volume of 25 µL. Adapters were prepared by mixing equimolar amounts of ADAP-Long and ADAP-Short oligonucleotides (Table 1), which were ligated to the blunt-ended fragments for 3 h at 37 °C.

The reaction was performed by adding an equal volume of a ligation solution as follows: 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1.0 mM ATP, 1 µM adapters, and 1.2 units of T4 DNA ligase (New England Biolabs). The resulting products were diluted with ultra pure water and used as templates for amplification by PCR. A specific primer (GAP) to the adaptor and nested primers specific to T-DNA (RB1, RB2, RB3) (Combiier et al. 2003) were used to amplify the flanking region. The adapter sequence did not contain a primer-binding site, which was created only by the PCR extension from the walking-primer.

PCR products were resolved on agarose gels, purified (QIA quick<sup>®</sup> Spin Handbook-Qiagen) and cloned (TOPO TA Cloning for Sequencing Kit – Invitrogen Life Technologies). Cloned inserts were sequenced with the DYEnamic<sup>™</sup> ET dye Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotec, Inc.) and analysed with a MegaBACE 1000. By using BLASTX and BLASTN algorithms (Altschul et al. 1990) the resulting sequences were searched for in the database NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### 3.2.3.2 Strains and culture conditions

The wild-type strain ITAL142 of *Aspergillus westerdijkiae*, a high OA producer strain isolated from Brazilian coffee beans (Taniwaki et al. 2003) and the mutant ITAL142-T10 strain, a low OA producer strain, obtained through T-DNA insertional mutagenesis (Mata et al. 2007) were used for gene characterization and proteomic analysis. Both strains were maintained on 10% (w/v) of agar malt extract (MEA) for 7 days.

### 3.2.3.3 Quantification of ochratoxin A (ITAL142 and ITAL142-T10 strains)

For the ochratoxin production analysis, conidia were inoculated (approximate density  $10^8 \text{ mL}^{-1}$ ) into 500-mL flasks containing the following: 100 mL of 2% (w/v) yeast extract, 20% (w/v) sucrose (YES) liquid medium. The pH was adjusted to 5.0. The strains were grown at 28 °C for 96 h and 120 h in darkness without shaking to study the level of gene expression and for proteomics, respectively. For OA quantification, an aliquot of the culture broths was collected and analyzed with high performance liquid chromatography (HPLC). For OA extraction, an aliquot of 200  $\mu\text{L}$  of the culture broths was mixed with 800  $\mu\text{L}$  of methanol and vortexed. After 10 min, the extracts were filtered (Millex HV 0.2  $\mu\text{m}$ , Millipore JBR610245) and injected into HPLC. A LC-10VP HPLC system (Shimadzu, Japan), was used with fluorescence detection set at 333 nm excitation and 477 nm emission. A Shimadzu CLC G-ODS (4x10 mm) guard column and a Shimadzu Shimpack CLC-ODS (4.6 x 250 mm) column were employed. The mobile phase was an acetonitrile: water: acetic acid (99:99:2) solution and the flow rate was  $0.8 \text{ mL min}^{-1}$ . An OA standard (Sigma) was used for the construction of a calibration curve of peak areas versus concentration ( $\mu\text{g}^{-1}$ ). The OA concentration in the

sample extract was determined by the interpolation of the results' peak areas from the calibration graph.

#### **3.2.3.4 Protein extraction**

Total proteins were extracted from both strains of *A. westerdijkiae* according to Wang et al. (2003) with modifications. The mycelia (1-2 g) were ground to a fine powder in liquid nitrogen and homogenized with 10 mL of extraction buffer (20 mM EDTA, 2% (v/v) 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF), by vortexing for 30 s at 4 °C. The homogenized fungal tissues were centrifuged (6000 g, 15 min. at 4 °C) and the resulting pellet washed with centrifugation for (6000 g, 15 min. at 4 °C) three times with 10% TCA in acetone, three times with 10% TCA in water and once with acetone (80%). The pellet was dried at room temperature and kept at -80 °C. An aliquot (200 mg) ITAL142 and ITAL142-T10 of mycelium samples was homogenized in 800 µL of extraction buffer (30% sucrose, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 2% (v/v) 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF), by vortexing for 30 s at 4 °C. An equal volume of saturated phenol was added to the suspension. After additional vortexing for 1 min at 4 °C, the phases were separated by centrifugation (12.000 g for 30 min. at 4 °C). The phenol phase was recovered and the proteins were precipitated by the addition of 4 vol of 0.1 mM ammonium acetate in methanol followed by incubation at -20 °C for 30 min. The samples were centrifuged (12000 g, 15 min. at 4 °C) and the resulting pellet was washed twice with 0.1 M ammonium acetate in methanol, twice with acetone (80%) and once with ethanol (70%). The extract protein was dried at room temperature and rehydrated in solubilization buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS and 1% (v/v) Pharmalyte pH 4-7) and Destreak solution (GE Healthcare). Proteins were quantified using the Bradford method (Bradford 1976). The extracted protein suspension in buffer (Tris-HCl 0.05 M pH 6.8,



4% 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol) was heated at 100 °C for 5 min prior to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Protein samples (20µg, 30µg and 40µg) were separated in 5% and 12% polyacrylamide gels, and subsequently stained with Coomassie brilliant blue R-250.

### **3.2.3.5 Two-dimensional electrophoresis (2D)**

The protein solution (500 µg of protein/250 µL) was loaded by rehydration onto a 13 cm long pH 4-7 IPG strip (GE HealthCare) for 12 h. Isoelectric focusing (IEF) was carried out with IPGphor apparatus (GE HealthCare) for 1 h at 500 V, 1 h at 1000 V, 2.5 h at 8000 V and 2.5 h at 8000 V at 20 °C. After IEF, the strips were reduced (1% w/v DTT) for 15 min. at room temperature and then alkylated (2.5% w/v iodoacetamide) for 15 min at room temperature in equilibration buffer (6 M urea, 2% w/v SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 30% v/v glycerol). The second dimension was performed in 12.5% w/v polyacrylamide gels and the separation was carried out on a Hoeffer SE 600 Ruby electrophoresis system (GE Health Care), with a constant current of 45 mA/gel. The gels were fixed and stained with Coomassie brilliant blue (CBB) R-250.

### **3.2.3.6 2D Image analysis**

Two-dimensional images were captured by scanning the gels using an UMAX ImageScanner and Labscan v.6.0 software (GE HealthCare). Image analysis was performed automatically using the ImageMaster 2D Platinum version 6.0, including calculation of average spot volume followed by normalization for each analysis.

### 3.2.3.7 MALDI-TOF mass spectrometry

Spots of interest were manually excised from Coomassie blue stained 2D electrophoresis gels and washed with water for 15 min. The gel pieces were destained with 50% acetonitrile in 25 mM ammonium bicarbonate (Ambic), until complete removal of the Coomassie was achieved. Following this, the spots were completely dehydrated with 100% acetonitrile and dried at room temperature. The gel pieces were incubated with 150 ng of sequencing grade modified trypsin (Promega) in 25 mM Ambic for 12 h at 37 °C. After digestion, the peptides were extracted from the gel pieces twice by vortexing with a 0.1% trifluoroacetic acid and 50% acetonitrile solution. The volume of the extracts was dried with a Speed Vacuum concentrator and rehydrated with 1% formic acid.

For analysis using MALDI-TOF MS, 1 µL of the sample was spotted onto a MALDI target plate with 1 µL of matrix solution (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma)). MALDI-TOF MS analysis was performed on an Autoflex mass spectrometer (Bruker Daltonics). Tandem MS (MS/MS) sequencing analysis was carried out with an Ultraflex spectrometer (Bruker Daltonics).

Peptide fragment data obtained from MS/MS analysis were used to search for protein candidates in the NCBI database limited to the taxon Fungi by using in-house Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) (Matrix Science Inc.) software (Perkins et al. 1999). The initial search parameters were as follows: methionine oxidation and carbamidomethyl of cysteine, peptide mass tolerance of 400 ppm and MS/MS tolerance of  $\pm 0.5$  Da. According to MASCOT probability analysis only significant ( $P < 0.05$ ) hits were accepted.

### 3.2.3.8 RT-Real Time PCR

For quantitative Real Time RT-PCR, RNA from both above mentioned strains grown for 96 h at 25 °C in YES medium were extracted by using Trizol reagent (Invitrogen). First-strand cDNA synthesis was performed with reverse transcriptase (RT M-MLV, Invitrogen) from 1 µg of total RNA according to the manufacturer's protocol.

Real Time PCRs were performed in a PTC 200 DNA Engine Cycler using a Chromo4 Detection System (MJ Research). The oligonucleotides utilized in this experiment are listed in Table 1. The Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen Life Technologies) was used as the reaction mixture, adding 0.4 µM of each primer and 2 µL of template cDNA into a final volume of 25 µL. PCR thermal cycling conditions were as follows: an initial step at 95 °C for 5 min. and 40 cycles at 95 °C for 20 s, 60 °C for 15 s and 72 °C for 20 s, followed by 95 °C for 10 s and 40 °C for 1 min. A melting curve analysis was performed at the end of each reaction to check for primer-dimer artifacts and contamination. In addition, for all experiments the appropriate negative controls containing no template were subjected to the same procedure to exclude or detect any possible contamination. Data were normalized to glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) as described by O'Callaghan et al. (2003). The relative expression data were obtained using REST-MCS<sup>®</sup> ([www.gene-quantification.info](http://www.gene-quantification.info)) (Pfaffl et al. 2002) software. All experiments were performed with two independent cultures, and each cDNA sample was analyzed in two technical replicates for each primer pair.

### **3.2.3.9 Scanning Electron Microscopy (SEM)**

The ITAL142 and ITAL142-T10 strains were maintained on MEA or YES medium for 7 days at 28 °C. For conidial SEM analyses, a suspension of conidia was fixed for 4 h in 2% glutaraldehyde in 0.1M of NaPO<sub>4</sub> buffer, and post-fixed in buffer 1% O<sub>5</sub>O<sub>4</sub> for 2 h.

Conidia were dehydrated in ethanol series (70, 80, 90, and 100%) for 15 min each. Conidia were dried in a critical point drying apparatus and sputter-coated with gold, and analyzed using a Philips FEI Quanta 200 field emission scanning electron microscope. The images were measured with the Soft Image System XT Docu Properties software. The measured media of fifty conidial diameters of each strain cultivated in each medium was use for the volum calculus following the formulas:  $4/3\pi abc$  for ellipsoidal conidial or  $4/3\pi r^2$  for round conidial. The statistics calculus of volum were analyzed for Origin 8.0 program.

### 3.2.4 RESULTS AND DISCUSSION

The amplified junction region between the mutant genomic DNA and the T-DNA right border (137 nt) showed significant similarities ( $E$ -value  $9e^{-19}$ ) to the *A. niger* An09g05800 locus strain CBS 513.88 annotated as encoding a putative PHD transcription factor (Rum1). The verification of other significant  $E$ -values confirmed that the interrupted gene is very similar to a protein that encodes a plant homeodomain-like (PHD) putative transcription factor, coordinated by a putative ORF of approximately 5200 bp, with four exons and three introns. In the majority of *Aspergillus* species, Rum1 has five main domains organized in Jumonji N, Arid, Jumonji C and two zinc finger domains (PHD). Comparisons of the amino acid sequences of *A. westerdijkiae* ITAL142 and ITAL142-T10 with the locus An09g05800 of *A. niger* demonstrated that T-DNA insertion occurred at the G-TC nucleotides located in the *A. niger* JmjN domain, according to the sequence alignments (Fig. 1).

Based on OA structure, some enzymes are supposed to be involved in the biosynthesis of OA; therefore, some teams of researchers are looking for genes related to OA biosynthesis (Lebrihi et al. 2003; Geisen et al. 2004; Atoui et al. 2006; O'Callaghan et al. 2006; Bogs et al. 2006; Bacha et al. 2009; Gallo et al. 2009). A polyketide synthase can be postulated as being

involved in OA biosynthesis because the isocoumarin group of OA is probably a pentaketide formed from acetate and malonate via a polyketide synthesis pathway (O'Callaghan et al. 2003). The most relevant report of the cloning and characterization of the *Aspergillus* putative polyketide synthase gene (*pks*) involved in OA biosynthesis was published by O'Callaghan et al. (2003). The authors showed that a mutant strain in which the *pks* gene has been interrupted was not able to synthesize OA. Moreover *pks* transcription is tightly linked to OA production (O'Callaghan et al. 2006). Then, we used the Quantitative Real Time RT-PCR approach in order to visualize some association between *rum1* and *pks* transcription levels. Wild-type and mutant strains were grown under favorable conditions (YES medium) for ochratoxin production. Based on the kinetics of OA production, the 4<sup>th</sup> day was chosen as the point for total RNA extraction and OA quantification. As expected, the production of OA was significantly lower in the mutant strain than that observed in the wild-type strain, 3.2 ng mL<sup>-1</sup> and 130 ng mL<sup>-1</sup> respectively; however, the relative expression of the *pks* gene in the wild-type strain was not significantly different ( $P < 0.05$ ) from that obtained in the mutant strain. This observation suggests that the *rum1* gene does not have a direct role in transcriptional regulation of the gene that encodes the *pks* protein, described by O'Callaghan et al. (2006) as associated with OA production.

One notable property of mycotoxins is that genes involved in their synthesis are often found in gene clusters. Such genes can encode structural enzymes, regulatory proteins or proteins that provide self-protection. Gene organization in clusters is well-documented for the biosynthetic pathways of aflatoxin from *Aspergillus flavus*, fumonisins from *Fusarium* spp., and others (Hohn et al. 1993; Proctor et al. 2003; Kim et al. 2005; Yu et al. 2004). Based on this information, we performed an analysis of the genomic context of *A. niger* near the *rum1* gene, but the results showed that this gene is not linked to a cluster for OA biosynthesis. For some fungal toxins, it has been shown that genes not linked to a mycotoxin cluster may also

have an important role in the regulation of toxin production. Four genes of the fumonisin (FUM) cluster were described as regulatory genes of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* (*FCK1*, *FCC1*, *PAC1*, *ZFR1*) (Shim and Woloshuk 2001; Flahearty et al. 2003; Flahearty et al. 2004; Bhlum et al. 2006; Brown et al. 2007). In addition, recent progress in fungal toxin cluster research has suggested that these clusters, together with the spore formation process, may be globally regulated by higher order chromatin conformation (Keller [http://www.scabusa.org/pdfs\\_dbupload/FY07-FPR\\_Keller\\_Final.pdf](http://www.scabusa.org/pdfs_dbupload/FY07-FPR_Keller_Final.pdf)).

Chromatin modifications have emerged as a basic core mechanism in transcriptional regulation. The pattern of histone modifications, called the histone code, influences transitions between chromatin states and the regulation of transcriptional activity. PHD proteins are found in the nucleus and their functions may be identified from part of this code. The PHD finger may promote both gene expression and repression through interactions with trimethylated lysine 4 on histone 3 (H3K4), a universal modification at the beginning of active genes (Mellor 2006). As reviewed by Brosch et al. (2008), almost every cellular pathway may be influenced by chromatin-modifying enzymes, and a complex yet still elusive interdependence between chromatin dynamics and cellular regulation pathways exists. In a recent study with *Fusarium* and *Aspergillus*, it was suggested that mycotoxin production, as well as spore formation, is globally regulated by higher order chromatin conformation (Brodhagen and Keller 2006).

Protein mass spectrometry technology that can perform high-throughput analyses of protein spots isolated from 2D protein gels has been recently used to analyze proteome alterations due to a single gene mutation on regulatory genes of mycotoxigenic fungi (Yoon-E and Shim 2008). Based on this, we performed differential proteomic analysis between the mutant and wild-type strains to identify other proteins encoded by genes that may be regulated by the PHD transcription factor. Proteins were extracted from 5-day-old *A.*

*westerdijkiae* wild-type and mutant mycelia grown in a YES medium permissive to ochratoxin biosynthesis, and resolved on 1D SDS-PAGE to visualize the quality of the sample before proceeding with the 2D-PAGE analysis. We generated three reproductive 2D SDS-PAGE gels for further analysis of the differentially regulated proteins. A quantitative comparison of the obtained proteins was performed in the pH 4-7 range for the wild-type and mutant strains.

Approximately 458 protein spots were separated in the pH 4-7 range and the image is shown in Fig 2. Fifty-six of these proteins were up-regulated in the wild-type strain and thirty-four in the mutant strain. In an attempt to find genes involved in ochratoxin biosynthesis that are under the regulation of the *rum1* gene, we selected 56 protein spots that exhibited greater level regulation in the wild-type strain than in the mutant strain for further mass spectrometry analyses.

A total of 23 selected proteins that were over-regulated in the wild-type strain provide significant database matches (Table 2). It is important to state that of all the identified spots, seven present significant values ( $P < 0.05$ ) following a unique peptide sequence (spots 47, 211, 256, 277, 279, 288). Proteins belonging to different functional categories were identified, but no proteins already described as being involved in ochratoxin A biosynthesis were detected (Table 2). In addition, no protein identified in the present study is related as playing an exclusive role in fungal secondary metabolite production. The proteins identified as aldehyde dehydrogenase (spot 125), flavoprotein (spot 279), ATP sintase (spot 319), ornitin aminotransferase (spot 140), Ran-binding RANBP1 (spot 288), oxidoreductase (spot 256) and heat shock (spots 27, 47, 56, 162, 176, 287 e 243) are common to various metabolic reactions and may be related to both primary and secondary metabolism. Ornitin aminotransferase, for example, is described as both a common component involved in cellular development (Ruiz-Herrera, 1994) and as an enzyme involved in biosynthesis of the mycotoxins sterigmatocystin

and aflatoxin in *A. parasiticus* (Guzman-de-Peña and Ruiz-Herrera 1997). Equally, oxidoreductases that include a very broad group of enzymes (oxygenases, oxidases, peroxidases and dehydrogenases) are known to be involved in several biosynthetic pathways in a large variety of primary and secondary metabolites, including mycotoxin. Seven monooxygenase genes were described as encoding enzymes involved in aflatoxin biosynthesis (Bathnagar et al. 1992; Payne and Brown 1998), and two monooxygenases were already supposed to be involved in ochratoxin biosynthesis (O'Callaghan et al. 2006). Common to various processes, the protein identified as Ran-binding RBP1 (spot 288) presents itself as a signaling molecule. This protein possesses a central domain similar to the Ras proteins, which form links with GTP (Avis and Clarke 1996). In *A. nidulans*, a protein homologous to the Ras protein is negatively associated with sterigmatocystin production, interfering in its development via repression of the *afIR* gene (Shimizu et al. 2003).

As shown in Table 2, high frequencies of proteins involved in stress responses (36.4%) and proteins with putative proteasome regulatory functions (9.1%) were detected as more highly expressed by the wild-type strain than by the mutant strain. One of the most important components of the stress response that allows the cell to survive is the production of "molecular chaperone" proteins. Molecular chaperones detect proteins that are misfolded, and have the ability to refold those proteins into the appropriate, non-toxic shape. Additionally, if the protein is so badly misfolded that it cannot be repaired, the molecular chaperones can also recruit other proteins that have the ability to "tag" the toxic protein for destruction by the cell. This tag, called ubiquitin, directs the misfolded protein to a cellular apparatus known as the proteasome, whose function is to degrade the toxic protein into its constituent amino acids for recycling ([http://www.cytrx.com/molecular\\_chaperone\\_regulation.html](http://www.cytrx.com/molecular_chaperone_regulation.html)). There is a consensus in the literature that proteasome-mediated proteolysis plays a key role in the regulation of critical



cellular processes such as transcriptional control, cell cycle progression, and stress response (Staszczak 2007). Although the proteasome normally produces short peptide fragments that can be biologically active and functional, it is possible to suppose that the proteins related to the stress response identified in the present study are involved in a self-protection mechanism to avoid suicide. Many microorganisms that produce biologically toxic secondary metabolites have mechanisms for self-protection to avoid suicide (Daub et al. 2005). The effects of mycotoxins on fungal proteasome have not been described until now. However, because of the importance of proteasomes in various cell processes, some results have been announced concerning the association between mycotoxin presence and alterations in proteasomal activities in animal and vegetal cells (Amici et al. 2007; Desmond et al. 2008). Further investigation is necessary to discover if the proteins related to stress response play a role in OA production, or if they are part of the fungi's response to damage inflicted by the presence of the OA.

Especially noticeable was the protein spot identified as the 14-3-3 proteins that interact with a leucine zipper structure situated upstream of the Cys-His-rich (PHD) domain in several plant homeodomain proteins (Reviewed by Tzivion and Avruch 2002). 14-3-3 proteins are a family of conserved regulatory molecules expressed in all eukaryotic cells. Plant 14-3-3 proteins bind a range of transcription factors and other signaling proteins, and have roles in regulating plant development and stress responses. Important 14-3-3 protein regulation mechanisms include shuttling proteins between different cellular locations and acting as scaffolds for the assembly of larger signaling complexes (Roberts 2003). O'Brian et al. (2003) identified in an EST library a 14-3-3 protein homolog produced during aflatoxin biosynthesis. To determine if 14-3-3 plays a role in aflatoxin biosynthesis the authors disrupted the gene in *A. flavus* by site-directed mutagenesis. The strain with the disrupted 14-3-3 gene did not produce aflatoxin under several tested conditions, and after complementing the mutation with

a functional 14-3-3 gene the ability of the fungus to produce aflatoxin was rescued. In addition to this effect, the disruption of the gene resulted in subtle morphological changes in the generated mutant in comparison with the parent strain. These included a decrease in both growth rate and conidial germination, and an increase in the sensitivity to temperature.

Secondary metabolism and sporulation are often linked in filamentous fungi, sharing some (but not all) regulatory elements (Adams and Yu 1998; Calvo et al. 2002). Based on this knowledge, a qualitative and quantitative comparison of conidiation ability was performed between the wild-type and mutant strains, in order to investigate whether the PHD transcription factor identified in the present study plays some role in conidiation. MEA medium, which is not conducive to ochratoxin biosynthesis and consequently eliminates the effects of it in the culture, was used to perform a comparative analysis of sporulation efficiency between the wild-type and the mutant strains. It was observed that conidiation efficiency in the mutant strain was equal to that in the wild-type strain. The same analysis was used to perform a comparative analysis of sporulation efficiency with both strains in YES medium. It was observed that conidiation efficiency in the mutant strain was higher to that in the wild-type strain, showing that the interruption of the *rum1* gene caused an effect on conidial production. Equally, morphological analyses of surface ornamentation and effective volume of conidia performed using scanning electron microscopy (SEM) reveal significant difference between the wild-type (volume high) and mutant strain (volume small) (Fig 03) after growing on YES medium (Table 03).

After identifying the differentially regulated proteins, an analysis was performed of the transcriptional level of the 14-3-3 proteins and the regulatory subunit of the 26S proteasome corresponding genes. We used quantitative Real Time PCR approach in order to establish a transcriptional-translational association. In fact, the results obtained after cultivation of both strains under the same conditions (YES medium, 96 h) showed that both corresponding

transcripts were found at a higher level in the wild-type strain than in the mutant strain where the *rum1* gene was inactivated (Fig. 04). An association between the amount of OA produced and amount of transcript expressed (14-3-3 protein and subunit regulatory 26S of proteasome) was observed for both genes (2.2 and 1.8-fold respectively).

To our knowledge, only one report attempting to identify genes associated with mycotoxin biosynthesis via proteomics is available in the literature. Yoon-E and Shim (2008) carried out a comparative analysis of *Fusarium verticillioides* wild-type and fumonisin-defective mutant proteomes in order to find putative proteins, and ultimately the corresponding genes, which are important for fumonisin biosynthesis. The authors did not find any protein that appeared to play a direct role in fungal secondary metabolism. As was found in our results, they did observe a high number of proteins that are involved in stress response, such as heat-shock proteins and superoxide dismutase.

A thorough understanding of the regulation of ochratoxin biosynthesis has proven to be a difficult mission given the diversity of the cues. This is the first study showing proteome alterations due to a regulatory gene mutation of an ochratoxigenic fungus. Several interesting genes have been revealed to be upregulated in the wild-type strain and are candidates for further investigation.

### 3.2.5 REFERENCES

- ADAMS, T.H.; YU, J.H. Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Current Opinion of Microbiology**, v.1, p.674-677, 1998.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.
- AMICI, M.; CECARINI, V.; PETTINARI, A.; BONFILI, L.; ANGELETTI, M.; BAROCCI, S.; BIAGETTI, M.; FIORETTI, E.; ELEUTERI, A.M. Binding of aflatoxins to the 20S proteasome: effects on enzyme functionality and implications for oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v.388, p.107-117, 2007.
- ATOUI, A.; DAO, H.P.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A. Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.50, p.488-493, 2006.
- AVIS, J.M.; CLARKE, P.R. Ran, a GTPase involved in nuclear processes: its regulators and effectors. **Journal of Cell Science**, v.109, p.2423-2427, 1996.
- BACHA, N.; ATOUI, A.; MATHIEU, F.; LIBOZ, T.; LEBRIHI, A. *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene "aoks1" is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. **Fungal Genetics and Biology**, v.46, p.2423-2427, 2009.
- BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARORA, D.K. **Handbook of Applied Mycology: Mycotoxins in Ecological Systems**, New York: Marcel Dekker, 1992.
- BLUHM, B.H.; WOLOSHUK, C.P. *Fck1*, a C-type cyclin-dependent kinase, interacts with *Fcc1* to regulate development and secondary metabolism in *Fusarium verticillioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v.43, p.146-154, 2006.
- BOGS, C.; BATTILANI, P.; GEISEN, R. Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyze the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p.39-47, 2006.
- BOTTON, A.; FERRIGO, D.; SCOPEL, C.; CAUSIN, R.; BONGHI, C.; RAMINA, A. A cDNA-AFLP approach to study ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius*. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, p.105-115, 2008.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRODHAGEN, M.; KELLER, N.P. Signaling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. **Molecular Plant Pathology**, v.7, p.285-301, 2006.

BROSCH, G.; LOIDL, P.; GRAESSLE, S. Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v.32, p.409-439, 2008.

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

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

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

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

DAUB, M.E.; HERRERO, S.; CHUNG, K.R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plant. **FEMS Microbiological Letters**, v.252, p.197-206, 2005.

DESMOND, O.J.; MANNERS, J.M.; STEPHENS, A.E.; MACLEAN, D.J.; SCHENK, P.M.; GARDINER, D.M.; MUNN, A.L.; KAZAN, K. The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defense responses in wheat. **Molecular Plant Pathology**, v.9, p.435-445, 2008.

EHRlich, K.C.; MONTALBANO, B.G.; CARY, J.W. Binding of the C6-zinc cluster protein, AflR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. **Gene**, v.230, p.249-257, 1999.

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

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

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

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

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

GUZMÁN-DE-PEÑA, D.; RUIZ-HERRERA, J. Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. **Fungal Genetics and Biology**, v.21, p.198-205, 1997.

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

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

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

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

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

KIM, Y.; NANDAKUMAR, M.P.; MARK, R.M. The state of proteome profiling in the fungal genus *Aspergillus*. **Briefings in functional genomics and proteomics**, v.7, p.87-94, 2008.

LEBRIHI, A.; MATHIEU, F.; BORGIDA, L.P.; GUYONVARCH, A.M. **Method for the detection of ochratoxin A or citrinin-producing fungi**. European patent n°. EP1329521, 2003.

MACPHERSON, S.; LAROCHELLE, M.; TURCOTTE, B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.70, p.583-604, 2006.

MATA, M.M.; TANIWAKI M.H.; IAMANAKA, B.T.; SARTORI, D.; OLIVEIRA, A.L.M.; FURLANETO, M.C.; FUNGARO, M.H.P. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, p.148-151, 2007.

MELLOR, J. It takes a PHD to read the histone code. **Cell**, v.126, p.22-24, 2006.

MOSS, M.O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.62S-76S, 1998.

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

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

O'BRIAN, G.R.; FAKHOURY, A.M.; PAYNE, G.A. Identification of genes differentially expressed during aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Fungal Genetics and Biology**, v.39, p.118-227, 2003.

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

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

PEPLOW, A.W.; MEEK, I.B.; WILES, M.C.; PHILLIPS, T.D.; BEREMAND, M.N. Tri6 is required for esterification of position C-8 during trichothecene mycotoxin production by *Fusarium sporotrichioides*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5935-5940, 2003.

PERKINS, D.N.; PAPPIN, D.J.C.; CREASY, D.M.; COTTRELL, J.S. Probability-based protein identification by searching sequence database using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v.20, p.3551-3567, 1999.

PFAFFL, M.W.; GRAHAM, W.H.; DEMPFFLE, L. Relative expression software tool (REST<sup>®</sup>) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v.30, p.2-10, 2002.

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

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

ROBERTS, M.R. 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signaling. **Trends in Plant Science**, v.8, p.218-223, 2003.

RUIZ-HERRERA, J. Polyamines, DNA methylation and fungal differentiation. **Critical Reviews in Microbiology**, v.20, p.143-150, 1994.

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

SHIMIZU, K.; HICKS, J.K.; HUANG, T.; KELLER, N.P. Pka, Ras and RGS protein interactions regulate activity of AflR a Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> transcription factor in *Aspergillus nidulans*, **Genetics**, v.165, p.1095-1104, 2003.

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

STASZCZAK, M. The 26S proteasome of the lignin-degrading Basidiomycete *Phlebia radiata*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.347-353, 2007.

TAG, A.; HICKS, J.; GARIFULLINA, G.; AKE, C.J.; PHILLIPS, T.D.; ET AL. A novel regulatory gene, Tri10, controls trichothecene toxin production and gene expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.5295-5302, 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**, v.82, p.173-179, 2003.

TZIVION, G.; AVRUCH, J. 14-3-3 Proteins: Active cofactors in cellular regulation serine/threonine phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.3061-3064, 2002.

YOON-E, C.; SHIM, W.B. Identification of genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* via proteomics and quantitative real-time PCR. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.648-657, 2008.

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

WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E.; MAZZUCA, S.; CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v.24, p.2369-2375, 2003.



### 3.2.6 LEGENDS

Table 01: List of primers used in the study.

Table 02: Identification of proteins up regulated in the wild-type strain.

Table 03: The first letters corresponding the horizontal line (MEA and YES culture of medium) and the second letter corresponding the vertical line (ITAL142 and ITAL142-T10 strains). The values following of the same letter were not significantly with  $p > 0,05$ .

Figure 01: Alignment of nucleotide sequences for *A. westerdijkiae* ITAL142 (wild-type strain), *A. niger* locus An09g05800 and ITAL142-T10 (mutant strain). The integration of T-DNA (grey) occurs between the G-TC nucleotides. The T-DNA sequence is in bold italics.

Figure 02: Protein regulation profile of *A. westerdijkiae* wild-type (ITAL142) and mutant (ITAL142-T10) strains stained with Coomassie blue. Both strains were grown in permissive medium (YES) to ochratoxin A, for 5 days, and the total proteins of mycelium fungal were extracted. The figure is a representative from three technical replicates. Black arrows in the figure of wild-type strain indicate proteins that are up regulated and the gray arrows in the figure of mutant strain indicate proteins that are down regulated.

Figure 03: Scanning electron microscopy (SEM) of *A. westerdijkiae* fixed conidia after 7 days in culture at 24000 magnification. Conidia from wild-type (ITAL142) strain (A – B) and conidia of mutant (ITAL142-T10) strain (C – D), both in MEA medium. Conidia from wild-type mutant (ITAL142) strain (E – F) and conidia of mutant (ITAL142-T10) strain (G – H), both in YES medium.

Figure 04: Association between the transcription levels of the 14-3-3 proteins and 26S proteasome subunit genes and the amount of OA produced by wild-type (ITAL142) and mutant (ITAL142-T10) strain of *A. westerdijkiae* in YES medium.

**3.2.7 TABLES AND FIGURES**

Table 01

<b>Name</b>	<b>Sequence 5'-3'</b>
ADAP-Long	ACTCGATTCTCAACCCGAAAGTATAGATCCCA
ADAP-Short	TGGGATCTATACTT/3AmM
GAP	ACTCGATTCTCAACCCGAAAG
Aw14-3-3-F	TGGGTCACGAAGATGCTGT
Aw14-3-3-R	CGCTCCTCAACGGTAAG
AwProt26S-F	CGTCGGGGATTTATTCTGCTT
AwProt26S-R	ATGTCTTCTTGGTGGTTGCG

Table 02

Spot (fig.02)	Protein Name <sup>a</sup>	Species	NCBI Accession (Version) <sup>b</sup>	Mascot Score	Mr (KDa) Theoretical	pI Theoretical	SC (%) <sup>c</sup>	MS/MS Peptides Sequence
Aw-223	Hypothetical protein (40S ribosomal protein)	<i>A.oryzae</i>	Q2UBZ9 XP001727755.1	97	32383	4.80	8	K.FAAHTGATAIAGR.F K.NLQVHMEPYLWK.T
Aw-250	Hypothetical protein (60S acidic ribosomal protein)	<i>A.oryzae</i>	Q2UKH6 XP001819941	144	33420	4.90	8	K.TSFFQALGVPTK.I K.GNVGFIFTNGDLK.A K.GNVGFIFTNGDLKATK.E
Aw-162	Heat shock protein 70	<i>C.glabosum</i>	Q2HDM9 XP001220896	116	67261	5.25	4	K.SAVDEIVLVGGSTR.I K.AVITVPAYFNDNQ.R.Q
Aw-287	Multifunctional chaperone (14-3-3 family)	<i>A.oryzae</i>	Q2U6F5_ XP001823993	90	29230	4.79	10	R.YLAEFAIGDR.R R.YLAEFAIGDRR.K K.AATEVAQTDLAPTHPIRL
Aw -319	ATPB_NEUCR ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	<i>A.nidulans</i>	Q5BAW5_ XP659919	66	54818	5.17	5	R.FTQAGSEVSALLGR.I K.VSLVFGQMNEPPGAR.A K.VSLVFGQMNEPPGAR.A
Aw -120	Tubulin alpha-1 subunit	<i>A.fumigatus</i>	Q4WKG5_ XP750005	119	50791	4.98	11	K.YMATCLLYR.G R.TIQFVDWCPTGFK.I R.NLGIERPSEYENLNR.L R.TIYCDLEPNVVDEVR.T K.SSVHEIVLVGGSTR.I R.TTPSFVAFTDTER.L K.IDKSSVHEIVLVGGSTR.I K.NQVAMNPHNTVFDKRL
Aw -66	Hypothetical protein Molecular chaperones HSP70/HSC70	<i>A.oryzae</i>	Q2UBH7_ XP001727927	102	69834	5.11	7	K.SSVHEIVLVGGSTR.I R.TTPSFVAFTDTER.L K.IDKSSVHEIVLVGGSTR.I K.NQVAMNPHNTVFDKRL
Aw-279	Hypothetical protein Electron transfer flavoprotein	<i>A.oryzae</i>	Q2USI6_ XP001817481	86	36134	5.73	4	K.GEYTHIIGGHSAFGK.S K.KGEYTHIIGGHSAFGK.S
Aw-114	Hypothetical protein (26S proteasome regulatory complex)	<i>A.oryzae</i>	Q2UNB2_ XP001818955	39	54636	4.96	6	R.LTHEQSTMRE K.GALMYGPPGTGK.T R.KIEFPLPNEEAR.A R.ANDTTYGLGAAIFTK.D K.VGDPFADDTFQQPVTK. A
Aw-125	Hypothetical protein (Aldehyde dehydrogenase)	<i>A.oryzae</i>	Q2UGV3 XP001821214	103	54245	5.47	6	K.GVLFYGPPTGK.T K.THGFSGADLGFVTQR.A
Aw- 22	Hypothetical protein (Cell division protein Cdc48)	<i>Coccidioides immitis RS</i>	Q1DJV6 XP001239786	73	90069	5.03	3	K.GVLFYGPPTGK.T K.THGFSGADLGFVTQR.A
Aw- 240	Hypothetical protein (Translation initiation factor 3)	<i>A.oryzae</i>	Q2UPM0_ XP001818497	107	37181	4.85	8	R.AYISAPVGVTAER.A R.AADSAAFPVPEYR.Y
Aw- 47	YJL034Wp-like protein (Hsp70 protein)	<i>S.cerevisiae</i>	HHBYK2 EDZ71254	59	74479	4.79	2	K.VTHAVVTVPAYFNDAQR. Q
Aw-277	Hypothetical protein (Transcription factor containing NAC and TS-N domains)	<i>Coccidioides immitis RS</i>	Q1DHR3_ XP001239128	56	22068	4.78	2	K.NILFVINQPDVYR.S
Aw- 324	Hypothetical protein (26S proteasome regulatory complex subunit)	<i>A.oryzae</i>	Q2UQ59_ XP001818308	100	31235	4.94	14	R.IYFPVEPEAAAR.S R.NLMEGSYDKVWRE R.DGRIYFPVEPEAAAR.S R.YYQQLQPFYDLER.D K.DAGQIAGLNLVLR.V K.IVQHTNGDAWVEAR.G K.NAVVTVPAYFNDSQR.Q R.QAVVNPENTLFATKR.L R.KQPFDEAR.Y R.GCAFSCAILSVPFR.V
Aw- 176	Hypothetical protein (Heat shock protein 70KDa)	<i>M. grisea</i>	Q5EN25_ XP361717	109	72561	5.89	8	K.IVQHTNGDAWVEAR.G K.NAVVTVPAYFNDSQR.Q R.QAVVNPENTLFATKR.L R.KQPFDEAR.Y R.GCAFSCAILSVPFR.V
Aw- 27	Hypothetical protein (chaperona molecular HSP105/HSP110/SS E1)	<i>Coccidioides immitis RS</i>	Q1DS52_ XP001242965	59	82823	5.14	3	R.KQPFDEAR.Y R.GCAFSCAILSVPFR.V
Aw- 140	Ornithine aminotransferase	<i>Coccidioides immitis RS</i>	Q1DP01_ XP001240799	58	46720	5.93	5	R.AFYNDVFPFR.F K.GLLAKPTHQNIIR.F K.VAIVCPPTIYGPR.G
Aw- 211	Hypothetical protein (nucleoside-diphosphate-sugar epimerase, putative)	<i>A. nidulans</i>	Q5BB55_ XP_659829	42	37579	6.22	4	K.VAIVCPPTIYGPR.G
Aw- 288	Ran-binding protein RANBP1	<i>A.oryzae</i>	Q2U689 XP_001824059.1	38	27607	4.85	6	K.TTDSVFSMFGGPKK.E K.TTDSVFSMFGGPKK.E K.AFPESVYR.Q K.LKAFPESVYR.Q
Aw- 256	Predicted protein (NADH-ubiquinone oxidoreductase)	<i>A.oryzae</i>	Q2U057 XP_001826191.1	50	26883	4.79	4	K.AFPESVYR.Q K.LKAFPESVYR.Q
Aw- 243	Multifunctional chaperone	<i>A.oryzae</i>	Q2U6F5_ XP_001823993.1	131	29230	4.79	9	R.YLAEFAIGDR.R R.YLAEFAIGDRR.K K.GNESQVTLIKEYR.Q K.SSVHEIVLVGGSTR.I R.TTPSFVAFTDTER.L R.ARFEELCQDLFR.G K.IDKSSVHEIVLVGGSTR.I K.NQVAMNPHNTVFDKRL
Aw- 56	Molecular chaperones HSP70/HSC70 Hsp70 chaperone (Hsp70), putative.	<i>A.oryzae</i>	Q2UBH7_ XP_001727927.1	156	69834	5.11	9	R.YLAEFAIGDR.R R.YLAEFAIGDRR.K K.GNESQVTLIKEYR.Q K.SSVHEIVLVGGSTR.I R.TTPSFVAFTDTER.L R.ARFEELCQDLFR.G K.IDKSSVHEIVLVGGSTR.I K.NQVAMNPHNTVFDKRL

<sup>a</sup> Putative molecular function.<sup>b</sup> Accession number of the protein in the GenBank database.<sup>c</sup> Percent of protein sequence covered by matched peptides.

		MEDIUM	
		MEA	YES
Conidial volum ( $\text{nm}^3$ )	ITAL142	6.73 aa	9.08 ba
	ITA142-T10	6.55 aa	7.91 bb
Conidial broad ( $\mu\text{m}$ )	ITAL142	2.4-2.3	2.7-2.4
	ITA142-T10	2.4-2.2	2.6-2.3

Table 03

227

ITAL 142	CGACCTTTCG	TCCTACCGAA	GAGGAGTTCA	GGGATCCGGA	AGCATAACATT	CGGAAGATCG
An 09g05800	CGACCTTTCG	CCCGACAGAG	GAGGAGTTCA	AGGATCCCGA	GGCATAACATC	CGCAAGATCG
ITAL 142-T10	<b>CAGTGTTTGA</b>	TCCTACCGAA	GAGGAGTTCA	GGGATCCGGA	AGCATAACATT	CGGAAGATCG
Consensus	*     ***	** ** *	*****	***** *	*****	** *****

287

ITAL 142	CGCCCGAGGG	CAAGAAATAT	GGAATTTGCA	GGGTTATTCC	ACCTGAAGGA	TGGCAACCC
An 09g05800	CGCCCGAGGG	GAAGAAATAT	GGAATTTGCC	GGATCATTCC	GCCCGAGAAC	TGGCAACCG
ITAL 142-T10	CGCCCGAGGG	CAAGAAATAT	GGAATTTGCA	GGGTTATTCC	ACCTGAAGGA	TGGCAACCC
Consensus	*** * **	*****	*****	** * **	** **	*****

Fig.01

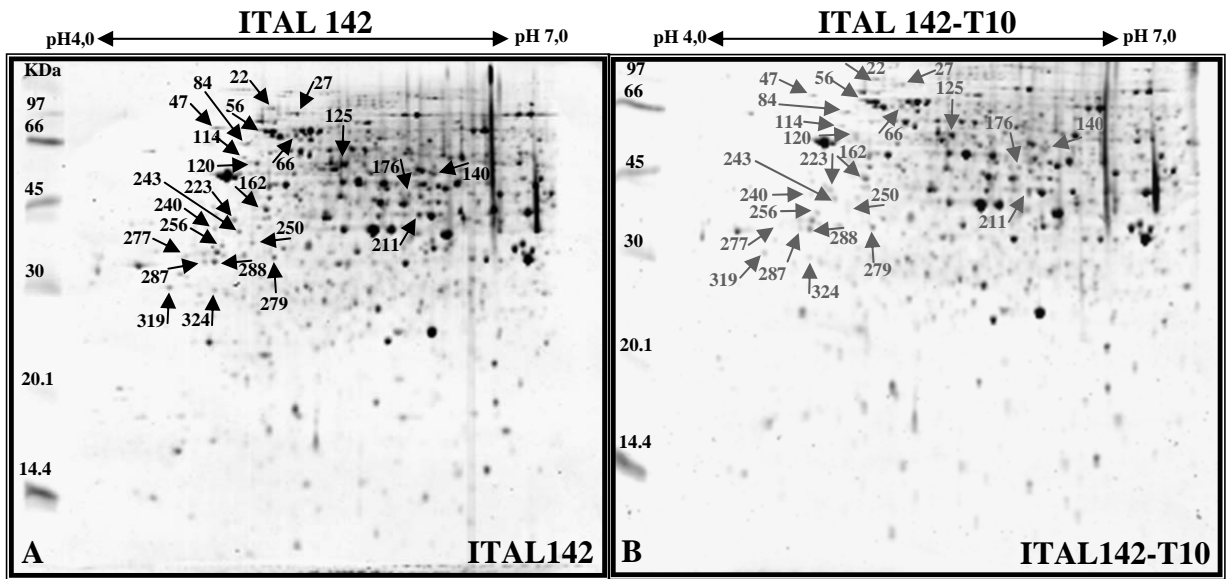


Fig.02

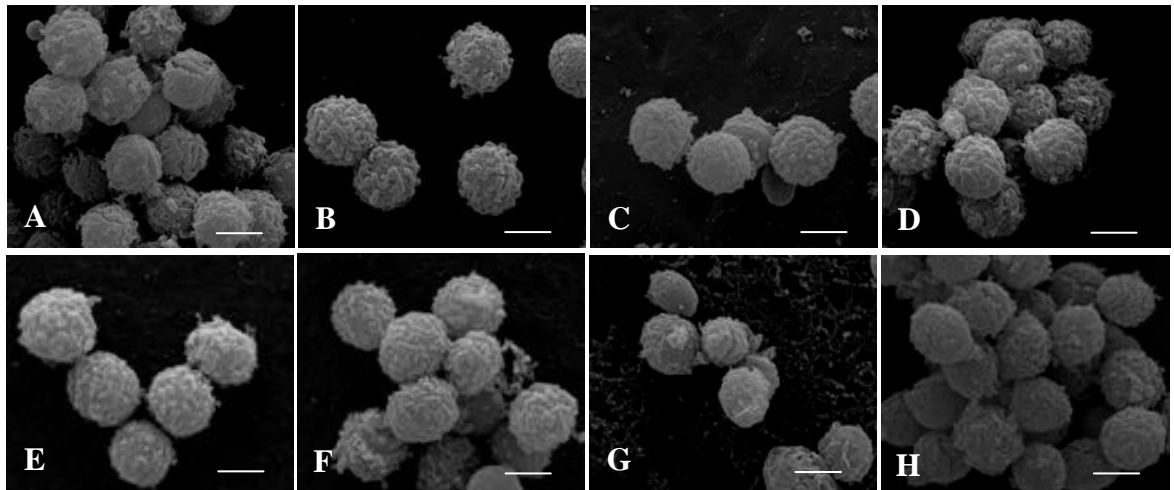


Fig.03

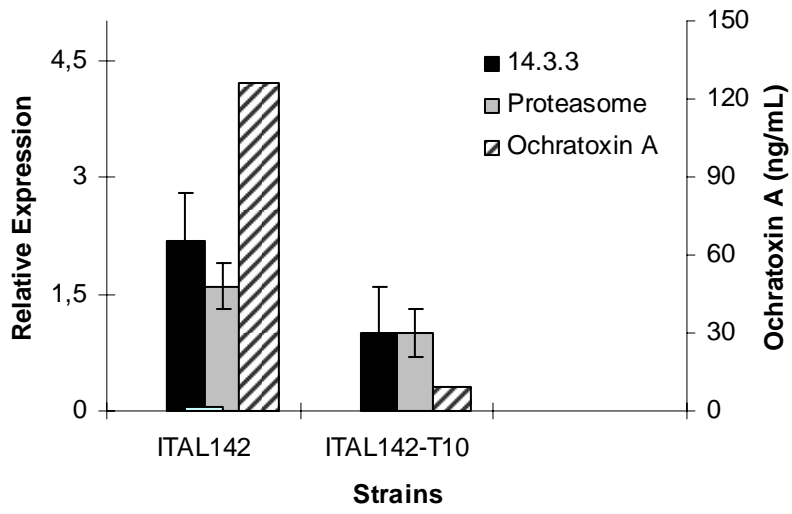


Fig.04



#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A Análise da Expressão Diferencial (RDA) entre as linhagens UEL91 (produtora de ocratoxina A) e ITAL163 (não produtora de ocratoxina A) permitiu o isolamento de 260 transcritos, com redundância média de 16,5 e com 14 transcritos diferentes.
- Com a técnica de RDA foram obtidas três oxidases, denominadas P450-AL, P450-PH e OXI-1, no qual duas apresentaram maior expressão diferencial (P450-AL – 32 vezes e OXI-1 – 20 vezes) entre as linhagens UEL91 e ITAL163, cultivadas em meio permissivo (YES) à produção de ocratoxina A (OA).
- Associação entre quantidade de OA e de ambos os transcritos selecionados P450-AL e OXI-1, cultivados em meio permissivo (YES), semi-permissivo (CY) e restritivo (EM) foi encontrada, embora em diferentes magnitudes.
- A linhagem mutante (ITAL142-T10) de *Aspergillus westerdijkiae* possui um gene interrompido com similaridade ao loco An09g05800 de *A.niger* anotado como codificando um fator de transcrição putativo do tipo PHD (Rum1).
- A análise proteômica diferencial entre as linhagens ITAL142 (selvagem) e ITAL142-T10 (mutante) de *A. westerdijkiae* em meio permissivo a produção de OA, permitiu identificar 23 proteínas induzidas em ITAL142.
- A maior frequência de proteínas identificadas foram proteínas de resposta a stress (36,4%) e subunidade regulatória 26S do proteassoma (9,1%).
- Nenhuma proteína identificada em ITAL142 foi exclusiva de vias de produção de metabólitos secundários.
- Alteração na produção de conídios foi encontrada entre ITAL142 com menor número e maior volume de conídios comparado a ITAL142-T10 com maior número (10 vezes) e

menor volume de conídios em meio YES. Em meio MEA, restritivo à produção de OA, nenhuma alteração foi encontrada na produção e volume de conídios.

- A análise transcricional das duas proteínas selecionadas, 14-3-3 e subunidade regulatória 26S do proteassoma, confirmaram maior expressão relativa em ITAL142 comparado a ITAL142-T10 e apresentaram associação com a quantidade OA em meio permissivo (YES).