

Obtenção de mutantes de *Aspergillus carbonarius* via transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Generation of *Aspergillus carbonarius* mutants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method

Lígia Uno Lunardi¹; Carla Beatriz Fier¹; Fernando Yuldi Ashikaga²;
Luiz Rodrigo Morioka³, Maria Helena Pelegrinelli Fungaro⁴

Resumo

Aspergillus carbonarius é um potente produtor de ocratoxina A, uma toxina que apresenta efeitos nefrotóxico e carcinogênico. O conhecimento de genes envolvidos em sua biossíntese pode contribuir para o desenvolvimento de medidas de controle. O método de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens* tem sido demonstrado como uma importante ferramenta para a obtenção de mutantes insercionais visando à caracterização de novos genes. O objetivo deste trabalho foi adequar o método de transformação genética via *A. tumefaciens* para a linhagem ITAL187 de *A. carbonarius* e obter mutantes alterados para a produção de ocratoxina A. Conídios foram transformados para resistência a higromicina B usando a linhagem AGL-1 de *A. tumefaciens*. A frequência média de transformação foi de 20,04 transformantes por 10⁵ conídios-alvo. A prova física da transformação foi obtida pela detecção do gene *hph* por PCR e Southern Blot. Esta última demonstrou que a integração do DNA exógeno ocorreu de forma aleatória no genoma fúngico. Dentre 238 transformantes, 12 (5,042%) mostraram variações morfológicas. Três mutantes (T44, T47 e T188) com significativa redução e dois mutantes (T238 e T162) com aumento da capacidade de produção de ocratoxina A foram obtidos. A identificação dos genes nocauteados contribuirá para a compreensão da biossíntese desta toxina.

Palavras-chave: *Aspergillus carbonarius*. Ocratoxina A. *Agrobacterium tumefaciens*. Transformação genética. Mutantes insercionais.

Abstract

Aspergillus carbonarius is a potent ochratoxin A producer, a mycotoxin that has nephrotoxic and carcinogenic effects. The knowledge of genes involved in biosynthesis of this toxin may be useful for the development of detection and control methods. The *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method has been demonstrated as a powerful tool to obtain insertional mutants for the characterization of new genes. The aim of this work was to adapt the *A. tumefaciens*-mediated transformation method for ITAL187 strain of *A. carbonarius* and to obtain transformants with alteration in ochratoxin A production. Conidia were transformed to hygromycin B resistance using AGL-1 strain of *A. tumefaciens*. The transformation frequency was 20,04 transformants per 10⁵ target conidia. The transformation evidence was obtained by PCR and Southern Blot analysis. The last one showed us that

¹ Bolsista PIBIC/CNPq/Uel – UEL

² Aluno de mestrado do Programa de Genética e Biologia Molecular-Uel.

³ Aluno de doutorado do Programa de Tecnologia de Alimentos-Uel.

⁴ Docente do Depto. de Biologia Geral (CCB) da Uel. E-mail: fungaro@uel.br.

the *hph* gene integration was randomly in the genome fungi. Among 238 transformants, a total of 12 (5,042%) showed morphological variations. Three transformants (T44, T47 and T188) with consistently reduced and two transformants (T238 and T162) with increased ochratoxin A production were obtained. The identification of nocauted genes will contribute to ochratoxin A biosynthesis clarify.

Key words: *Aspergillus carbonarius*. Ochratoxin A. *Agrobacterium tumefaciens*. Genetic transformation. Insertional mutants.

Introdução

As exigências no controle de qualidade e nas condições higiênico-sanitárias dos produtos são fundamentais e estão se tornando cada vez mais rigorosas, especialmente para os produtos destinados à alimentação humana e animal. Contaminações em alimentos causadas por fungos têm sido assunto de diversas pesquisas no mundo. Estima-se que aproximadamente 25% da produção anual de alimentos derivados de plantas são deteriorados por fungos. Parte destes fungos tem potencial para a produção de micotoxinas e representam um dos fatores de preocupação para a saúde.

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies fúngicas (VARGA et al., 2003). Dentre as micotoxinas mais comumente encontradas em alimentos, a ocratoxina A tem despertado atenção mundial pelas suas propriedades nefrotóxica, imunossupressiva, teratogênica e carcinogênica (LEA; STEIEN; STORMER, 1989). Por sua ação, a ocratoxina A foi classificada pela “International Agency for Research on Cancer” como um possível carcinógeno para humanos (categoria 2B) (KUIPER-GOODMAN; SCOTT, 1989; PETZINGER; ZIEGLER, 2000).

A presença de ocratoxina A em alimentos vem sendo considerada um problema mundial de saúde pública. Em uma grande variedade de produtos agrícolas em várias regiões geográficas do mundo já foi detectada a ocratoxina A (URBANO et al., 2001). Muitos destes alimentos são grãos, como cevada, milho, centeio, trigo e aveia (JORGENSEN; JACOBSEN, 2002), além de estar presente em outros produtos incluindo café, especiarias, nozes, azeitonas, uvas, e figos (BATTILANI et al., 2003; BATISTA et al., 2003; BAYMAN et al., 2002; JORGENSEN,

1998). A ocratoxina sobrevive a processamentos e pode ser encontrada em pães (SCUDAMORE; BANKS; MCDONALD, 2003), café bebida (PITTET, et al., 1996), vinhos (CABAÑES et al., 2002) e cervejas (ODHAV; NAICKER, 2002).

A ocratoxina A foi originalmente isolada como um metabólito secundário do fungo filamentosos *Aspergillus ochraceus* (VAN DER MERWE, et al, 1965). Em anos subseqüentes, muitas outras espécies de *Aspergillus* como *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. sulphureus* e *A. melleus* (ABARCA et al., 1994; CIEGLER, 1972) entre outras foram descritas como produtoras de ocratoxina A. Dentre as espécies do gênero *Aspergillus* produtoras desta micotoxina, *Aspergillus carbonarius* tem se destacado por ser considerada uma das maiores fontes de contaminação de ocratoxina A em alimentos como frutas secas, vinho e café (MAGNOLI et al., 2003; CABAÑES et al., 2002; PARDO et al., 2004).

Algumas informações sobre a composição química da ocratoxina A são conhecidas. Sabe-se que esta toxina é derivada da dihidroisocumarina ligado a um grupo L-β fenilalanina mediante uma ligação amida (HARRIS; MANTLE, 2001) e apresenta uma molécula de cloro em sua estrutura responsável pelo seu caráter tóxico. No entanto, o conhecimento da via biossintética desta micotoxina é ainda muito limitado. Até o momento foram descritos três genes relacionados à biossintese da ocratoxina A em *A. ochraceus*. Um destes genes foi denominado *pks* e codifica uma policetídeo sintase, similar a policetídeos sintases fúngicas envolvidas na biossintese de outras micotoxinas (O’CALLAGHAN; CADDICK; DOBSON, 2003). Outros dois genes envolvidos na via biossintética são tipos de monooxigenases p450, denominados gene *p450-H11* e gene *p450-B03* (O’CALLAGHAN; STAPLETON; DOBSON, 2006).

Para *A. carbonarius*, nenhum gene envolvido em passos da biossíntese da ocratoxina A foi descrito. Diferentes procedimentos podem ser utilizados para a identificação destes genes e um deles é o uso de mutantes insercionais. Dos métodos para obtenção destes mutantes, a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem sido muito utilizada. Esta metodologia, para fungos filamentosos, foi descrita por De Groot et al. (1998) e faz uso da bactéria de solo aeróbia Gram-negativa *A. tumefaciens* que já há muitos anos vem sendo utilizada para a transferência de genes em plantas (TINLAND, 1996) e também amplamente explorada para clonar genes, promotores, e seqüências regulatórias.

Uma das vantagens da transformação via *A. tumefaciens* em relação aos outros métodos é a praticidade, uma vez que dispensa a obtenção de protoplastos e o uso de equipamentos de alto custo. Além disso, tem-se alta eficiência de transformação e a predominância de transformantes com o DNA exógeno integrado em cópia única ao genoma (DE GROOT ET AL. 1998; MULLINS et al., 2001). Essas características fazem deste sistema um importante método de análise genética de fungos filamentosos, como para estudos de nocaute e expressão gênica.

Neste trabalho descreve-se a transformação genética via *A. tumefaciens* para a linhagem ITAL 187 de *A. carbonarius* e a seleção de mutantes insercionais para a produção de ocratoxina A. Estes mutantes estão disponíveis na micoteca do Laboratório de Genética de Biologia Molecular da UEL e podem ser utilizados em estudos posteriores relacionados à identificação e clonagem de genes envolvidos em passos da via biossintética da ocratoxina A.

Metodologia

Linhagem de Agrobacterium tumefaciens e do isolado fúngico

A linhagem AGL1 de *A. tumefaciens* (ATCC/BAA-101), gentilmente cedida pelo Dr. C. Peter

Romaine da Universidade da Pensilvânia (EUA), foi utilizada para realizar a transformação genética. Esta linhagem foi inoculada em meio Luria-Bertani (LB) contendo os antibióticos estreptomicina (50 mg/mL) e canamicina (50 mg/mL) para a manutenção do sistema binário: plasmídio Ti desarmado + vetor binário pPK2 (10,77 Kb). Este vetor, derivado do pPZP201 (HAJDUKIEWICS; SAVAB; MALIGA, 1994), possui as bordas esquerda e direita do T-DNA flanqueando o gene da fototransferase (gene *hph*) de *Escherichia coli*, que confere resistência a higromicina B. Este gene é controlado pelo promotor *gpd* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e pela seqüência terminal *trp C* (síntese de triptofano), ambos de *Aspergillus nidulans*. No plasmídio Ti encontra-se o gene *kan*, marcador genético para resistência a canamicina.

A linhagem fúngica de *A. carbonarius* transformada foi a ITAL 187. Esta linhagem foi gentilmente cedida pela Dr^a. Marta Hiromi Taniwaki do Instituto de Tecnologia de Alimentos em Campinas (ITAL). Trata-se de uma linhagem isolada de grãos de café e previamente caracterizada como altamente produtora de ocratoxina A pelo ITAL.

Teste de sensibilidade da linhagem fúngica a higromicina B

Antes dos experimentos de transformação, a linhagem ITAL 187 foi avaliada para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A CIM permite determinar qual é a concentração mínima de higromicina B em que o crescimento do fungo é inibido. O valor do CIM encontrado foi utilizado para a posterior seleção dos transformantes.

Para isto, a linhagem fúngica foi inoculada em placas de Petri contendo 20 mL de meio completo (MC) de Pontecorvo et al. (1953) acrescido de quantidades crescentes de higromicina B (0, 15, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 mg/mL). Após 7 dias de incubação foi feita a leitura da capacidade de crescimento nas diferentes concentrações de higromicina B e a determinação do CIM.

Transformação genética mediada por A. tumefaciens

A transformação genética da linhagem ITAL 187 foi realizada como descrito por Morioka et al. (2006) com algumas modificações. Rapidamente, após cinco dias de crescimento da linhagem ITAL 187 em MC a 28°C, foi preparada uma suspensão contendo 1×10^6 conídios/mL de meio de indução. A linhagem AGL1 foi inoculada em meio LB suplementado com estreptomicina (50 mg/mL) e canamicina (50 mg/mL) e mantida a 28°C e 180 rpm durante 12 horas. Após este período, esta cultura foi diluída para uma densidade óptica (D.O.), a A_{660nm} , de 0,15 em meio de indução. A cultura foi mantida a 28°C e 180 rpm até atingir D.O._{660nm} entre 0,6 e 0,8. Nestas condições este tempo de indução foi de aproximadamente seis horas.

Após este período, as suspensões de bactéria (com D.O._{660nm} entre 0,6 e 0,8) e do fungo (1×10^6 conídios/mL) foram misturadas em igual proporção (1:1, 100 µL). Esta mistura foi plaqueada em membrana de nitrocelulose (0,45 mm de porosidade e 90 mm de diâmetro, MFS, Japão) posicionadas sobre meio de indução sólido contendo acetoseringona (200 mM) e incubadas a 28°C por 36 horas (período denominado co-cultivo). Após este tempo, as membranas foram transferidas para placas de Petri contendo meio seletivo sólido M-100, suplementado com 150 µg/mL de cefoxitina (Eurofarma) e 75 µg/mL de higromicina B (Invitrogen) para seleção dos transformantes. A concentração de higromicina B utilizada para a seleção dos transformantes foi maior que o valor encontrado pelo CIM.

As colônias visualizadas após 4 a 5 dias foram contadas e repicadas em placas de Petri contendo meio MC, suplementado com 75 µg/mL de higromicina B, e incubadas até a conidiogênese.

Avaliação fenotípica dos transformantes

Os transformantes foram repicados em placas de Petri contendo meio MC acrescido de 75 µg/mL de higromicina B. Após 5 dias de crescimento, os transformantes foram analisados quanto à capacidade de esporulação e coloração dos esporos assexuais,

comparando com a linhagem selvagem. As colônias que apresentaram esporulação reduzida e/ou coloração alterada foram classificadas como mutantes morfológicos.

Análise dos transformantes quanto ao nível de resistência a higromicina B

Para determinar o nível de resistência a higromicina B, um total de 26 transformantes foi inoculado em placas de 26 pontos, contendo meio MC sólido em diferentes concentrações de higromicina B (0, 25, 50, 75, 150, 300, 600, 900 e 1200 mg/mL). A linhagem selvagem foi utilizada como controle.

Seleção de mutantes para produção de ocratoxina A

Os transformantes foram analisados quanto à capacidade de produção de ocratoxina A em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-coco, conforme descrito por Heenan, Shaw e Pitt (1998). Em cada placa foi inoculado um transformante juntamente com a linhagem selvagem e, após 5 dias de crescimento, as placas foram analisadas sob luz ultravioleta em que a ocratoxina A torna-se fluorescente. As colônias transformantes que apresentaram alteração na fluorescência azul esverdeada em relação à linhagem selvagem, foram consideradas possíveis mutantes para ocratoxina A. Estas colônias foram selecionadas para posterior análise em HPLC.

Confirmação do fenótipo mutante para ocratoxina A pelo método de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)

A metodologia usada para análise em HPLC foi descrita por Bragulat, Abarca e Cabañes (2001). Os mutantes selecionados foram inoculados em placas de Petri contendo meio extrato de levedura-sacarose (YES). As placas foram incubadas por 5 dias a 28°C. Após este período, três áreas de 0,5 x 0,5 cm foram recortadas do meio, pesadas e submetida à extração da micotoxina com metanol. Cada amostra foi filtrada

(Millex-Millipore, Massachusetts, USA) e injetada no sistema HPLC. O equipamento de HPLC usado foi o Shimadzu LC-10VP System (Shimadzu, Japan) com um detector de fluorescência de 333 nm de excitação e 477 nm de emissão. O HPLC foi ajustado com uma coluna de guarda Shimadzu CLC G-ODS (4 x 10 mm) e uma coluna Shimadzu Shimpack CLC-ODS (4.6 x 250 mm). A fase móvel foi metanol: acetonitrila: água deionizada: ácido acético (35:35:29:10) e a taxa de fluxo foi 0,8 mL/min. Uma ocratoxina A padrão (Sigma Chemical, St Louis, USA) foi usada para a construção de uma curva de calibração, área de pico versus massa (ng). A concentração de ocratoxina A no extrato da amostra foi determinada pela interpolação da área de pico resultante a partir do gráfico de calibração.

Extração de DNA genômico

Foram escolhidos 14 transformantes ao acaso e a linhagem selvagem para a extração do DNA genômico. Para cada transformante e para a linhagem selvagem foi realizada uma suspensão de conídios em tween 80 e inoculada em frascos tipo erlenmeyer contendo MC líquido. Decorrido 24 horas de incubação a 28°C e 180 rpm o micélio foi coletado por filtração e submetido à extração de ácidos como descrito por Azevedo et al. (2000).

Análise dos transformantes pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

A presença do fragmento do gene *hph* que confere resistência a higromicina B foi confirmada nos transformantes por PCR. Cada reação de amplificação foi preparada para um volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl, 10x concentrado, Invitrogen – Life Technologies); 2,0 µL de dNTP (2,5 mM, Invitrogen – Life Technologies); 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen – Life Technologies); 1,5 µL de primer *hph* 1 (5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3') e 1,5 µL *hph* 2 (5'-CGCGTCTGCTGCTCCATAC-3') (10 pmol/mL, Invitrogen – Life Technologies); 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/mL, Invitrogen – Life

Technologies); 3 µL da amostra de DNA (5 ng/mL). O volume final foi completado com água ultrapura. Para amplificação foi utilizado o termociclador PTC100 (MJ RESEARCH, INC). As condições de ciclagem foram utilizadas conforme descrito por Malonek e Meinhardt (2001).

Análise da integração do DNA exógeno nos transformantes por Southern Blot

Para a análise por Southern Blot os DNAs extraídos foram inicialmente tratados com RNase A (Invitrogen – Life Technologies). O tratamento foi realizado da seguinte forma: diluiu-se o DNA genômico para 100 ng/µL e, a este, adicionou-se 1 µL de RNA A (20 mg/mL) completando o volume para 100 µL de água esterelizada. A reação foi incubada a 37°C (em banho-maria) por 30 minutos e, após este tempo, a reação foi interrompida por aquecimento a 65°C por 5 minutos. Após este tratamento com RNase, os DNAs foram submetidos à hidrólise com a enzima de restrição *Sst*I (Invitrogen, Life Technologies) a 10 U/mL. Esta enzima reconhece e cliva uma seqüência de nucleotídeos presente em uma das extremidades do cassete de expressão. A reação de restrição foi feita em um volume total de 100 µL, contendo 5 µg de DNA, 10 µL de tampão React[®] 2 (10% do volume total, Invitrogen – Life Technologies) e 20 U da enzima *Sst*I (2 µL). A reação foi incubada a 37°C (em banho-maria) durante 12 horas, e após este período a enzima foi inativada por aquecimento a 65°C por 10 minutos. Para concentrar a amostra hidrolisada foi feita uma precipitação adicionando-se 10 µL de NaCl (3 M) e 250 µL de álcool etílico absoluto gelado. Após incubação a -20°C por 12 horas, o material foi centrifugado (10.000 rpm por 10 minutos) e o precipitado foi lavado com álcool 70%. Após secagem em temperatura ambiente, o DNA hidrolisado foi ressuspenso em 10 µL de água estéril. Os 10 µL de DNA hidrolisado foram colocados em gel de agarose 0,8% (p/v). A eletroforese foi realizada a 3 V por cm de distância entre os eletrodos. Após a eletroforese, o DNA foi transferido para uma membrana de náilon (HYBOND-N – AMERSHAM), conforme descrito em Brasileiro e Carneiro (1998).

Hibridação do DNA genômico dos transformantes

A hibridação foi realizada conforme recomendado pelo protocolo do Kit “DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II” (Roche). A membrana, contendo o DNA genômico restringido dos transformantes e linhagem controle, foi colocada em saco plástico contendo 4,24 mL de solução de pré-hibridação (como fornecida pelo Kit) e incubada a 42°C, sob agitação de 50 rpm, por 30 minutos. Decorrido este tempo, a solução de pré-hibridação foi retirada. Cerca de 106 ng de sonda previamente desnaturados a 100°C por 5 minutos seguido de resfriamento em gelo, foram suspensos em 4,24 mL de solução de hibridação, e então colocados no saco plástico contendo a membrana. A membrana foi incubada por 18 horas a 42°C, sem agitação.

Após hibridação, a membrana foi inicialmente lavada duas vezes com SSC 2x, SDS 0,1% por 5 minutos a 28°C, com agitação branda, e mais duas vezes com SSC 0,5x, SDS 0,1% por 15 minutos a 68°C, agitação branda. Em seguida, foi lavada em tampão de lavagem (ácido maléico 0,1 M; NaCl 0,15 M; Tween 20 0,3 % (v/v), pH 7,5) por 5 minutos a 30°C e 50 rpm, e incubada em 121 mL de solução de bloqueio (fornecida pelo Kit), diluído 1:10 em tampão de ácido maléico (ácido maléico 0,1 M; NaCl 0,15 M, pH 7,5), por 30 minutos a 30°C e 50 rpm. A membrana ainda foi incubada por 30 minutos a 30°C e agitação branda em 24,2 mL de solução de anticorpo (fornecida pelo Kit), anteriormente diluída 1:10000 em solução de bloqueio 1:10, e novamente lavada duas vezes em tampão de lavagem por 15 minutos a 30°C e 50 rpm. Por último, a membrana foi incubada em 24,2 mL de tampão de detecção (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 0,1 M pH 9,5) por 5 minutos a 30°C e agitação branda. A membrana foi colocada sobre uma folha de transparência e em sua face contendo o DNA foram aplicados 121 mL de CSPD (fornecido pelo Kit). Em seguida a membrana foi coberta com outra folha de transparência e incubada por mais 5 minutos a 30°C. O excesso de líquido entre as folhas de transparência, entre as quais estava a

membrana, foi retirado rolando-se um bastão de vidro sobre elas. A membrana foi incubada por 10 minutos a 37°C e exposta a filme de raio-X (IBF-MEDIX – AGFA) durante 1 hora e 30 minutos. Após a exposição, o filme foi revelado no aparelho GLUNZ & JENSEN modelo MULTI-X 36.

Resultados e Discussão

Inicialmente a linhagem ITAL 187 de *A. carbonarius* foi testada quanto a sua sensibilidade à higromicina B. Na análise de diferentes concentrações do antibiótico, o crescimento do fungo foi totalmente inibido em placas de MC que continham pelo menos 50 µg/mL de higromicina B (CIM). Este nível de sensibilidade foi similarmente observado para outras espécies de *Aspergillus* (PUNT et al., 1987) e já havia sido relatada para a linhagem ITAL 99 de *A. carbonarius* por Morioka et al. (2006). Portanto, foram utilizados 75 µg/mL de higromicina B para a seleção dos transformantes resistentes a este antibiótico.

O co-cultivo de *A. carbonarius* com *A. tumefaciens* resultou em colônias resistentes à higromicina B após 4 a 5 dias da transferência das membranas do co-cultivo para o meio seletivo. Em média a frequência de transformação (quatro experimentos de transformação independentes) foi de 20,04 transformantes para cada 10⁵ conídios.

A análise de 25 transformantes quanto ao nível de resistência a higromicina mostrou que 100% deles eram capazes de crescer em concentração de até 150 µg/mL de higromicina B. No entanto o nível máximo de resistência à higromicina foi variável dentre os transformantes. Esta variação pode ser decorrente no número de cópias do gene *hph* no genoma fúngico ou do local de integração do gene de resistência.

A prova física da transformação foi obtida através da detecção da amplificação de uma porção do gene *hph*. Em todos os 14 transformantes analisados detectou-se, como esperado, um fragmento de 600 pb (Figura 1).

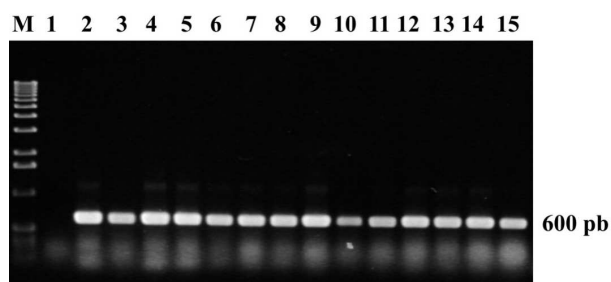


Figura 1. Prova física da transformação obtida através da detecção do gene exógeno *hph* por reações de PCR. M: marcador; 1: controle negativo (selvagem); 2-15: transformantes.

A aleatoriedade da integração do gene *hph* no genoma fúngico é um parâmetro importante quando se deseja obter mutações insercionais ao acaso. A Figura 2 mostra o resultado do Southern Blot realizado com sete transformantes escolhidos ao acaso. As diferenças de massas moleculares dos fragmentos revelados mostram a aleatoriedade da integração e conseqüentemente a potencialidade do método para a seleção de mutantes aleatórios.

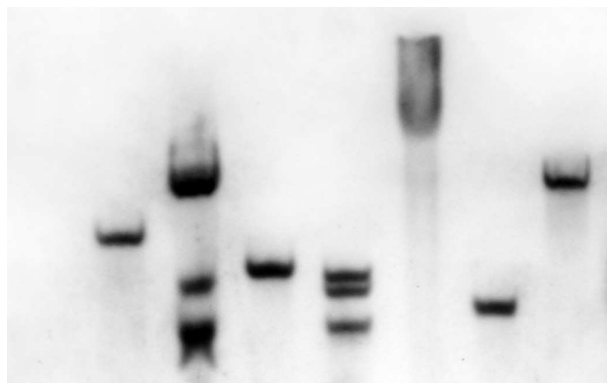


Figura 2. Análise da integração do gene *hph* nos transformantes por Southern Blot C: controle negativo (selvagem); 1-7: T32, T44, T47, T104, T162, T188, T238.

A eficiência deste método para a obtenção de mutantes de *A. carbonarius* revelou-se na medida em que foram obtidos mutantes morfológicos e/ou com alteração na produção de ocratoxina A. A análise fenotípica de 238 transformantes demonstrou que 12 deles (5,04%) apresentaram alterações morfológicas, como redução da capacidade de crescimento e esporulação e alteração na coloração dos esporos assexuais, em comparação com a linhagem original de *A. carbonarius*.

Dentre os 238 transformantes analisados em meio agar-coco para a produção de ocratoxina A, nove (3,7%) possíveis mutantes com redução da produção desta toxina foram identificados baseado na redução e/ou ausência de fluorescência azul esverdeada na colônia sob luz ultravioleta. Por outro lado, dois (0,8%) supostos mutantes com aumento na produção desta toxina também foram identificados. Nestes mutantes, a fluorescência encontrada foi visualmente maior quando comparada com a fluorescência da linhagem selvagem.

A capacidade destes onze possíveis mutantes de produzir ocratoxina A foi analisada por HPLC. Esta metodologia permitiu quantificar a redução ou aumento da ocratoxina A dos mutantes em relação à linhagem selvagem. Dos nove possíveis mutantes analisados, três (T 44, T 47, T 188) mostraram-se com significativa redução da produção de ocratoxina A. O aumento na produção desta toxina foi confirmada nos dois mutantes analisados em meio agar-coco (T 238 e T 162). A quantificação da produção da ocratoxina A por estes mutantes é demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1. Quantificação da ocratoxina A por HPLC.

Amostras	Ocratoxina ($\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$)	% relativa
ITAL 187 (selvagem)	3650.89	100
T 188	61.60	1.69
T 44	103.68	2.84
T 47	298,27	8,17
T 162	39973.00	----
T 238	22685,67	----

Os resultados apresentados neste trabalho mostram pela primeira vez que a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* é um importante mutagênico para *A. carbonarius*. Os mutantes de *A. carbonarius* com produção reduzida e aumentada de ocratoxina estão disponíveis na micoteca do Laboratório de Genética de Biologia Molecular da UEL e podem ser utilizados em estudos relacionados à identificação e clonagem de genes envolvidos em passos da via biossintética desta micotoxina.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida. À Fundação Araucária, FINEP e CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLA, G.; CABANES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.60, n.7, p.2650-2652, 1994.
- AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GOMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumoroseus* (Deuteromycotina Hyphomycetes) isolates. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v.57, p.729-732, 2000.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxicogenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.85, n.3, p.293-300, aug. 2003.
- BATTILANI, P.; PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; LANGUASCO, L.; GIORNI, P.; KOZAKIEWICZ, Z. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.66, n.4, p.633-666, apr. 2003.
- BAYMAN, P. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.68, n.4, p.2326-2329, 2002.
- BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.71, n.2/3, p.139-144, 2001.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. C. *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: SPI/ EMBRAPA, 1998.
- CABAÑES, F. J.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CASTELLA, G. MINGUEZ, S.; PONS, A. What is the source of ochratoxin A in vine? *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.79, n.3, p.213-215, dec. 2002.
- CIEGLER, A. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.18, n.5, p.631-636, 1972.
- DE GROOT, M. J. A.; BUNDOCR, P.; HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERS BERGEN, A. G. M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, New York, v.16, n.11, p.839-842, nov. 1998.
- HAJDUKIEWICZ, P.; SVAB, Z.; MALIGA, P. The small versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology*, New York, v.25, n.6, p.989-994, sep. 1994.
- HARRIS, J. P.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, New York, v.58, n.5, p.709-716, nov. 2001.
- HEENAN, C. N.; SHAW, K. J.; PITT, J. J. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology, Great Britain*, v.1, p.67-72, 1998.
- JORGENSEN, K. A survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, London, v.15, n.5, p.550-554, jul. 1998.
- JORGENSEN, K.; JACOBSEN, J. S. Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992-1999. *Food Additives and Contaminants*, London, v.19, n.12, p.1184-1189, 2002.
- KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P. M. Review: risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences*, San Diego, v.2, p.179-248, 1989.
- LEA, T.; STEIEN, K.; STORMER, C. Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia*, Den Haag, v.107, n.2/3, p.153-159, sep. 1989.
- MAGNOLI, C.; VIOLANTE, M.; COMBINA, M.; PALACIO, G.; DALCERO, A. Mycoflora and ochratoxin-production strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v.37, n.2, p.179-183, 2003.
- MALONEK, S.; MEINHARDT, F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morganii*. *Current Genetics*, New York, v.40, n.2, p.152-155, sep. 2001.
- MORIOKA, L. R. I.; FURLANETO, M. C.; BOGAS, A. C.; POMPERMAYER, P.; DUARTE, R. T. D.; VIEIRA, M. L. C.; WATANABE, M. A. E.; FUNGARO, M. H. P. Efficient genetic transformation system for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. *Current Microbiology*, New York, v.52, n.6, p.469-472, jun. 2006.
- MULLINS, E. D.; CHEN, X.; ROMAINE, P.; RAINA, R.; GEISER, D. M.; KANG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, Saint Paul, v.91, n.2, p.73-180, feb. 2001.

- O'CALLAGHAN, J.; CADDICK, M. X.; DOBSON, A. D. W. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*, Reading, v.149, p.3485-3491, 2003.
- O'CALLAGHAN, J.; STAPLETON, P. C.; DOBSON, A. D. W. Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics and Biology*, Orlando, v.43, n.4, p.213-221, 2006.
- ODHAV, B.; NAICKER, V. Mycotoxins in South-African traditionally brewed beers. *Food Additives and Contaminants*, London, v.19, n.1, p.55-61, jan. 2002.
- PARDO, E.; MARIN, S.; RAMOS, A.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxin fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. *Food Science and Technology International*, London, v.10, n.1, p.45-49, feb. 2004.
- PETZINGER, E.; ZIEGLER, K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Oxford, v.23, n.2, p.91-98, apr. 2000.
- PITTET, A.; TORNARE, D.; HUGGETT, A.; VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v.44, n.11, p.3564-3569, nov. 1996.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, New York, v.5, p.141-148, 1953.
- PUNT, P. J.; OLIVER, R. P.; DINGEMANSE, M. A.; POWWELS, P. H.; VANDENHONDEL, C. A. M. J. J. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*, Amsterdam, v.56, n.1, p.117-124, 1987.
- SCUDAMORE, K. A.; BANKS, J.; MCDONALD, K. J. The fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. *Food Additives and Contaminants*, London, v.20, n.12, p.1153-1163, dec. 2003.
- TINLAND, B. The integration of T-DNA in plant genomes. *Trends in Plant Science*, Oxford, v.1, p.178-184, 1996.
- URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; LEITAO, M. F. D.; VICENTINI, M. C. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.64, n.8, p.1226-1230, aug. 2001.
- VANDERME, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, D. B.; THERON, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite. *Nature*, London, v.65, p.1112-1113, 1965.
- VARGA, J.; RIGO, K.; TOTH, B.; TERENCE, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*, Zagreb, Croatia, v.41, n.1, p.29-36, 2003.

