

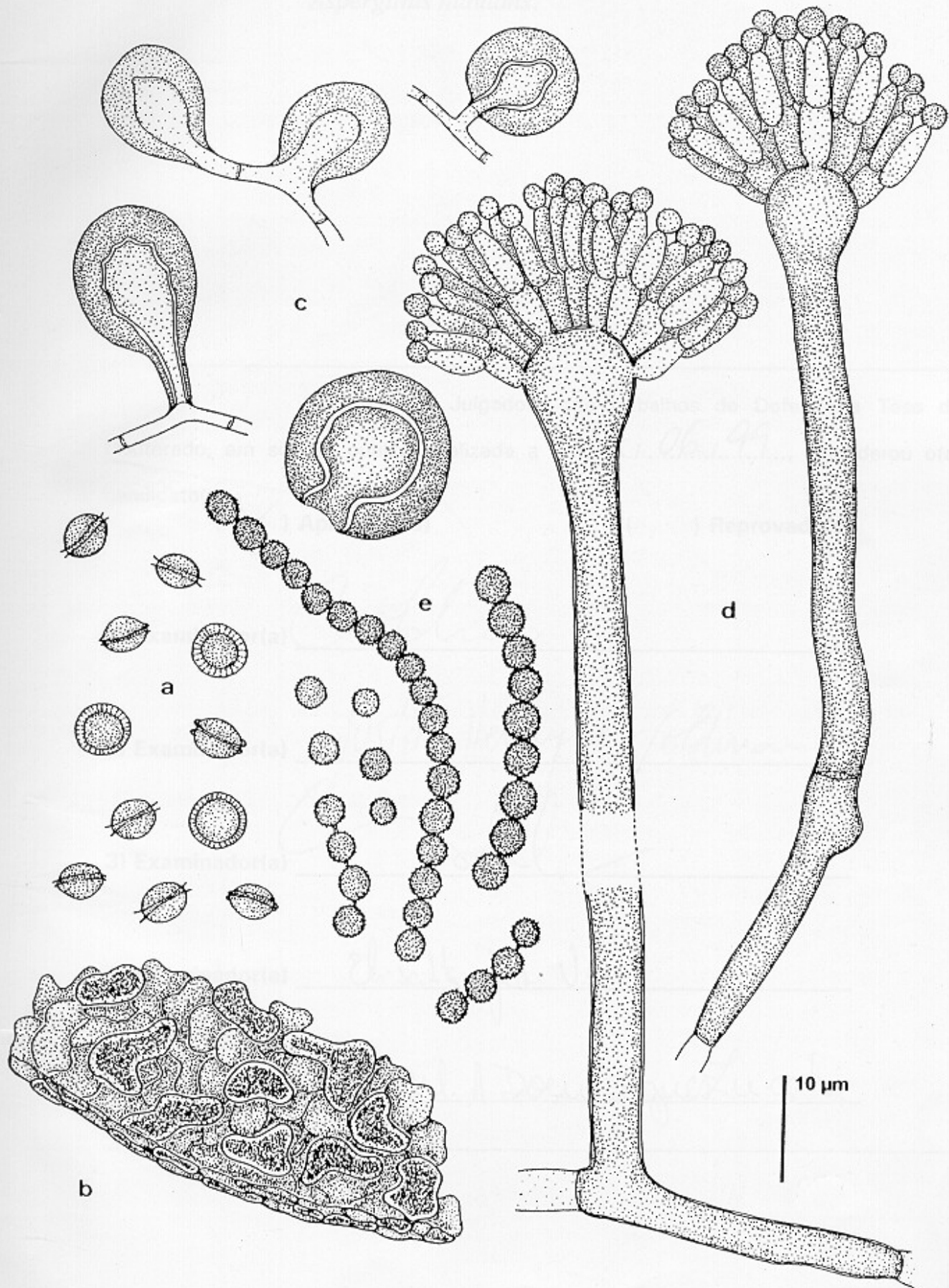


NANCI OTILIA CHACON RECHE DEZOTTI

**ESTUDO GENÉTICO DA PRODUÇÃO
DE ESTERIGMATOCISTINA EM**
Aspergillus nidulans

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

SÃO PAULO
1999



NANCI OTILIA CHACON RECHE DEZOTTI

**ESTUDO GENÉTICO DA
PRODUÇÃO DE
ESTERIGMATOCISTINA EM
*Aspergillus nidulans***

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tânia Maria Araújo Domingues Zucchi

São Paulo

1999

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Dezotti, Nanci Otilia Chacon Reche.

Estudo genético da produção de esterigmatocistina em *Aspergillus nidulans* /
Nanci Otilia Chacon Reche Dezotti.-- São Paulo, 1999.

Tese(Doutorado)—Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo. Departamento de Microbiologia.

Área de concentração: Microbiologia.

Linha de pesquisa: Micotoxinas.

Orientador: Zucchi, Tânia Maria Araújo Domingues.

Versão do título para o inglês: The genetic study of sterigmatocystin
production in *Aspergillus nidulans*.

Descritores: 1. Esterigmatocistina, Via biossintética 2. *Aspergillus nidulans* 3.
Metabolismo secundário 4. Aflatoxinas 5. Epigenética

ICB/SBIB/019/99

**“ Enquanto não estivermos comprometidos,
haverá a hesitação,
possibilidade de recuar
e a sempre ineficácia.**

**Em relação a todos os atos de iniciativa e de criação,
existe uma verdade elementar,
cuja ignorância mata inúmeros planos e idéias
esplêndidas:**

**no momento em que,
definitivamente,
nos comprometemos,**

a providência divina também se põe em movimento ...

**Todos os tipos de coisas ocorrem para nos ajudar,
que em outras circunstâncias nunca teriam ocorrido.**

Todo um fluir de acontecimentos surge a nosso favor

**como resultado da decisão,
todas as formas imprevistas de coincidências,
encontros e de ajuda material,
que nenhum homem jamais poderia ter sonhado
encontrar em seu caminho...**

**Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar,
você pode começar.**

A coragem contém em si mesma a força e a magia. “

Goethe

Dedico esta Tese

Aos meus queridos pais
Miguel e Otilia, por terem me
apoiado e me ensinado a lutar
por um ideal, sempre com Deus
no coração e esperança no amanhã.

Aos irmãos Lucimar e Miguel Antonio
amigos de verdade, pelo carinho e incentivo.

Ao meu querido Paulo
pelo apoio, paciência, compreensão,
dedicação e carinho constantes que
recebi ao longo desses anos como
prova de amor.

Ao Thiago
razão da minha vida

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^ª. Dr^ª. Tânia Maria Araújo Domingues Zucchi, mais que orientadora, uma amiga que verdadeiramente confiou em mim, valorizou-me e foi a responsável por tornar meu sonho realidade. Pesquisadora ímpar, da mais alta competência profissional, por quem tenho profunda admiração, carinho e com quem tive o privilégio de compartilhar desta conquista.

Ao Prof. Dr. Sebastião Timo Iaria por ter me apoiado desde o início e ter endossado minha decisão.

Ao Prof. Dr. Celeste Fava Neto, grande e sábio mestre, pelo exemplo de profissionalismo.

À querida amiga Adriana Palma de Almeida, por ser uma amiga sincera com quem sempre pude contar. Minha profunda e eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Parasitologia do ICB/USP, onde foram realizados todos os experimentos desta Tese e onde fui tão bem acolhida.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter e à Prof^a. Dr^a. Sirlei Daffre, do Departamento de Parasitologia do ICB/USP, com quem aprendi muito e por quem tenho profunda admiração.

Às amigas da Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia do ICB/USP, Vânia Dias Flauzino, Karen Cristina Massini, Luciana Campi e Cristiane Penha, com quem tive o privilégio de conviver todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Zucchi, do Departamento de Biologia da FFCLRP/USP, pelo incentivo e valiosas discussões.

Aos docentes que participaram da Banca de Qualificação de Mestrado, Prof. Dr. Adauto Ivo Milanez, Prof^a. Dr^a. Elisabete José Vicente e Prof. Dr. Héctor Francisco Terenzi, pelas valiosas sugestões.

Aos docentes que participaram da Banca de Qualificação de Doutorado, Prof. Dr. Aduino Ivo Milanez, Prof^a. Dr^a. Elisabete José Vicente e Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Costa Pires, pelas importantes sugestões.

Aos amigos da Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do ICB/USP, Alexandre Lourenço, Cláudia Pozzi, Reinaldo Orsi, Margareth Léa Maia da Silva, Sueli Paulo Marques, Márcia Franzolin e Carlos Alberto Pohl de Lima (*in memoriam*), com quem aprimorei meus conhecimentos micológicos.

Aos queridos amigos Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles da Universidade Federal de Pelotas, Prof. Dr. Luis Zaror da Universidade Austral do Chile, Prof^a. Dr^a. Olga Fischman da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP), Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Leite Maffei da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) e Dr. Gary Samuels do United States Department of Agriculture (Maryland/USA), pelo constante apoio e incentivo ao meu trabalho.

À Dr^a. Nancy P. Keller do Department of Plant Pathology and Microbiology da Texas A & M University, pelo fornecimento da linhagem mutante de *A. parasiticus* ATCC 90816 e pela valiosa discussão dos resultados.

Ao Dr. Robert Samson do Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), da Holanda, pelo auxílio taxonômico das linhagens de *Aspergillus* spp.

À Rosa Maria de Moraes, Gerson Amauri Calgaro e da Maria Jacinta Filha Santos, do Departamento de Parasitologia do ICB/USP, pelo auxílio técnico.

À Maria Zuleide da Silva por torcer tanto por mim.

Às secretárias do Departamento de Microbiologia do ICB/USP, Alice Mitsue Shimabuku, Naíde Rodrigues Farripas e Anamaria França Amaral.

Aos secretários do Departamento de Parasitologia do ICB/USP, Iladyr da Silva Comércio, Aparecida Félix dos Santos, Wilma Garcia de Souza e José Antonio de Camargo.

Às bibliotecárias do ICB/USP, Marily Antonelli Graeber e Carmelina de Fácio, pela trabalhosa revisão das referências bibliográficas.

À todos aqueles que tenham contribuído direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação e Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro à pesquisa.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Diagramas

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
3. REVISÃO DA LITERATURA	05
3.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS E TAXONÔMICAS DO GÊNERO <i>Aspergillus</i>	05
3.1.1. <i>Emericella nidulans</i>	07
3.1.2. <i>Aspergillus parasiticus</i>	12
3.2. PARÂMETROS ECOLÓGICOS	14
3.3. METABOLISMO SECUNDÁRIO	16
3.3.1. Regulação do Metabolismo Secundário	18
3.3.2. Policetônicos	20
3.3.3. Estrutura e Função das Sintases Policetônicas	22
3.3.4. Metabolismo Secundário X Diferenciação Fúngica	25
3.4. AFLATOXINAS : CARACTERÍSTICAS GERAIS	27
3.5. ESTERIGMATOCISTINA: CARACTERÍSTICAS GERAIS	30
3.6. VIA BIOSSINTÉTICA DA AFLATOXINA E DA ESTERIGMATOCISTINA	33
3.7. RECURSOS GENÉTICOS PARA O ESTUDO DA REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DA AFLATOXINA	36
3.7.1. Ciclo Sexual	36
3.7.2. Ciclo Parassexual	38
3.7.3. Mutantes da Via Aflatoxigênica	40
3.8. RECENTES AVANÇOS	41
3.8.1. Estratégias para Clonagem de Genes	42

3.8.2. Regulação de Expressão dos Genes da Aflatoxina	43
3.8.3. “Cluster” Gênico da Aflatoxina	45
3.8.4. “Cluster” Gênico da Esterigmatocistina	46
3.8.5. Duplicação dos Genes Aflatoxigênicos	48
3.8.6. Evolução	48
3.8.7. Implementação de Estratégias Moleculares para Controle da Aflatoxina e Esterigmatocistina	50
3.9. METILAÇÃO DO GENOMA DE EUCARIOTOS	51
4. MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1. MATERIAL	58
4.1.1. Linhagens	58
4.1.2. Meios de Cultura e Soluções	61
4.1.3. Corante	65
4.1.4. Padrões Toxigênicos	65
4.2. MÉTODOS	66
4.2.1. Manutenção das Linhagens de <i>Aspergillus</i> spp.	66
4.2.2. Microcultivo das Linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i>	66
4.2.3. Fotomicrografia dos <i>Aspergillus nidulans</i>	66
4.2.4. Avaliação da Produção de Esterigmatocistina em Linhagens Haplóides e Diplóides	67
4.2.4.1. Extração da Esterigmatocistina	67
4.2.4.2. Purificação da Esterigmatocistina	68
4.2.4.3. Cromatografia da Esterigmatocistina	68
4.2.4.4. Testes Confirmatórios para Esterigmatocistina	70
4.2.4.5. Quantificação da Esterigmatocistina	71
4.2.4.6. Detecção Rápida da Esterigmatocistina	72
4.2.5. Técnicas de Análise Genética	72
4.2.5.1. Preparo da Suspensão de Conídios	72
4.2.5.2. Obtenção do Heterocário entre Linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i>	73
4.2.5.3. Análise Meiótica do Cruzamento UT448 x UT196	74
4.2.5.4. Obtenção de Diplóides entre Linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i>	75
4.2.5.5. Análise Mitótica do Diplóide UT448//UT184	75
4.2.5.6. “Quadrado Latino” para Análise de Dois Pontos	76
4.2.6. Análise da Metilação	78
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	79

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
6.1. CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE <i>Aspergillus nidulans</i>	80
6.2. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ESTERIGMATOCISTINA	81
6.2.1. Produção de ST em Linhagens Haplóides	81
6.2.2. Produção de ST em Linhagens Diplóides	84
6.2.2.1. Diplóide UT448//UT196	85
6.2.2.2. Diplóide UT448//UT184	86
6.3. ANÁLISES GENÉTICAS	87
6.3.1. Análise Meiótica do Cruzamento UT448 x UT196	89
6.3.1.1. Quantificação da ST entre os Segregantes Meióticos com Produção Intermediária	95
6.3.1.2. Mapeamento do Gene <i>stcZ</i> ⁺	97
6.3.1.3. Relações entre o Gene <i>stcZ</i> ⁺ e o Intervalo <i>w-met</i> do Cromossomo II	99
6.3.1.4. Hipóteses da Metilação	101
6.3.1.5. Verificação da Metilação	105
6.3.2. Análise Mitótica de UT448//UT184	107
7. CONCLUSÕES	115
8. ANEXO	118
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Parâmetros ecológicos que influenciam o crescimento fúngico e a produção de toxinas.....	15
Figura 2 -	Estrutura química das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	29
Figura 3 -	Estrutura química da esterigmatocistina.....	33
Figura 4 -	Conversão da esterigmatocistina à aflatoxina.....	37
Figura 5 -	Ciclo de vida de <i>Emericella nidulans</i> . A–D fase de reprodução assexuada, haplóide, na qual as hifas somáticas se desenvolvem no substrato e produzem conidióforos com cabeças conidiais. Os conídios germinam e se desenvolvem nas hifas somáticas. E–J fase de reprodução sexuada, que envolve a formação de ascogônios e anterídios multinucleados, freqüentemente helicoidais. Eles se enrolam um no outro, os núcleos do anterídio migram para o ascogônio e permanecem aos pares sem ocorrer fusão. As hifas ascógenas dicarióticas se desenvolvem no interior do ascocarpo (cleistotécio) e dão origem aos ascos, cada um deles com 8 ascosporos binucleados. Cada ascosporo, quando livre, germina e origina hifas somáticas.....	40
Figura 6 -	Ciclo parassexual em <i>Aspergillus</i> spp.....	42
Figura 7 -	Genes e enzimas da via biossintética das aflatoxinas B ₁ e B ₂ em <i>Aspergillus parasiticus</i> e <i>A. flavus</i>	50
Figura 8 -	Mapeamento genético do cromossomo IV de <i>A. nidulans</i>	53
Figura 9 -	Comparação entre as vias biossintéticas da esterigmatocistina em <i>A. nidulans</i> e aflatoxina em <i>A. parasiticus</i>	54
Figura 10 -	Colônias de <i>Aspergillus nidulans</i> UT448 (branca), UT184 (chartreuse) e UT196 (amarela), crescidas em placa de MC a 37°C por 2 dias.....	88

Figura 11 - Fotomicrografia do microcultivo de <i>Aspergillus nidulans</i> . Presença de cabeças conidiais bisseriadas e células Hülle de paredes duplas e refringentes (aumento de 400 x).....	88
Figura 12 - Frascos contendo 40 g de meio de aveia com a linhagem UT196. Nota-se a pigmentação avermelhada na superfície do meio, logo abaixo do micélio.....	90
Figura 13 - Placa cromatográfica sob luz ultravioleta. Coluna 1: UT184; coluna 2: UT196; coluna 3: UT448; coluna 4: padrão ST [20µg/ml]; coluna 5: <i>A. parasiticus</i> ; coluna 6: padrão AFB ₁ [10µg/ml]; coluna 7: padrão qualitativo de AF.....	92
Figura 14 - Esquema do diplóide UT448//UT196.....	94
Figura 15 - Diplóide UT448//UT196, de cor verde, isolado a partir de uma placa heterocariótica.....	95
Figura 16 - Placa cromatográfica sob luz U.V.. Coluna 1: paternal UT448 ST ⁻ ; coluna 2: paternal UT196 ST ⁺ ; coluna 3: padrão ST [20µg/ml]; colunas 4 e 5: diplóide UT448//UT196 ST ⁺ . A cor vermelho-tijolo da ST mudou para amarelo-esverdeado por causa do revelador AlCl ₃	96
Figura 17 - Placa de cromatografia bidimensional do diplóide UT448//UT196 com revelador.....	96
Figura 18 - Esquema do diplóide UT448//UT184.....	97
Figura 19 - Seqüência do isolamento de segregantes mitóticos haplóides. a) placa com regiões heterocarióticas de UT448 e UT184 em MM (esquerda) e diplóide UT448//UT184 isolado em MC (direita); b) e c) diplóide UT448//UT184 com vários setores coloridos haplóides em MC; d) setores haplóides isolados do diplóide UT448//UT184 e purificados em MC.....	98
Figura 20 - Placa cromatográfica contendo “plugs” de meio de aveia com o fungo.....	100
Figura 21 - Fotomicrografia em estereomicroscópio da região heterocariótica formada pelo cruzamento entre UT448 x UT196, evidenciando cleistotécios pretos envolvidos por uma camada de células Hülle, crescidos em placa vedada de MM por 18 dias a 37°C (aumento 35 x).....	102

Figura 22 - Placa mestra contendo 25 colônias em posições definidas (padrão 5 x 5). No lado esquerdo, colônia controle UT196.....	103
Figura 23 - Placa cromatográfica de alguns segregantes meióticos. Colunas 1 à 3, 9 à 11 e 13: segregantes produtores de ST; colunas 4, 6 e 7: segregantes não produtores de ST; coluna 12: segregante com produção intermediária de ST; coluna 5: padrão de OMST [50µg/ml] Rf = 0,13; coluna 8: padrão de ST [20µg/ml] Rf = 0,7.....	104
Figura 24 - Representação esquemática dos dados contidos na Tabela 10	114
Figura 25 - Placa mestra contendo 25 colônias em posições definidas (padrão 5x5). No lado esquerdo, colônia controle UT184.....	121

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1 - Localização do gene <i>stcZ</i> em <i>Aspergillus nidulans</i>	112
Diagrama 2 - Modelo provisório de regulação do gene <i>stcZ</i> ⁺ em linhagens haplóides, baseado na hipótese da metilação do DNA.....	117
Diagrama 3 - Modelo provisório de regulação do gene <i>stcZ</i> ⁺ em linhagens diplóides, baseado na hipótese da metilação do DNA.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos metabólitos secundários.....	18
Tabela 2 - Inter-relações entre os metabolismos primário e secundário....	20
Tabela 3 - Propriedades biológicas e ocorrência de alguns policetônicos.	22
Tabela 4 - Mapas parciais das linhagens mutantes de <i>Aspergillus nidulans</i>	67
Tabela 5 - Genótipo das linhagens UT448 e UT196 relacionados com a expressão da esterigmatocistina.....	101
Tabela 6 - Listas de genótipos dos 175 segregantes meióticos do cruzamento UT448 x UT196.....	104
Tabela 7 - Análise meiótica do cruzamento UT448 x UT196. 175 colônias ascospóricas foram analisadas.....	107
Tabela 8 - Quantificação da esterigmatocistina entre os segregantes meióticos de produção intermediária.....	109
Tabela 9 - Análise meiótica do cruzamento UT448 x UT196, com destaque para a produção intermediária de esterigmatocistina (dados já apresentados na Tabela 7).....	111
Tabela 10 - Segregantes meióticos, produtores intermediários de ST, relacionados à presença dos genes <i>ribo</i> , <i>paba</i> e <i>w</i> das linhagens UT448 e UT196.....	113
Tabela 11 - Genótipos dos 25 segregantes meióticos, do cruzamento UT448 x UT196, selecionados para o tratamento com 5-azacitidina.....	118
Tabela 12 - Genótipo dos 25 segregantes meióticos pós-tratamento com 5-azacitidina.....	119

Tabela 13 - Genótipo das linhagens UT448 e UT184.....	121
Tabela 14 - Listas de genótipos dos 140 segregantes mitóticos do diplóide UT448//UT184.....	123
Tabela 15 - Análise mitótica do diplóide UT448//UT184. Número de segregantes analisados: 140.....	125
Tabela 16 - Fenótipos e genótipos definitivos das linhagens UT448, UT196 e UT184.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS

aad – aril-álcool desidrogenase

ACP – proteína carreadora de acil

AF – aflatoxina

AVF – averufina

AVN – averantina

AVNN – averufanina

CCD – cromatografia de camada delgada

CPA – ácido ciclopiazônico

DEBS – sintase 6-deoxieritronolídeo

DMST – dimetil esterigmatocistina

FAS – ácido-graxo sintase

FR – frequência de recombinação gênica

GIS – sistema de inativação gênica

HVN – hidroxiversicolorina

ICBN – Código Internacional de Nomenclatura Botânica

ICPA – Comissão Internacional sobre *Penicillium* e *Aspergillus*

IUMS – União Internacional das Sociedades Microbiológicas

LSD – ácido lisérgico dietilamida

MIP – metilação induzida premeioticamente

MNNG – N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina

MSAS – sintase ácido 6-metilsalicílico

NCU – nomes em uso corrente

NOR – ácido norsolorínico

OMST – O-metil esterigmatocistina

P.V. – pigmento vermelho

pFA – *para*-fluorofenilalanina

PKS – sintase policetônica

RIGS – “repeat-induced gene silencing”

RIP – rearranjo induzido premeioticamente

ST – esterigmatocistina

VAL – álcool versiconal

VER A – versicolorina A

VER B – versicolorina B

VHA – acetato hemiacetal versiconal

5-mC – 5-metilcitosina

RESUMO

Estudo Genético da Produção de Esterigmatocistina em *Aspergillus nidulans*

A esterigmatocistina (ST) é uma micotoxina policetônica produzida por diferentes espécies de *Aspergillus* e outros gêneros fúngicos como *Bipolaris* e *Chaetomium*. Esta toxina é caracterizada como uma bifuranoxantona com fórmula molecular $C_{18}H_{12}O_6$, freqüentemente encontrada como contaminante de diversos produtos alimentícios como sementes oleaginosas e cereais. Possui propriedades carcinogênicas, toxigênicas, mutagênicas e teratogênicas, entretanto, ela é menos tóxica do que a aflatoxina. O fungo *Emericella nidulans* (Eidam) Vuillemin, cujo anamorfo é o *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter, foi usado como modelo genético para a investigação de genes envolvidos na via biossintética da esterigmatocistina. Linhagens estoque de Utrecht (originárias de Glasgow) foram analisadas quanto à produção de ST e, entre elas, somente a linhagem UT196 [γ A2 (I); *metA17* (II); *piroA4* (IV)] apresentou produção de 4 ppm de ST (*stc*⁺), enquanto que as linhagens UT448 e UT184 mostraram-se não produtoras dessa micotoxina (*stc*). Embora a linhagem UT196 seja muito bem caracterizada geneticamente, este foi o primeiro relato da produção de ST nessa linhagem. Os índices de segregação alélica e todas as freqüências de recombinação entre os marcadores genéticos ligados e não ligados foram determinados tanto pelo cruzamento meiótico UT448 (*stc*) x UT196 (*stc*⁺) como pelo cruzamento mitótico UT448//UT184. 175 segregantes meióticos e 140 segregantes mitóticos foram analisados quanto à produção de ST, aos marcadores de auxotrofia e de resistência a acriflavina. Essas linhagens cruzadas apresentavam vários marcadores em heterozigose e isso permitiu o mapeamento de um gene estrutural da ST (*stcZ*⁺), localizado no braço esquerdo do cromossomo I, 4% distante do gene da riboflavina (*riboA1*). Como um subproduto deste trabalho, foi detectado um pigmento vermelho, de $R_f = 0,90$, em todos os segregantes meióticos e mitóticos, produtores ou não de ST, indicando tratar-se, provavelmente, de um pigmento policetônico produzido pelos ascósporos do fungo. A baixa expressão da produção de ST em 13 segregantes meióticos e a alta expressão dessa toxina nos diplóides UT448//UT196 e UT448//UT184 (40 ppm) permitiram concluir a existência de um fator regulador, compreendido na região *w-met* do cromossomo II, responsável pela expressão do gene estrutural *stcZ*⁺. A análise desses genes através do ciclo parassexual sugeriu um comportamento epigenético típico envolvendo esses genes. Com base nos dados obtidos, hipóteses para explicar o controle da expressão desses genes e suas inter-relações foram aqui apresentadas.

SUMMARY

The Genetic Study of Sterigmatocystin Production in *Aspergillus nidulans*

Sterigmatocystin (ST) is a polyketide produced by different species of *Aspergillus* as well as by other fungus genera such as *Bipolaris* and *Chaetomium*. This toxin is characterized as a bifuranoxanthone, whose molecular formula is $C_{18}H_{12}O_6$ and which is frequently found as a contaminant in several food products such as oil-seed grains and cereals. It has carcinogenic, toxigenic, mutagenic and teratogenic properties; however, it is less toxic than aflatoxin. The fungus *Emericella nidulans* (Eidam) Vuillemin, whose anamorph is *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter, was used as a genetic model to investigate the genes involved in the sterigmatocystin biosynthetic pathway. Strains from Utrecht stocks (originally from Glasgow) were analyzed in order to detect ST production and, among them, only the UT196 strain [yA2 (I); *metA17* (II); *piroA4* (IV)] showed the production of 4 ppm of ST (*stc*⁺), whereas the UT448 and UT184 strains showed to be non-producers of such toxin (*stc*). Although the UT196 strain is very well characterized genetically, this has been the first report on its production of ST. The allelic segregation rates and all the recombination frequencies between linked and non-linked genetic markers were determined by both the meiotic crossing UT448 (*stc*) x UT196 (*stc*⁺) and mitotic crossing UT448//UT184. 175 meiotic segregants and 140 mitotic segregants were analyzed as to ST production, auxotrophy markers and resistance to acriflavine. These crossed strains presented various markers in heterozygous configuration, which allowed to map a structural gene of ST (*stcZ*⁺) located on the left arm of chromosome I, 4% distant from the riboflavin gene (*riboA1*). As a byproduct of this work, a red pigment of 0.90 Rf was detected in all meiotic and mitotic segregants, whether they were ST producers or not, which indicated that was probably a polyketide produced by the fungus ascospores. The low expression of ST production in 13 meiotic segregants and the high expression of such toxin in the UT448//UT196 and UT448//UT184 diploids (40 ppm) allowed to conclude that a regulating factor existed in the *w-met* region of chromosome II, which is responsible for the expression of the structural gene *stcZ*⁺.

The analyses of those genes through the parasexual cycle suggested a typical epigenetic behavior which involved them.

Based on the data obtained, hypotheses to explain the expression control of these genes as well as their inter-relationships were here presented.

1. INTRODUÇÃO

A esterigmatocistina (ST) é um metabólito secundário de origem policetônica, que apresenta efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos em células eucarióticas, entretanto, é menos potente do que a aflatoxina (AF) (VAN DER WATT, 1974). Esta toxina é produzida por algumas espécies de *Aspergillus* e alguns gêneros fúngicos como *Bipolaris* e *Chaetomim*. Estes fungos ubiqüitários são capazes de infectar uma grande variedade de cereais e sementes oleaginosas, causando sérios danos à saúde humana e animal, além de perdas econômicas anualmente em todo o mundo.

No Brasil este problema é ainda mais sério, pois além das condições climáticas ideais para o desenvolvimento desses fungos, o sistema de armazenamento de grãos é muito deficiente.

A prevenção do crescimento de fungos toxigênicos através de cuidados nas práticas agrícolas, a constante fiscalização e a implantação de esquemas de detoxificação, são as principais estratégias geralmente empregadas no controle das micotoxinas.

Devido a grande dificuldade em se controlar efetiva e economicamente a contaminação de alimentos por micotoxinas, recentes estudos de vários laboratórios têm salientado a importância de um profundo entendimento da via biossintética dessas micotoxinas.

Espera-se que o conhecimento genético e molecular da produção de micotoxinas possa ser usado para desenvolver novos métodos de controle da biossíntese dessas toxinas.

Neste trabalho, utilizamos o *Aspergillus nidulans* como organismo eucariótico modelo no estudo genético da produção de esterigmatocistina.

O *Aspergillus nidulans* é um dos melhores modelos para se analisar a expressão e regulação de genes em eucariotos. A relativa simplicidade do seu ciclo de vida, o modo fácil de se obter esporos meióticos e mitóticos e a existência do ciclo parassexual contribuem para que este fungo seja o mais indicado em estudos de análises genéticas.

Enzimas específicas da via biossintética da AF/ST estão sendo identificadas, purificadas e seus genes clonados para serem usados como ferramentas moleculares para produção de linhagens atoxigênicas, geneticamente engenheiradas, que serão usadas como agentes biocontroladores (TRAIL *et alii*, 1995), isto é, linhagens mais competitivas que excluiriam as linhagens toxigênicas num mesmo nicho ecológico.

Estes estudos fundamentais têm mostrado que os genes responsáveis pela biossíntese de aflatoxina (AF) e esterigmatocistina (ST) encontram-se agrupados em “clusters”. Além disso, a via policetônica da AF/ST é conservada a nível funcional, regulador e físico em *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nidulans*. Estes agrupamentos contêm a maioria dos genes estruturais que codificam para enzimas da via e também para o gene regulador da via (*afIR*), nas espécies toxigênicas de *Aspergillus*. Estes achados aumentam a promessa de que métodos racionais para o controle das micotoxinas possam ser alcançados num futuro próximo (BENNETT & KELLER, 1997).

É preciso lembrar que linhagens selvagens de *A. nidulans* como a Glasgow 2, produtora de esterigmatocistina (HAJJAR *et alii*, 1989), originaram muitas linhagens mutantes que são usadas para estudos genéticos

em laboratórios do mundo todo, inclusive o nosso. Além disso, temos que nos assegurar da produção de esterigmatocistina em mutantes de *A. nidulans* que serão usados como linhagens “cloning hosts” para o estudo da biossíntese de aflatoxinas.

Desse modo, o Laboratório de Genética de Eucariotos Inferiores do ICB/USP deu início a um estudo pioneiro no Brasil, utilizando o *Aspergillus nidulans* como modelo genético para um profundo estudo dos mecanismos de produção e expressão da esterigmatocistina.

Para execução deste trabalho, utilizamos técnicas de genética clássica, como cruzamentos meiótico e mitótico, que nos permitiram mapear um gene, provavelmente estrutural, da via biossintética da ST, o gene *stcZ*. 25 genes *stc* já foram mapeados recentemente (BROWN *et alii*, 1996) e estão localizados num “cluster” único no cromossomo IV. Este é o primeiro relato de um gene, no cromossomo I, envolvido na via biossintética da ST.

A aplicação de modernas técnicas genético-moleculares tem produzido grande número de informações de como os genes são regulados em eucariotos. Isto revela uma universalidade de elementos-chave no aparato da transcrição eucariótica e realça o potencial da genética em permitir uma análise minuciosa dos componentes desses sistemas.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi estudar geneticamente os fatores que determinam e regulam a produção de esterigmatocistina em linhagens mutantes de *Aspergillus nidulans*. Para alcançar este objetivo, foram adotadas as seguintes estratégias:

- 1) Utilização do *Aspergillus nidulans* como modelo genético para o estudo da produção de esterigmatocistina, uma vez que ele oferece todas as vantagens genéticas, além de produzir essa micotoxina, que é um dos últimos intermediários da via policetônica da aflatoxina.
- 2) Caracterização das linhagens mutantes de *A. nidulans* UT448, UT196 e UT184 quanto à produção de esterigmatocistina.
- 3) Determinar as condições e os genes envolvidos na expressão da produção de esterigmatocistina.
- 4) Mapeamento de genes estruturais e/ou reguladores da expressão da esterigmatocistina.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Nesta revisão bibliográfica foi feita uma abordagem geral sobre a via biossintética da aflatoxina, visto que a esterigmatocistina é um intermediário dessa via e a aflatoxina seu produto final. Não seria possível separar uma via da outra, uma vez que tanto a ST como a AF são policetônicos de vias biossintéticas homólogas.

Os principais enfoques das vias AF/ST do ponto de vista biológico, bioquímico, molecular, evolutivo, genético, taxonômico, fisiológico e epigenético foram abordados.

3.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS E TAXONÔMICAS DO GÊNERO *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é caracterizado pela produção de um grande número de pequenos conidiosporos, secos e unicelulares originados a partir de fiálides dispostas na vesícula de um conidióforo. Os conidióforos de *Aspergillus* são frequentemente não septados, mais grossos que o micélio vegetativo e usualmente se originam de uma “célula pé” (SMITH & MOSS, 1985).

A última e mais completa classificação do gênero *Aspergillus*, incluindo seus estágios sexuais, foi feita por RAPER & FENNELL em 1965, mas esta classificação contém muitas deficiências, além de não estar de acordo

com as normas propostas pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN).

As principais falhas encontradas foram : **a)** a não prioridade do uso de nomes corretos segundo as especificações do ICBN; **b)** a não prioridade de dar nomes do estado teleomorfo, requerido pelo ICBN; **c)** falha em tipificar nomes, levando a uma incerteza quanto ao taxon correto; **d)** dividir os gêneros em "grupos", que é uma classificação subgenérica não recomendada pelo ICBN (PITT, 1994).

Depois de detectar essas falhas, um grupo moderno de taxonomistas decidiu seguir todas as cláusulas do ICBN e, com isso, começaram a modificar os nomes dos fungos para corrigir esses erros, mas isso, a princípio, gerou um pouco de confusão.

Entretanto, essas mudanças foram importantes e necessárias, pois:

a) os nomes de vários gêneros teleomorfos associados com *Aspergillus* passaram a vigorar como sendo os nomes cientificamente corretos. Então, recomendou-se usar *Eurotium* no lugar de "*Aspergillus glaucus*" ; *Neosartorya fischeri* ao invés de *A. fischeri* ; *Emericella nidulans* ao invés de *A. nidulans*, quando ascosporos estiverem presentes.

b) novos nomes de anamorfos foram dados para as espécies que já tinham sua fase teleomorfa descrita. PITT, em 1979, fez várias mudanças para *Penicillium* e SAMSON & GAMS para *Aspergillus*, em 1986.

c) PITT (1979) substituiu a designação inapropriada de "grupos" dada por RAPER & THOM (1949), por classificação de subgênero e seção para *Penicillium*. GAMS *et alii*, em 1986, fizeram a mesma coisa para *Aspergillus*.

Estas mudanças foram estritamente nomenclaturais.

Na década de 80, foi criada uma Comissão Internacional sobre *Penicillium* e *Aspergillus* (ICPA), sob o comando da Divisão das Sociedades Microbiológicas (IUMS). Esta comissão ficou encarregada de criar um

consenso sobre a sistemática destes fungos e realizou dois workshops com essa finalidade; um em 1985 (SAMSON & PITT, 1986) e outro em 1989 (SAMSON & PITT, 1990).

Um grupo de especialistas propôs que se mantivesse o nome de fungos economicamente importantes como o *Aspergillus niger* e o *A. ochraceus*, apesar de serem incorretos.

Outro grupo de especialistas propôs que fossem mantidos os nomes mais comumente aceitos, mas não necessariamente corretos. Assim, estabeleceram uma lista dos "nomes em uso corrente" (NCU) que foi sancionada pelo Congresso Botânico. Esses nomes deveriam ser muito parecidos com o nome anterior do fungo para proteger os nomes originais; isso iria aumentar a estabilidade dos nomes na Micologia e na Botânica. Então, a ICPA, numa atitude pioneira, preparou várias listas de NCU para a família *Trichocomaceae*, que inclui *Aspergillus*, *Penicillium* e os seus teleomorfos, e apresentou a proposta no Congresso Internacional de Botânica no Japão, em agosto de 1993. Esta proposta foi negada e será reapresentada no próximo Congresso que será em St. Louis em 1999. Esta lista propõe, por exemplo, a manutenção do nome *A. ochraceus* ao invés de *A. alutaceus*; o anamorfo da *Emericella nidulans* continuaria sendo *A. nidulans* ao invés do nome correto *A. nidulellus*; etc. Esta lista inclui 614 nomes de espécies distribuídos em 27 gêneros (PITT, 1994).

3.1.1. *Emericella nidulans*

Emericella nidulans (Eidam) Vuillemin

Anamorfo : *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter

Colônias deste fungo crescem mais rápido a 37°C do que a 25°C, desenvolvendo cleistotécios evanescentes cercados de células Hülle, com

abundantes conídios verdes que nascem das fiálides. Os ascosporos maduros são vermelhos e possuem uma ornamentação de dois anéis longitudinais (PITT & HOCKING, 1997).

De acordo com KOZAKIEWICZ & SMITH (1994), a *Emericella nidulans* é capaz de crescer de 6 a 48°C, com um ótimo crescimento de 35 a 37°C. Este fungo germina a 20°C com uma atividade de água (A_a) de 0,82 (SNOW, 1949), a 37°C com A_a de 0,80, a 25°C com A_a de 0,81, a 20°C com A_a de 0,83 e a 15°C com A_a de 0,90 (AYERST, 1969), por isso ela é incluída entre os fungos xerofílicos.

Embora não ocorra comumente em alimentos, a *Emericella nidulans* tem sido isolada de uma grande variedade de fontes, como cereais, incluindo o trigo (MILLS & WALLACE, 1979), farinha e pão (KURATA & ICHINOE, 1967), arroz (KUTHUBUTHEEN, 1979), milho e sorgo (MOUBASHER *et alii*, 1972) e cevada (ABDEL-KADER *et alii*, 1979).

Emericella nidulans produz além da esterigmatocistina uma outra toxina altamente tóxica, a emestrina, com uma DL_{50} de 13 mg/kg quando administrada intraperitonealmente em camundongos (TERAO *et alii*, 1988).

O fungo *Aspergillus nidulans* foi descrito pela primeira vez como *Sterigmatocystis nidulans* por EIDAM em 1883. Sua descrição incluía os estados anamorfo e teleomorfo. Suas excelentes ilustrações indicavam claramente um *Aspergillus*, e as cabeças conidiais bisseriadas colunares indicavam inequivocamente tratar-se de *A. nidulans*. WINTER em 1884 transferiu o nome *S. nidulans* para *Aspergillus*, ficando *A. nidulans* (Eidam) Winter e novamente a descrição incluía os estados anamorfo e teleomorfo. Mais tarde, VUILLEMIN (1927) descreveu, pela primeira vez, a existência de um estado ascífero em *A. nidulans*. Ele transferiu *S. nidulans* para *Emericella* Berkeley & Broome, ficando *E. nidulans* (Eidam) Vuillemin (GAMS, 1992).

De acordo com o Artigo 59.6 do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (GREUTER *et alii*, 1988), nomes introduzidos de teleomorfos e anamorfos devem ser tipificados pelo elemento teleomorfo. Por esta razão, SAMSON & GAMS (1986) mantiveram o epíteto *nidulans* para o teleomorfo, mas introduziram o novo nome *A. nidulellus* Samson & W. Gams para o anamorfo. Entretanto, *A. nidulans* permaneceu como nome de uso comum e foi incluído na lista dos nomes em uso corrente (NCU) de PITT & SAMSON (1993).

A classificação da fase teleomórfica deste fungo, segundo critérios taxonômicos de BARR (1990), é a seguinte:

Reino *Fungi*
Divisão *Eumycota*
Subdivisão *Ascomycotina*
Classe *Hymenoascomycetes*
Subclasse *Plectoascomycetidae*
Ordem *Eurotiales*
Família *Trichocomaceae*
Gênero *Emericella*
Espécie *nidulans*

De acordo com BARR (1990), pesquisadora da Universidade de Massachusetts, a classe *Hymenoascomycetes* inclui fungos cuja ascomata cleistotecióide pode apresentar crescimento indeterminado, cujos perídios são mais suaves e delgados e cujos ascos não estão dispostos em um himênio.

A ordem *Eurotiales* compreende a família *Trichocomaceae*, cujos gêneros cleistotecióides apresentam ascos dispersos irregularmente, os

ascosporos são freqüentemente achatados e os anamorfos são enteroblásticos fialídicos, formando agregações de fialídes que produzem conídios (BARR, 1990).

O fungo ascomiceto *E. nidulans* pertence à família *Trichocomaceae*, que inclui vários gêneros teleomorfos, como: *Byssochlamys*, *Chaetosartorya*, *Cristaspora*, *Dendrosphaera*, *Dichlaena*, *Dichotomomyces*, *Emericella*, *Eupenicillium*, *Eurotium*, *Fennellia*, *Hemicarpenales*, *Neosartorya*, *Penicillium*, *Petromyces*, *Sclerocleista*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Trichocoma*, e *Warcupiella*, que estão associados à alguns gêneros anamorfos, como: *Aspergillus*, *Geosmithia*, *Merimbla*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Torulomyces* (PITT & SAMSON, 1993).

De acordo com o “National Center for Biotechnology Information” (NCBI)¹ e com o “Tree of Life”², a classificação taxonômica da *Emericella nidulans* é a seguinte:

Eukaryotae
Eucarioto mitocondrial
Fungo
Ascomycota
Euascomycetes
Plectomycetes
Eurotiales
Trichocomaceae
Emericella

A fase anamórfica da *Emericella nidulans*, segundo o NCBI³, é incluída na família dos *Trichocomaceae* mitospóricos.

¹ Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/tax.html> [01/03/99].

² Disponível em: <http://phylogeny.arizona.edu/tree/eukaryotes/fungi/ascomycota/ascomycota.html> [01/03/99].

O subgênero e a seção do estado anamorfo do *Aspergillus nidulans* fazem parte da nova classificação infragenérica proposta por GAMS *et alii* (1985), que se baseia na classificação por grupos feita por RAPER & FENNELL (1965), a qual foi descrita a seguir:

Reino *Fungi*
Divisão *Eumycota*
Subdivisão *Deuteromycotina*
Classe *Hyphomycetes*
Ordem *Hyphomycetales*
Família *Moniliaceae*
Subgênero *Nidulantes*
Seção *Nidulantes*
Espécie *Aspergillus nidulans*

Quanto às suas características gerais, é um organismo eucarioto que apresenta tanto o ciclo sexual quanto o ciclo parassexual, cujas descrições detalhadas encontram-se nos itens 3.7.1. e 3.7.2., respectivamente. É um fungo filamentoso homotático, normalmente haplóide, que produz conídiosporos uninucleados pelo ciclo de vida assexual e possui também ascósporos binucleados pelo ciclo sexual (CLUTTERBUCK, 1974). Sua temperatura ideal de crescimento é de 37°C, desenvolvendo-se bem em meios de cultura definidos. *Aspergillus nidulans* apresenta um sistema genético bem definido, com 8 cromossomos (n) (KÄFER, 1958), apresentando muitos marcadores genéticos para cor de conídio, auxotrofia, resistência a drogas, etc.

HAJJAR *et alii* (1989) relataram pela primeira vez a produção de esterigmatocistina (ST) por cepas de *A. nidulans* de laboratório, geneticamente bem caracterizadas. As quatro cepas produziram ST em substratos como aveia

³ Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/tax.html> [01/03/99].

e arroz e somente uma delas produziu a toxina em meio líquido quimicamente definido.

3.1.2. *Aspergillus parasiticus*

O fungo filamentosso *Aspergillus parasiticus* foi descrito pela primeira vez por SPEARE em 1912.

De acordo com GAMS *et alii* (1986), a classificação taxonômica do *Aspergillus parasiticus* é a seguinte:

Reino Fungi
Divisão *Eumycota*
Subdivisão *Deuteromycotina*
Classe *Hyphomycetes*
Ordem *Hyphomycetales*
Família *Moniliaceae*
Subgênero *Circumdati*
Seção *Flavi*
Espécie *Aspergillus parasiticus*

Segundo GAMS *et alii* (1986), o subgênero e a seção fazem parte de uma nova classificação infragenérica, proposta por eles para o gênero *Aspergillus*, e foi baseada na classificação por grupos feita, em 1965, por RAPER & FENNELL.

Além dos fungos imperfeitos *Aspergillus flavus* Link:Fries e *Aspergillus parasiticus* Speare, KURTZMAN *et alii* (1987) verificaram que *Aspergillus nomius* também produz aflatoxina e, mais recentemente, GOTO *et alii* (1996) relataram, pela primeira vez, a produção de aflatoxinas B₁ e B₂ e ácido

ciclopiazônico (CPA) em um isolado de *Aspergillus tamarii* que possuía esclerócio.

Várias mudanças morfológicas na esporulação, produção de esclerócio e morfologia da colônia em *A.flavus* e *A.parasiticus* têm sido correlacionadas com mudanças na produção de aflatoxina; esta correlação pode ser coincidente ou refletir uma relação genética entre estes processos. Além da regulação genética da expressão do gene, uma considerável quantidade de trabalhos diz respeito ao estímulo e/ou repressão dos metabólitos secundários pela disponibilidade de fosfato, carbono e nitrogênio no meio, incluindo a influência dessas substâncias na produção da aflatoxina (MAGGON *et alii*, 1977; ABDOLLAHI & BUCHANAN, 1981; TICE & BUCHANAN, 1981; BENNETT & CHRISTENSEN, 1983).

BENNETT *et alii* (1979) não encontraram correlação entre toxigenicidade e produção de esclerócios em 10 linhagens aflatoxigênicas estudadas. Em contraste, WICKLOW & COLE (1982) relataram, pela primeira vez, a produção de aflatoxinas a partir de esclerócios de linhagens aflatoxigênicas, além de outros compostos tóxicos tremorgênicos.

TRAIL *et alii* (1995 b) reforçaram a hipótese de que o desenvolvimento do esclerócio é fortemente afetado pela produção de aflatoxina, uma vez que o metabolismo secundário é considerado uma forma de diferenciação metabólica que pode estar relacionado com diferenciação morfológica.

A natureza da interação entre a síntese de aflatoxinas e o desenvolvimento do esclerócio em *A. parasiticus* e *A. flavus* ainda permanece incerta (MAHANTI *et alii*, 1996).

3.2. PARÂMETROS ECOLÓGICOS

Muitos organismos, desde microrganismos até pequenos mamíferos, interagem com grãos em vários estágios do armazenamento, assim como vários componentes do meio ambiente como o clima e a estrutura do silo (SINHA, 1973).

Os fatores mais prováveis que afetam a formação de uma micotoxina incluem atividade de água, temperatura, tempo, danos na semente, níveis de oxigênio e dióxido de carbono, composição do substrato, abundância do fungo, prevalência de linhagens toxigênicas, resistência dos esporos, interações microbianas e vetores invertebrados (HESSELTINE, 1976). Embora a deterioração, o crescimento fúngico e a formação de micotoxina resultem de uma complexa interação desses fatores, o entendimento de cada fator envolvido é essencial à compreensão do processo como um todo e pode facilitar a predição e a prevenção do desenvolvimento da micotoxina (**Figura 1**).

É de fundamental importância a interpretação de interações multivariadas num estudo holístico (OMINSKI *et alii*, 1994).

A atividade de água (A_a) é um dos principais fatores diretamente relacionados à produção de micotoxinas. A atividade de água é um conceito físico-químico que foi introduzido para os microbiologistas em meados da década de 50 por SCOTT (1957). Ele mostrou que a A_a efetivamente quantificava a relação entre umidade dos alimentos e a habilidade de crescimento dos microrganismos nesses alimentos.

A atividade de água é definida como:

$A_a = p/p_o$, onde p é pressão parcial de vapor de água no material testado e p_o é a saturação da pressão de vapor da água pura sob as mesmas condições. A A_a é numericamente igual à umidade relativa em equilíbrio (URE) expressa como um decimal.

$$A_a(\text{alimento}) = \text{URE}(\text{ar})/100.$$

Em muitas situações práticas, a A_a é o fator ambiental dominante que governa a estabilidade do alimento ou sua deterioração (PITT & HOCKING, 1997).

Fungos ascomicetos e fungos conidiais ascomicetos compreendem a maioria dos organismos capazes de crescer abaixo de 0,9 de A_a .

Fungos capazes de crescer em baixas atividades de água, na presença de altas concentrações de soluto, estão entre os organismos mais evoluídos da Terra (PITT, 1975). O grau de tolerância às baixas atividades de água é expresso em termos de A_a mínima na qual a germinação e o crescimento podem ocorrer. Fungos capazes de crescer à baixa A_a são denominados xerofílicos. Os fungos xerofílicos são capazes de crescer numa A_a abaixo de 0,85 sob uma série de condições ambientais (PITT & HOCKING, 1997).

KOZAKIEWICZ & SMITH (1994) verificaram que a atividade de água pode afetar a germinação fúngica das seguintes maneiras: 1) A_a mínima para germinação; 2) fase lag antes da germinação e 3) velocidade de extensão do tubo germinativo. Por exemplo, a germinação pode ocorrer com baixa A_a , mas sem crescimento miceliano posterior. Com o decréscimo da A_a , a fase lag antes da germinação aumenta. A alongação do tubo germinativo ocorre mais rapidamente em A_a alta. Ainda segundo esses autores, a esporulação teleomórfica é mais sensível às baixas A_a quando comparada com a esporulação anamórfica.

3.3. METABOLISMO SECUNDÁRIO

Metabolismo secundário foi um termo introduzido por fisiologistas de plantas e foi definido em oposição ao metabolismo primário. O metabolismo primário inclui todos os processos anabólicos e catabólicos que mantêm um organismo vivo, já o metabolismo secundário é anabólico e dispensável (BENNETT, 1983).

As vias metabólicas secundárias são irregularmente distribuídas na natureza, sendo raras em animais, mas comum em plantas, fungos e bactérias.

Geralmente, os metabólitos primários são produzidos em associação com o crescimento ativo, durante a trofofase, enquanto que a produção de metabólitos secundários ocorre sempre depois que o crescimento ativo cessa, durante a idiofase (BU'LOCK, 1967).

Os metabólitos secundários de fungos constituem um grupo quimicamente diverso, mas são produzidos a partir de alguns intermediários do metabolismo primário. Conseqüentemente, eles foram separados em categorias de acordo com os precursores dos quais eles se originam (**Tabela 1**).

Antes da era dos antibióticos, relativamente poucos produtos microbianos foram descobertos como resultado das suas atividades biológicas. Uma das exceções foi o grupo dos metabólitos fúngicos chamados alcalóides do ergot; um esforço conjunto dos químicos resultou na purificação do princípio ativo do ergot, culminando no isolamento da ergotina em 1907 (BARGER & CARR, 1907).

Em contraste com o número de produtos do metabolismo secundário encontrado, o número de enzimas que têm sido caracterizadas é relativamente pequeno. Os passos enzimáticos iniciais numa via secundária são mais difíceis de serem elucidados do que os passos finais. Desse modo, as sintases policetônicas (PKSs) de um grande número de metabólitos ainda não foram

caracterizadas. Entretanto, a sua purificação está diretamente relacionada ao estudo da sistemática e aos recentes avanços na clonagem de genes da sintase policetônica (MALPARTIDA *et alii*, 1987).

Tabela 1 – Classificação dos metabólitos secundários (BENNETT, 1983).

<p>1- Metabólitos secundários derivados sem acetato (Derivados da glicose, aminoácidos aromáticos, purinas e pirimidinas) Ácido cójico em <i>Aspergillus</i> spp Difênilbenzoquinonas em basidiocarpos e líquens Ácido polipórico em <i>Polyporus</i> spp Hispidina em <i>Polyporus hispidus</i> Glicosídeos em plantas Streptomicina em actinomicetos</p>
<p>2- Metabólitos secundários derivados de acetato</p>
<p>2.1 – Metabólitos secundários derivados de ácido graxo Poliacetilenos em plantas e fungos Ciclopentanos: brefeldina A em <i>Penicillium</i>, <i>Curvularia</i> e <i>Nectria radiciola</i></p>
<p>2.2 – Policetônicos (Formados da condensação de uma unidade acetil com unidades malonil; a descarboxilação ocorre concomitantemente) Ácido 6-metilsalicílico (tetracetônico) em <i>Penicillium patulum</i> Ácido micofenólico (tetracetônico) em <i>P. stoloniferum</i> e <i>P. brevi-compactum</i> Griseofulvina (heptacetônico) em <i>P. griseofulvin</i> Ocratoxina A (pentacetônico) em <i>Aspergillus ochraceus</i> Aflatoxinas (decacetônicos) em <i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i></p>
<p>2.3 – Terpenos e Esteróides (Derivados do isopentenil pirofosfato que é formado a partir de acetato via mevalonato). Tricotecenos em <i>Fusarium</i> spp e outros fungos Giberelinas em <i>Gibberella fujikuroi</i> Ergosterol em <i>Claviceps purpurea</i> β-caroteno em plantas e fungos</p>
<p>2.4 – Metabólitos secundários derivados de ácido cítrico (Derivados da condensação de um intermediário do ciclo ácido cítrico com uma cadeia derivada do acetato, normalmente um ácido graxo). Ácido tenuazônico em <i>Alternaria</i> spp e <i>Phoma sorghina</i> Rubratoxina em <i>Penicillium rubrum</i> e <i>P. purpourogenum</i></p>
<p>2.5 – Metabólitos secundários derivados de aminoácidos (Esqueleto de carbono totalmente derivado de aminoácido com retenção de nitrogênio). Psilocina em <i>Psilocybe aztecorum</i> Ergotamina em <i>Claviceps purpurea</i> → ácido lisérgico dietilamida (LSD) Antibióticos β-lactâmicos (penicilina G e cefalosporina C)</p>

3.3.1. Regulação do Metabolismo Secundário

A formação dos metabólitos secundários está condicionada a um controle fisiológico geral que responde a fatores ambientais (VINING, 1990).

A presença de um mecanismo regulatório associado ao sistema metabólico secundário sugere que este tenha sido um processo que evoluiu e se manteve para alcançar um resultado benéfico. Como o processo se torna ativo somente quando o crescimento do microrganismo é afetado, isto parece ser benéfico ao organismo quando este não pode mais competir no seu ambiente (VINING, 1990).

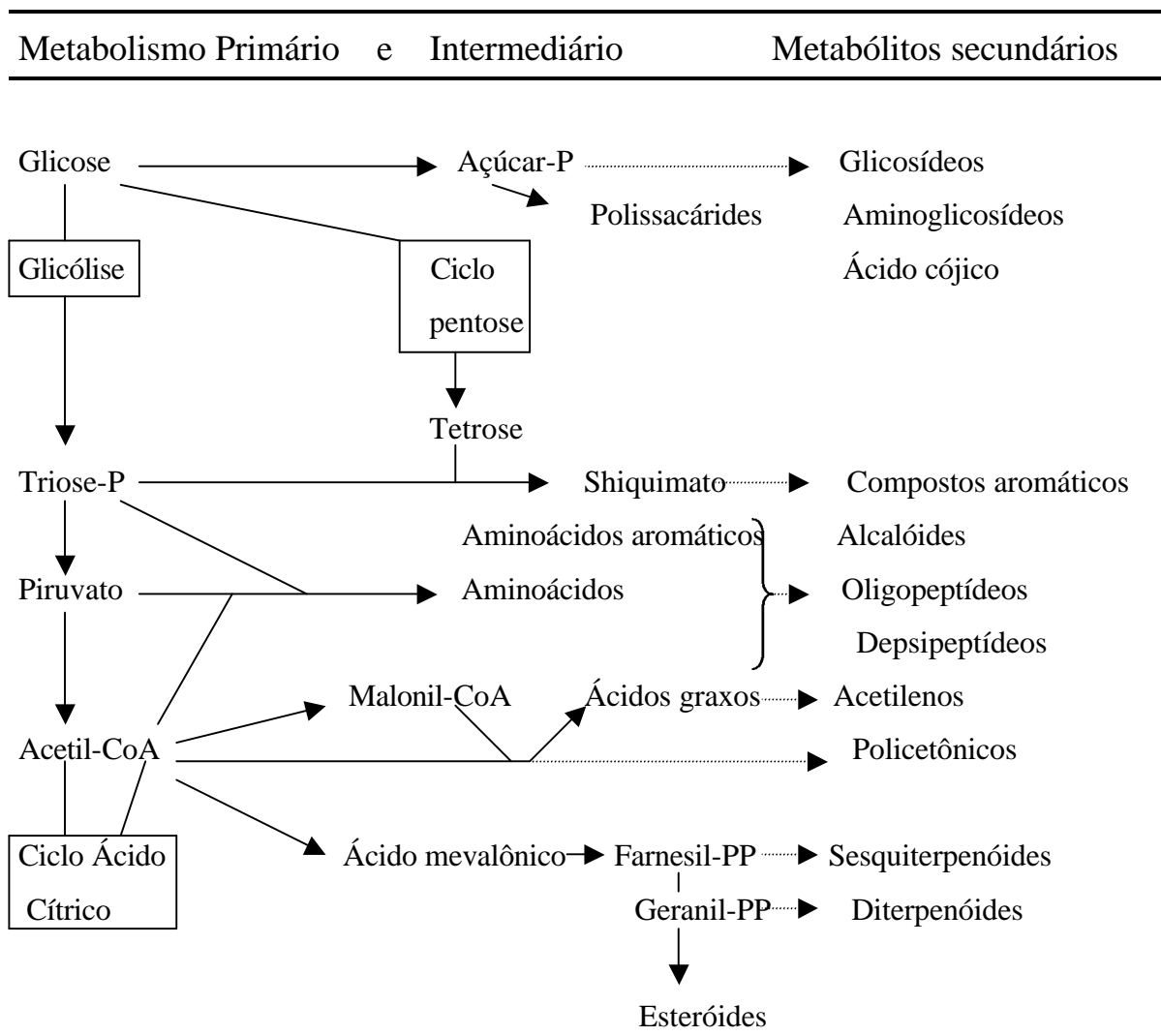
Em fungos, assim como em bacilos e estreptomicetos, a produção de metabólitos secundários coincide com a diferenciação celular; por exemplo, produção de alcalóides e formação de esterigmas e conidiosporos em *Penicillium cyclopium* (LUCKNER, 1980).

Há vários mecanismos que regulam a produção dos metabólitos secundários: primeiramente, há um controle regulatório que interliga a produção desses metabólitos com baixos níveis de crescimento e, subsequentemente, há uma regulação específica que é cepa-específica (ZÄHNER *et alii*, 1983).

Ainda segundo ZÄHNER *et alii* (1983), há também um outro fator que influencia o metabolismo secundário: a disponibilidade de metabólitos primários e intermediários servindo como precursores na biossíntese dos metabólitos secundários. Apesar da grande diversidade de estruturas químicas, todos os metabólitos secundários são derivados de simples precursores do metabolismo intermediário. Os principais pontos de ramificação que originam produtos secundários estão descritos na **Tabela 2** e são os seguintes: **acetil-coenzima A** levando aos policetônicos, poliinas, terpenóides, esteróides ou carotenóides; **shiquimato**, a partir de compostos

aromáticos pode ser derivado; **aminoácidos**, que são precursores dos peptídeos e alcalóides e **glicose** para a biossíntese de glicosídeos e aminoglicosídeos.

Tabela 2 – Inter-relações entre os metabolismos primário e secundário (ZÄHNER *et alii*, 1983).



3.3.2. Policetônicos

Policetônicos são exemplos de metabólitos secundários, assim chamados por ocorrerem esporadicamente e são provavelmente adaptáveis somente sob certas condições, diferentemente dos metabólitos primários, que fornecem os requerimentos de estrutura e energia de todas as células vivas (MANN, 1987 *apud* HOPWOOD & SHERMAN, 1990).

Nosso conhecimento sobre a ocorrência dos metabólitos secundários é inevitavelmente muito incompleta e reflete nossos interesses e necessidades. Desse modo, as micotoxinas são os mais importantes policetônicos produzidos por fungos, segundo ponto de vista antropocêntrico.

Os principais exemplos da ocorrência dos policetônicos encontram-se resumidos na **Tabela 3**.

Segundo HUTCHINSON & FUJII (1995), uma forte similaridade de mecanismos entre muitos ácidos graxos e enzimas sintases policetônicas (PKS) tem levado à dois paradigmas para explicar os policetônicos do ponto de vista bioquímico. No primeiro, os policetônicos são formados por enzimas complexas de quatro a sete proteínas monofuncionais, nas quais os grupos β -carbonil dos intermediários resultantes da condensação dos resíduos de acetato são abundantemente não reduzidos e a ciclização dos intermediários produz compostos aromáticos. Os intermediários, no segundo modelo, são formados por enzimas multifuncionais, nas quais cada produto inicial de condensação é processado através de redução; redução e desidratação; ou redução, desidratação e mais ciclos de redução para produzir compostos altamente reduzidos a partir de acetato, propionato e resíduos de butirato. A expressão dos genes que codificam cada um dos tipos de sintase policetônica, ou suas formas mutantes, tem fornecido muitas informações sobre a bioquímica e, em alguns casos, resultou na formação de novos produtos naturais.

Tabela 3 – Propriedades biológicas e ocorrência de alguns policetônicos (HOPWOOD & SHERMAN, 1990).

Organismos	Exemplos de policetônicos produzidos
EUCARIOTOS	
Angiospermas	Flavonóides (como glicosídeos) responsáveis por muitos dos aromas de alimentos e bebidas de origem vegetal e pela cor de muitas flores. Substância irritante no veneno da hera. Estilbenos e isoflavonóides como fitoalexinas (agentes antifúngicos) produzidos em resposta a uma infecção fúngica.
Fungos	Micotoxinas, incluindo aflatoxinas e ocratoxinas de <i>Aspergillus</i> spp., ergocromos de <i>Claviceps</i> , patulina de <i>Penicillium</i> . Antibióticos como griseofulvina de <i>Penicillium</i> . Melaninas derivadas de policetônicos em infecções por fungos fitopatogênicos.
Organismos marinhos	Brevetoxinas de <i>Gymnodium</i> (dinoflagelado); hidrocarbonetos poliinsaturados de algas pardas; macrolídeos de esponjas; polipropionato de moluscos.
PROCARIOTOS	
Actinomicetos	Centenas de antibióticos, incluindo: tetraciclina, antraciclinas (daunorubicina, um agente anticâncer), macrolídeos (eritromicina), poliéteres (monensina); ansamicinas (rifamicina), avermectina (um agente anti-helmíntico). Compostos farmacologicamente ativos como um macrolídeo imunossupressor FK506. Possíveis moléculas sinal (panamicina).
Mixobactérias	Diversos antibióticos
Rizóbios	Possíveis metabólitos sintetizados pelos produtos dos genes <i>nod E, F, G</i> de <i>Rhizobium leguminosarum</i> e <i>R. meliloti</i> .
Mycobacterium phlei	Ácido 6-metilsalicílico para absorção de ferro.
Outras bactérias	Outros antibióticos como ácido pseudomônico (mupirocina) de <i>Pseudomonas</i> e aurantinina de <i>Bacillus</i> .

Experimentos com isótopo marcado sugerem fortemente que os mecanismos de biossíntese dos policetônicos se enquadram em quatro tipos de reações usadas para a produção de ácidos graxos e que as unidades monoméricas são construídas em blocos a partir de dois sistemas. A diferença ocorre a partir de como esses monômeros são combinados: os policetônicos podem ser construídos por mais de um tipo de monômero com permutas

ilimitadas entre os passos de biossíntese dos ácidos graxos (HUTCHINSON & FUJII, 1995).

3.3.3. Estrutura e Função das Sintases Policetônicas

O sistema enzimático que catalisa a síntese de ácidos graxos é chamado de ácido-graxo sintase (FAS) e está envolvido na síntese dos policetônicos. A essência da biossíntese dos ácidos graxos e dos policetônicos está na condensação descarboxilativa na qual ácidos carboxílicos simples se unem para produzir uma cadeia de 6 a 50 átomos de carbono, sendo que cada unidade contribui com 2 carbonos da estrutura principal da cadeia. Ambos, FASs e PKSs necessitam que os grupos acetil e malonil, que participam da condensação, não sejam ácidos livres, mas tioésteres deles. Os ácidos livres são ativados por conexão com o tiol da porção 4'-fosfopantoteína da CoA, que atua como carreador. Dois tióis essenciais são encontrados nos sistemas FAS e PKS, um fornecido pela proteína carreadora de acil (ACP) e outro por um resíduo de cisteína ativada na enzima condensada (HOPWOOD & KHOSLA, 1992).

Um avanço fundamental no estudo da bioquímica dos ácidos graxos veio da classificação das FASs em categorias tipo I e tipo II. As enzimas do tipo I, exemplificadas por FASs de vertebrados, consistem de uma única classe de polipeptídeos com sítios carreadores para todas as atividades catalíticas e ponto de conexão com o grupo prostético ACP. As FASs do tipo II, encontradas em certas bactérias e plantas, consistem, ao contrário das primeiras, de pelo menos oito polipeptídeos monofuncionais, cada um responsável por um passo da FAS, com uma ACP separada. FASs fúngicas, embora classificadas como sendo do tipo I, apresentam funcionalidades distribuídas tanto entre os peptídeos α como β (HOPWOOD & KHOSLA, 1992).

De acordo com a convenção para sintases de ácidos graxos (FASs), há dois tipos de sintases policetônicas microbianas:

a) Sistema de enzima multifuncional tipo I

As enzimas bacterianas do tipo I consistem de proteínas gigantes multifuncionais, como a sintase 6-deoxieritronolídeo B (DEBS), que catalisa a formação da porção macrolactona da eritromicina A, um importante antibiótico de uso médico produzido por *Saccharopolyspora erythraea* (CORTES *et alii*, 1990; DONADIO *et alii*, 1991).

Dados de sequenciamento de genes mostram estrutura análoga entre PKSs do tipo I que catalisam um grupo de **a)** antibióticos macrolídeos, como avermectinas (MACNEIL *et alii*, 1994) e rapamicina, cujas estruturas assemelham-se àquelas dos macrolídeos e **b)** antibiótico poliéter, como a tetronasina (LINTON *et alii*, 1994), embora o arranjo dos módulos e atividades enzimáticas possam ser diferentes em PKSs individuais do tipo I (MACNEIL *et alii*, 1994).

b) Sistemas multienzimáticos tipo II

PKSs compostos de várias proteínas monofuncionais separadas são chamadas de sistema tipo II. Estudos genéticos da biossíntese de actinorodina (act) em *Streptomyces coelicolor* (MALPARTIDA & HOPWOOD, 1984) e tetracenomicina (tcm) em *Streptomyces glaucescens* (MOTAMEDI & HUTCHINSON, 1987) levaram ao isolamento dos primeiros genes que codificam PKSs do tipo II e à descoberta de muitas hibridizações cruzadas entre alguns dos genes em diferentes actinomicetos (MALPARTIDA *et alii*, 1987).

Os mecanismos das enzimas PKS do tipo II são completamente diferentes daqueles da classe tipo I, pois estas enzimas complexas catalisam a formação de compostos aromáticos cíclicos que não requerem amplos ciclos de redução e desidratação. Conseqüentemente, os principais desafios enfrentados

pelos PKSs do tipo II são determinar quantas vezes ocorrerá a extensão da cadeia, como orientar os intermediários poli- β -cetônicos na direção correta para a ciclização e como selecionar quais grupos carbonil e metileno que formarão o sexto anel no final dos compostos cíclicos (HUTCHINSON & FUJII, 1995).

A primeira PKS do tipo I em fungo foi descoberta por DIMROTH *et alii* em 1971. Eles purificaram uma sintase ácido 6-metilsalicílico (MSAS) de *Penicillium patulum*. Mais recentemente, SPENCER & JORDAN (1992) mostraram que esta proteína tem 750kDa e contém todas as 11 atividades catalíticas necessárias para a síntese do ácido 6-metilsalicílico a partir do acetil- e malonil-CoA.

Técnicas de sequenciamento de genes e inativação recombinacional (“gene disruption”) têm provado que a enzima policetônico sintase (PKS) do tipo I, que possui subunidades um pouco maiores do que aquelas da enzima ácido 6-metilsalicílico sintase (MSAS), está envolvida nas sínteses de esterigmatocistina em *Aspergillus nidulans* e de aflatoxina em *Aspergillus parasiticus*. Os clusters de ST e AF contêm também dois genes ácido-graxo sintases (FAS) que podem codificar as subunidades da enzima responsável pela reunião do iniciador hexanoil-CoA para a síntese do ácido 10-deoxinorsolorínico, o primeiro intermediário da biossíntese de ST e AF (DUTTON, 1988).

Aspergillus nidulans também possui um gene no locus *wA* que codifica uma proteína PKS do tipo I, de 216.633 Daltons, que governa a síntese de um pigmento amarelo do conidiospóro (MAYORGA & TIMBERLAKE, 1992). Embora não se conheça a estrutura do último policetônico, o pigmento do ascospóro de *A. nidulans* é uma antraquinona dimérica hidroxilada, a ascoquinona A (BROWN & SALVO, 1994) e em *A. parasiticus* ocorre um

pigmento no conídio que é uma hidroximetilnaftopiranona, chamada parasperona A (BROWN *et alii*, 1993).

3.3.4. Metabolismo Secundário X Diferenciação Fúngica

Em 1995a, TRAIL *et alii* sugeriram a possibilidade de que alguns genes envolvidos na síntese de AF poderiam estar relacionados à diferenciação fúngica, pois mutações nesses genes também afetavam a morfologia do esclerócio e a síntese dos pigmentos do esporo. Estas observações estão de acordo com estudos feitos com *Streptomyces*, onde foi estabelecida uma associação entre o início do metabolismo secundário e a esporulação (HOPWOOD, 1988; BIBB, 1996).

A existência de mutantes deficientes em ambos processos indica elementos comuns no controle genético (CHAMPNES & CHATER, 1994). Em *Streptomyces griseus* foi identificado um fator auto-regulador (fator-A) que interliga o metabolismo secundário e a diferenciação celular. Mutantes de *S. griseus* deficientes no fator-A perdem simultaneamente a habilidade de produzirem metabólitos secundários e de formarem esporos (HARA & BEPPU, 1982). O fator-A se liga à proteínas específicas, levando à desrepressão dos genes importantes para o metabolismo secundário e a esporulação (MIYAKE *et alii*, 1990).

GUZMÁN-DE-PEÑA *et alii* (1998) utilizaram a linhagem de *Emericella nidulans* FGSC4 (*veA*⁺) para determinar o efeito da iluminação na biossíntese de esterigmatocistina. Eles verificaram que o micélio crescido no escuro apresentou morfologia “fluffy” e com pouca quantidade de ST. Este mesmo micélio, quando crescido na presença de luz, apresentou abundantes esporos verdes e uma quantidade de ST seis vezes maior. Dessa forma,

puderam concluir que a luz afetou tanto a esporulação assexual como a biossíntese da ST.

Estes mesmos pesquisadores mexicanos também utilizaram, no mesmo trabalho, uma linhagem mutante *brlA1* de *E. nidulans* para estudar a relação entre a esporulação e a produção de ST. Essa mutação bloqueia a expressão de vários genes que são especificamente ativados durante a esporulação assexual, enquanto a esporulação sexual não é afetada. O mutante *brlA1* produziu abundantes cleistotécios e altas quantidades de ST, sugerindo que o passo comum na conidiação e na biossíntese de ST opera acima do ponto de execução da mutação *brlA* (localizada no cromossomo VIII).

Na verdade, os mecanismos que controlam a ativação do gene *afIR* (regulador da produção de ST/AF) associados à esporulação não foram elucidados até o momento.

Os dois principais genes relacionados com a pigmentação de conídios são *wA* e *yA* (ADAMS *et alii*, 1998). O gene *wA* codifica uma sintase policetônica; mutações nesse gene resultam em linhagens brancas deficientes em melanina e α -1,3-glucana (MAYORGA & TIMBERLAKE, 1990 e 1992). *yA* codifica uma *p*-difenoloxidase conhecida como **lacase**; mutantes *yA* possuem conídios amarelos (LAW & TIMBERLAKE, 1980; YELTON *et alii*, 1985; ARAMAYO & TIMBERLAKE, 1990).

O fato de que mutações no gene *wA* são epistáticas para o gene *yA* e que a lacase conidial se acumula nas paredes dos mutantes *wA*, faz supor que *wA* catalisa a síntese de um pigmento amarelo policetônico, que é convertido à forma verde, pelo produto do gene *yA* (MAYORGA & TIMBERLAKE, 1990).

BROWN *et alii* (1993) isolaram e caracterizaram um pigmento octacetônico de uma linhagem de *A. parasiticus* deficiente em lacase.

3.4. AFLATOXINAS : CARACTERÍSTICAS GERAIS

Os metabólitos chamados de aflatoxinas foram primeiramente detectados em torta de amendoim produzida no Brasil, contaminada com *Aspergillus flavus*. Usada como ração de aves, matou milhares de peruzinhos na Inglaterra em 1960 (LANCASTER *et alii*, 1961). Este incidente foi um marco importante para o incremento do estudo das micotoxinas. Desde então, foram intensos os esforços para se definir e detectar essas toxinas, bem como se compreender a biologia do fungo causador.

As aflatoxinas são metabólitos secundários, altamente tóxicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* que têm ampla distribuição na natureza, contaminando um grande número de produtos alimentícios, podendo-se citar, entre outros, as sementes oleaginosas, os cereais, as raízes e os tubérculos (SABINO, 1980).

São conhecidas 17 substâncias do grupo das aflatoxinas. As mais comumente encontradas nos alimentos são as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. As quatro toxinas são diferenciadas com base na fluorescência que emitem sob luz ultra-violeta, ou seja, as aflatoxinas B emitem fluorescência azul ("blue") e as aflatoxinas G verde ("green"). Vacas alimentadas com rações contendo aflatoxinas B₁ e B₂ excretam metabólitos no leite chamados de aflatoxinas M₁ e M₂, respectivamente (WORLD Health Organization, 1979).

As aflatoxinas são bastante solúveis em solventes moderadamente polares como clorofórmio, metanol e especialmente em dimetilsulfóxido, e pouco solúveis em água. Quando secas, são estáveis a temperaturas elevadas, sendo o ponto de fusão em 269°C e, quando dissolvidas em solventes polares, são relativamente sensíveis à luz, particularmente à radiação ultra -violeta; são

desativadas por autoclavação em presença de amônia e por tratamento com hipoclorito de sódio (WORLD Health Organization, 1979).

As estruturas químicas das quatro aflatoxinas constam na **Figura 2**.

As aflatoxinas têm várias formas estruturais. Em geral, *A. flavus* produz aflatoxina B₁ (AFB₁) e aflatoxina B₂ (AFB₂), enquanto que *A. parasiticus*, além destas duas toxinas, também produz aflatoxina G₁ (AFG₁) e aflatoxina G₂ (AFG₂). A aflatoxina B₁ é a mais tóxica e a forma mais comum que ocorre em gêneros alimentícios contaminados e é a que recebe maior atenção nos estudos sobre o seu modo de ação. A aflatoxina B₁ é ativada metabolicamente a uma forma tóxica específica ao fígado pela citocromo P-450 monooxigenase, em mamíferos (GUENGERICH, 1988).

A forma ativada da AFB₁ induz a expressão de vírus e a formação de tumor associado com oncogenes *ras* (RASCATI & McNEELY, 1983; McMAHON *et alii*, 1986). Estudos sobre os mecanismos da carcinogênese química têm evidenciado uma interação química da AF com o DNA; a AFB₁ liga-se ao DNA e às proteínas do cromossomo (MARTIN & GARNER, 1977; GROOPMAN *et alii*, 1980). Ligações extras de DNA são formadas quando a AFB₁ se liga a resíduos de guanina de seqüências alternadas de G-C do DNA (BONNETT & TAYLOR, 1989 ; YU *et alii*, 1990). Isto pode levar a mutações com alteração de estrutura causadas pela interação da AFB₁ ativada, podendo gerar transversões G:C para T:A. O efeito mais direto da exposição à AFB₁ é uma inibição da síntese de RNA (YU *et alii*, 1988; YU *et alii*, 1990).

De acordo com a legislação brasileira sobre micotoxinas, são aceitos atualmente dois limites máximos de aflatoxinas em alimentos para consumo humano: o Ministério da Saúde aceita tolerância máxima de aflatoxinas B₁ e

G₁ de 30 ppb e o Ministério da Agricultura 20 ppb para a soma das quatro aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂)⁴.

A aflatoxina B₁ é certamente a mais estudada micotoxina hepatotóxica. A suscetibilidade dos animais à AFB₁ varia, mas em todos os casos a causa primária da doença e morte resulta de danos ao fígado. Tanto os surtos de aflatoxicose em animais de campo como a administração da toxina em animais de laboratório demonstram que o fígado é o órgão-alvo da toxina (SMITH & MOSS, 1985).

Entre os principais efeitos biológicos das aflatoxinas em pequenos animais e em aves, principalmente, estão as lesões hepáticas agudas e crônicas, diminuição da velocidade de crescimento, danos aos mecanismos de defesa imunológicos e efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (BUSBY & WOGAN, 1979; PIER, 1981).

O desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de aflatoxinas são dependentes de diversos fatores como temperatura, umidade, substrato, pH, pressão osmótica, linhagem do microrganismo toxigênico e a ocorrência de competição com outros microrganismos (JOINT FAO, 1977). Entre esses fatores, tem se observado que a temperatura ambiente, o tipo de substrato e o conteúdo de umidade desse substrato são os mais importantes (WORLD Health Organization, 1979).

A contaminação de alimentos como o amendoim e o milho é bastante complexa e a infecção destes produtos ocorre ainda no campo, antes da colheita e/ou durante a secagem dos grãos. A infecção com essas duas espécies de *Aspergillus* e a produção de aflatoxinas no campo estão especialmente associadas ao stress causado pela seca e aos danos que os insetos causam na planta, mas mesmo plantas saudáveis podem ser infectadas se os esporos fúngicos se fixarem ao estigma das flores em desenvolvimento. Os esporos podem

⁴ Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br/legisla.html> [01/03/99].

germinar e penetrar nos tecidos da semente sem causar danos aparentes. Os grãos de amendoim e milho podem, então, conter aflatoxina, embora sua aparência seja saudável. Todavia, os mais altos níveis de aflatoxinas são formados em grãos que estejam visivelmente danificados e que tenham sido armazenados em condições inadequadas (SMITH & MOSS, 1985).

NORTHOLT *et alii* (1976) estudaram os efeitos da atividade de água e da temperatura no crescimento e produção de aflatoxina de *A. parasiticus* chegando a conclusão de que nenhuma quantidade detectável de aflatoxina B₁ foi produzida com atividade de água menor que 0,83 e temperaturas abaixo de 10°C.

As condições climáticas do nosso país, aliadas às técnicas de colheita e ao armazenamento inadequados são fatores favoráveis ao desenvolvimento de fungos toxigênicos e conseqüente contaminação de alimentos com aflatoxinas. Apesar disso, no Brasil, são poucas as medidas para se evitar essa contaminação e poucos são os trabalhos referentes à ocorrência desta micotoxina nos alimentos (ALMEIDA, 1989).

Torna-se, portanto, necessário o estabelecimento de medidas que evitem a proliferação dos fungos produtores de aflatoxinas nos produtos agrícolas armazenados, uma vez que é praticamente inevitável a contaminação natural no campo.

3.5. ESTERIGMATOCISTINA: CARACTERÍSTICAS GERAIS

A esterigmatocistina (ST) é um metabólito secundário biologicamente ativo, toxigênico, carcinogênico, mutagênico e teratogênico produzido por várias espécies de *Aspergillus* spp, incluindo *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. chevalieri* e algumas espécies de *Bipolaris* e *Chaetomium* (MOSS, 1991).

HOLZAPFEL *et alii* (1966) foram os primeiros a detectarem produção de esterigmatocistina em linhagens de *Aspergillus nidulans*.

A esterigmatocistina é um intermediário na biossíntese de aflatoxinas e é muito semelhante a aflatoxina em sua estrutura química e atividade biológica (**Figura 3**). Ela está quimicamente relacionada às aflatoxinas por conter um grupo bishidrofurano condensado ligado à porção xantona (SCOTT, 1994). Entretanto, ela não é tão tóxica quando comparada à aflatoxina B₁ (AFB₁).

Embora, a ST seja primariamente um agente hepatotóxico, sua hepatotoxicidade e potencial tumoral são consideravelmente menores quando comparados à aflatoxina B₁. O valor da DL₅₀ desta toxina para ratos machos é de 166 mg/Kg, enquanto que sua atividade hepatocarcinogênica é de, aproximadamente, um décimo da aflatoxina B₁ (VAN DER WATT, 1974). Do mesmo modo que para AF, os camundongos são menos suscetíveis à esterigmatocistina do que os ratos, uma vez que não foi observada toxicidade em camundongos mesmo depois da administração de uma dose de 800 mg/Kg (LILLEHOJ & CIEGLER, 1968).

Vários testes de mutagenicidade “in vitro” sugerem que a ST, assim como a AFB₁, é um agente mutagênico que se liga covalentemente ao DNA num nível de 20 a 30% daquele observado com AFB₁ (PURCHASE & VAN DER WATT, 1970).

Sua ocorrência em cereais, principalmente em arroz, foi descrita por JOSEFSSON & MÖLLER (1977) e MANABE *et alii* (1973).

A extração da esterigmatocistina é usualmente feita com acetonitrila e cloreto de potássio aquoso, embora o cloreto de potássio metanólico aquoso também seja usado para cereais (STACK & RODRICKS, 1971). Esta micotoxina apresenta boa solubilidade para a maioria dos solventes orgânicos, mas é rapidamente solúvel em clorofórmio e insolúvel em água (SCOTT, 1994).

A partição com hexano é comumente empregada mas, mais recentemente, o uso do Florisil com carbonato de cobre e poliamida tem sido relatado por FRANCIS *et alii* (1985).

A detecção e quantificação da ST, normalmente, são feitas por cromatografia em camada delgada (CCD) ou CCD bi-dimensional (VAN EGMOND *et alii*, 1980) ou, ainda, por CCD de alta resolução (LEE *et alii*, 1980).

A esterigmatocistina possui fluorescência vermelho-tijolo sob luz U.V. de 365 nm em CCD, mas a visualização é aumentada quando a placa é borrifada com vapores de cloreto de alumínio e aquecida, resultando num “spot” de fluorescência amarela, com limite de detecção de 10 ng (GIMENO, 1979). A reação da ST com o cloreto de alumínio tem uma importante aplicação analítica ao produzir uma fluorescência amarela na CCD devido à formação de 1,3,8-trihidroxixantona (DAVIES *et alii*, 1960) e também por intensificar a fluorescência da coluna na cromatografia líquida de fase-reversa (NEELY & EMERSON, 1990).

Segundo SCOTT (1980) o limite de detecção visual da ST em placas de sílica gel sob luz U.V. de comprimento de onda longo é de 40 ng com uma fluorescência vermelho-tijolo. Quando se utiliza o revelador AlCl_3 o limite de detecção atinge até 5 ng, resultando numa fluorescência amarela intensa.

O método mais conveniente de confirmação da ST pela derivação química “*in situ*”, utiliza o ácido trifluoracético (VAN EGMOND *et alii*, 1980).

A irradiação gama requer uma dose de 50 Mrad para destruição da ST no estado seco (KUME *et alii*, 1983).

3.6. VIA BIOSSINTÉTICA DA AFLATOXINA E DA ESTERIGMATOCISTINA

Uma área de progresso na pesquisa de aflatoxinas tem sido a determinação cuidadosa dos passos intermediários da sua via biossintética.

O passo inicial da cadeia policetônica da aflatoxina talvez envolva a polimerização do acetato e nove unidades de malonato (com perda de CO_2) pela enzima policetônico-sintase (PKS), de maneira análoga à biossíntese de ácidos graxos (DUTTON, 1988). Outra hipótese, talvez mais plausível, envolve a síntese da unidade iniciadora 6-carbono hexanoato pela enzima ácido-graxo sintase (FAS), que é, então, ampliada pela PKS gerando um 20-carbono decacetônico, a norantrona (TOWNSEND *et alii*, 1991). Esta é, então, oxidada em ácido norsolorínico antraquinona (NOR) por uma hipotética oxidase. O resto da via segue na ordem esquematizada segundo BHATNAGAR *et alii* (1995) : ácido norsolorínico (NOR) \Rightarrow averantina (AVN) \Rightarrow averufanina (AVNN) \Rightarrow averufina (AVF) \Rightarrow hidroxiversicolorina (HVN) \Rightarrow acetato hemiacetal versiconal (VHA) \Rightarrow álcool versiconal (VAL) \Rightarrow versicolorina B (VER B) \Rightarrow versicolorina A (VER A) \Rightarrow dimetil esterigmatocistina (DMST) \Rightarrow esterigmatocistina (ST) \Rightarrow O-metil esterigmatocistina (OMST) \Rightarrow aflatoxina B₁ (AFB₁).

Existem, claramente, quatro principais produtos policetônicos na via biossintética da aflatoxina (LILLEHOJ, 1991) :

1) antraquinonas hidroxiladas

- ácido norsolorínico (NOR) $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_7$ (p.m. = 370)
- averantina (AVN) $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$ (p.m. = 372)
- averufanina (AVNN) (p.m. = 370)
- averufina (AVF) $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_7$ (p.m. = 368)

2) bifuranoantraquinonas

- hidroxiversicolorina (HVN)
- acetato hemiacetal versiconal (VHA) $C_{20}H_{16}O_9$ (p.m. = 400)
- álcool versiconal (VAL)
- versicolorina B (VER B)
- versicolorina A (VER A) $C_{18}H_{10}O_7$ (p.m. = 338)

3) bifuranoxantonas

- esterigmatocistina (ST) $C_{18}H_{12}O_6$ (p.m. = 324)
- O-metil-esterigmatocistina (OMST) $C_{19}H_{14}O_6$ (p.m. = 338)

4) bifuranocumarina

- aflatoxinas (AF) $C_{17}H_{12}O_6$ (p.m. = 312)

Os pesos moleculares (p.m.) de alguns intermediários da via foram descritos por BENNETT *et alii* (1980 b).

A esterigmatocistina e a O-metil esterigmatocistina são xantonas caracterizadas por uma metade de bishidrofurano; já as aflatoxinas são decacetônicos caracterizados por um anel cumarínico em sua estrutura (STEYN *et alii*, 1980) (**Figura 4**).

Estima-se que sejam necessários pelo menos 17 passos na catalização de enzimas para que a biossíntese de aflatoxina se complete a partir do NOR (BHATNAGAR *et alii*, 1992).

A versicolorina A (VER A) é importante porque ela é a primeira molécula na via da aflatoxina B₁ que contém uma dupla ligação na posição 2,3 da porção difurano. Esta dupla ligação é o alvo para as enzimas microsossomais do citocromo P-450, que gera uma alta reação epóxido, resultando na ativação e formação de um aduto com DNA e proteínas (DVORACKOVA, 1990). Já a aflatoxina B₂ (AFB₂) não possui esta dupla ligação, por isso ela é centenas de vezes menos carcinogênica do que a B₁ (TRAIL *et alii*, 1995a).

Várias enzimas envolvidas na via aflatoxigênica já foram purificadas. Duas O-metil transferases estão envolvidas na conversão de ST a O-metil esterigmatocistina (BHATNAGAR *et alii*, 1988; KELLER *et alii*, 1992a), uma ácido-norsolorínico redutase está envolvida na conversão reversível de ácido norsolorínico a averantina (AVN) (BHATNAGAR & CLEVELAND, 1990; CHUTURGOON & DUTTON, 1991), uma ciclase está envolvida na conversão de versiconal a versicolorina B (LIN & ANDERSON, 1992; TOWNSEND *et alii*, 1991) e duas versiconal-hemiacetal-acetato redutases (VHA redutases I e II; provavelmente isoenzimas) que catalisam a reação do versiconal hemiacetal acetato a versiconal acetato (MATSUSHIMA *et alii*, 1994). Estas enzimas purificadas são importantes ferramentas para a clonagem de genes.

Ao contrário dos outros policetônicos descritos até o momento (os quais requerem somente uma policetônico-sintase para gerarem um produto policetônico), a biossíntese de esterigmatocistina e de aflatoxina é iniciada pela produção de uma única ácido-graxo sintase (FAS) codificada por dois genes do “cluster”, *fas-1A* e *fas-2A* (MAHANTY *et alii*, 1996; WATANABE *et alii*, 1996; WOLOSHUK & PRIETO, 1998).

Devido ao interesse considerável em sintases policetônicas geneticamente engenheiradas para síntese de novos produtos com novas propriedades biológicas, o entendimento deste mecanismo de iniciação ácido-graxo pode fornecer recursos adicionais de alteração da diversidade policetônica (BENNETT & KELLER, 1997).

3.7. RECURSOS GENÉTICOS PARA O ESTUDO DA REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DA AFLATOXINA

Os genes envolvidos na via da aflatoxina podem ser isolados de outras espécies fúngicas que não *A. flavus* e *A. parasiticus*. A produção de intermediários nos passos da via, em alguns fungos, indica que deve haver uma conservação genética dos passos. Um desses outros fungos pode, em última análise, fornecer um sistema modelo mais conveniente do que *A. flavus* e *A. parasiticus*, procurando-se alcançar um maior detalhamento dos passos da via biossintética da aflatoxina. Por exemplo, o *A. nidulans* é um baixo produtor de penicilina, no entanto, é usado como modelo para se estudar a via biossintética da penicilina por ter um sistema de transferência de DNA e uma genética formal já bem estabelecidos (MACCABE *et alii*, 1990).

Similarmente, *A. nidulans* produz esterigmatocistina, o penúltimo intermediário na biossintese da aflatoxina, e pode ser útil no estudo da genética molecular dessa via biossintética.

FENG & LEONARD (1995) consideram muito mais fácil e rápido estudar a via biossintética da aflatoxina em *Aspergillus nidulans*, porque o conhecimento da genética e biologia molecular desta espécie é muito mais avançado do que em *A. parasiticus*.

3.7.1. Ciclo Sexual

Os estudos sobre o ciclo sexual em *Aspergillus* spp. começaram no início do século XX por VUILLEMIN em 1927.

O *A. nidulans*, por ser um fungo homotálico, possui regiões diferenciadas em seu micélio chamadas hifas ascógenas (Figura 5). Nestas

hifas ocorrem fusões nucleares originando núcleos diplóides ($2n$) com 16 cromossomos. Estes núcleos sofrem meiose, resultando em 4 núcleos haplóides (n) que, com posterior divisão mitótica, vão dar origem a 8 células haplóides (n) que são os esporos sexuais ou ascosporos binucleados, localizados no interior dos ascos. Os ascos ficam contidos em corpos de frutificação chamados cleistotécios (*in AZEVEDO*, 1987). Normalmente, um único cleistotécio pode conter acima de meio milhão de ascosporos (COVE, 1977), permitindo uma análise detalhada dos eventos meióticos (BENNETT, 1985).

O ciclo sexual completo com divisão reducional (R!) ocorre a partir de um único talo, não havendo necessidade de diferentes tipos de reação sexual (“mating types”). Mesmo sendo homotálico, são possíveis cruzamentos entre linhagens de *A. nidulans*, cujas mutações se complementem, havendo, assim, anastomose das hifas e formação de heterocários. Nesse caso, núcleos diferentes coexistem em um citoplasma comum onde, raramente, ocorre a fusão nuclear entre núcleos geneticamente diferentes, resultando em cleistotécios híbridos. A análise ao acaso dos produtos meióticos (n) confinados nos cleistotécios híbridos permite a identificação de genes mutantes e seu mapeamento genético ao longo dos 8 grupos de ligação do *A. nidulans* (*in AZEVEDO*, 1987).

A maioria das linhagens mutantes de *A. nidulans* usadas em experimentos genéticos é derivada de um único isolado selvagem denominado A69 (NRRL 194) (CROFT & JINKS, 1977). O grupo de PONTECORVO, em Glasgow, isolou vários mutantes a partir dessa linhagem selvagem e esses mutantes são usados, hoje em dia, nos principais laboratórios de genética no mundo todo.

3.7.2. Ciclo Parassexual

Estudos de genética clássica de fungos anamórficos têm sido feitos através do ciclo parassexual, permitindo a obtenção de recombinantes mitóticos (sem meiose).

O ciclo parassexual foi primeiramente descrito no gênero *Aspergillus* por PONTECORVO *et alii* (1953a) e, desde então, tem sido usado para estudos de vários fungos. Este ciclo consiste de anastomoses de hifas entre duas linhagens diferentes formando o micélio heterocariótico; fusão somática rara de núcleos diferentes para formação do diplóide; crossing-over mitótico e aneuploidias sucessivas ($2n-1$) levando, por fim, à haploidização (**Figura 6**). A frequência de haploidização pode ser aumentada com o uso de vários agentes haploidizantes como benlate e *para*-fluorofenilalanina (BENNETT, 1985).

A fusão entre núcleos de diferentes constituições genotípicas é a fase mais importante deste ciclo, uma vez que isso confere algumas das vantagens da sexualidade. Como a haploidização independe do crossing-over, genes não ligados segregarão independentemente e genes ligados somente em raras ocasiões o farão (como função da distância do mapa e frequência de recombinação). Durante a haploidização cromossomos inteiros segregam juntos. Isto torna a haploidização uma poderosa ferramenta para mapeamento de genes nos grupos de ligação (CLUTTERBUCK, 1992).

A parassexualidade juntamente com a ocorrência natural de mutações é de grande importância para a evolução das espécies fúngicas imperfeitas (BRADLEY, 1962; ROPER, 1966).

A fusão de protoplastos é uma técnica que ultrapassa certas barreiras entre linhagens e espécies incompatíveis, em cruzamentos parassexuais tradicionais, e pode ampliar o uso da análise parassexual. Dois pesquisadores

KEVEI & PEBERDY (1979) conseguiram isolar um híbrido interespecífico instável entre *Aspergillus nidulans* e *A. rugulosus*, usando fusão de protoplasto interespecífica. Por outro lado, LEONG *et alii* (1981) não conseguiram fusão de protoplasto interespecífica similar entre *A. flavus* e *A. parasiticus*.

Os dois fungos aflatoxigênicos, *A. flavus* e *A. parasiticus*, são espécies estritamente anamórficas, sem estágio sexual conhecido; deste modo, não apresentam as vantagens da análise sexual pela genética Mendeliana.

A análise genética através do ciclo parassexual de *A. flavus* e *A. parasiticus*, em particular, apresenta algumas dificuldades, pois:

1-conidiosporos haplóides e diplóides não são facilmente distinguíveis pelo tamanho ou morfologia, tornando os diplóides difíceis de serem identificados (BENNETT, 1979);

2-certos genótipos não segregam ao acaso durante a haploidização (BENNETT *et alii*, 1980a);

3-grupos de incompatibilidade restringem a compatibilidade do heterocário (PAPA, 1986).

Apesar disto, vários mutantes de *Aspergillus* têm sido obtidos e analisados em estudos parassexuais, conduzindo ao estabelecimento dos grupos de ligação e elucidação dos passos da biossíntese de aflatoxina (PAPA, 1977).

O ciclo parassexual em *Aspergillus flavus* foi elucidado por PAPA em 1973 e em *Aspergillus parasiticus* em 1978, também pelo mesmo autor.

O *A. flavus* apresenta o ciclo parassexual bem definido e já existem 24 diferentes mutantes para a via aflatoxigênica, derivados do *A. flavus* parental, PC-7, da coleção do Dr. PAPA. Devido ao fato de todas as cepas mutantes pertencerem ao mesmo grupo de compatibilidade, os genes podem ser transferidos do genoma de uma cepa para outra por recombinação parassexual (BENNETT & PAPA, 1988a).

3.7.3. Mutantes da Via Aflatoxigênica

Mutações em ambas espécies produtoras de aflatoxina, *A. flavus* e *A. parasiticus*, foram induzidos por agentes mutagênicos físicos ou químicos (luz ultravioleta, nitrosoguanidina) ou foram obtidos através da transferência repetida de isolados, para meios de composição definida. Mutantes induzidos pela ultravioleta e produtos químicos incluem cepas aberrantes, cepas produtoras de toxina com cor variada de esporos e aqueles com diferentes auxotrofias (PAPA, 1977).

Uma vez que muitos dos precursores da aflatoxina são pigmentos coloridos, mudanças na pigmentação do micélio, geralmente, estão associadas, com mudanças na produção da toxina (McCORMICK *et alii*, 1987; LEE, 1989).

Mutantes apresentando bloqueio em um dos passos da via biossintética da aflatoxina e que acumulam antraquinonas coloridas vêm sendo utilizados para a elucidação dos passos da biossíntese das aflatoxinas em *A. parasiticus* (BENNETT & CHRISTENSEN, 1983; BENNETT & PAPA, 1988b). Desse modo, o acúmulo de versicolorina A causa uma pigmentação micelial amarela escura (*ver-1*) e o acúmulo de ácido norsolorínico torna o micélio avermelhado (*nor-1*) (BENNETT *et alii*, 1980b).

Esses mutantes têm sido usados para se estabelecer os grupos de ligação dos genes *afl* para ambos os fungos. Pesquisadores independentes usando diferentes linhagens encontraram evidências para um (BENNETT *et alii*, 1980b), quatro (PAPA, 1978), seis (BRADSHAW *et alii*, 1983) e sete (LENNOX & DAVIS, 1983) grupos de ligação dos genes *afl* em *A. parasiticus*, nenhum com grande número de loci. Em dois estudos, um grupo mostrou que dois alelos mutantes para aflatoxina, *ver-1* e *nor-1*, estavam no mesmo grupo de ligação (ou ligados) (BRADSHAW *et alii*, 1983), enquanto

outro estudo os colocou em grupos de ligação separados (LENNOX & DAVIS, 1983).

Estudos utilizando cariotipagem confirmaram que os genes da via aflatoxigênica estão ligados (em “clusters”). A análise do cariótipo de *A. parasiticus* confirmou que os genes *nor-1*, *ver-1* e *omtA* estão localizados no mesmo cromossomo (YU *et alii*, 1995).

A. flavus tem mais de 30 genes distribuídos em oito grupos de ligação, sendo que 11 desses genes afetam a biossíntese da aflatoxina (PAPA, 1976, 1977, 1979, 1984; BENNETT & PAPA, 1988b). Dos 11 genes aflatoxigênicos mapeados, nove foram localizados no grupo de ligação VII, um no grupo de ligação II e um no grupo de ligação VIII (BENNETT & PAPA, 1988b).

Todas as mutações da via aflatoxigênica de *A. parasiticus* e a maioria das de *A. flavus* são recessivas, entretanto, duas mutações de *A. flavus*, *afl-1* e *afl-2* são dominantes e foram obtidas pela indução com agente mutagênico N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) (PAPA, 1979 e 1980).

3.8. RECENTES AVANÇOS

As mais recentes pesquisas sobre biologia molecular de aflatoxinas têm como principais áreas: 1) a estrutura, função, organização e mapeamento comparativo dos genes ou “clusters” gênicos da aflatoxina ou esterigmatocistina em *A. parasiticus*, *A. flavus* e *A. nidulans*; 2) identificação de mecanismos moleculares que regulam os genes da via (genes regulatórios; estrutura e função do promotor da AF) (TRAIL *et alii*, 1995a).

3.8.1. Estratégias para Clonagem de Genes

A clonagem de genes envolvidos na biossíntese da aflatoxina é a chave para o entendimento da biologia molecular desta via.

Genes clonados são usados como sondas para elucidar os mecanismos moleculares que regulam o tempo e o nível de expressão desses genes.

Uma das estratégias usadas com sucesso na clonagem de genes é a complementação genética, que tem sido utilizada no isolamento de genes que codificam 3 enzimas na via, *nor-1*, *ver-1* e *uvm8* e um gene regulatório, *aflR*. Para a introdução de DNA no fungo, sistemas de transformação foram desenvolvidos para *A. parasiticus* (SKORY *et alii*, 1990; HORNG *et alii*, 1990) e *A. flavus* (WOLOSHUK *et alii*, 1989).

Através de técnicas genético-moleculares, TRAIL *et alii* (1995b) demonstraram a presença de um “cluster” gênico numa região de 35Kb, envolvendo os genes *nor-1*, *uvm8* e *ver-1*, num cromossomo de *A. parasiticus* SU1.

Os genes *nor-1* (CHANG *et alii*, 1992) e *ver-1* (SKORY *et alii*, 1992) foram clonados por complementação de mutantes que acumulam os intermediários ácido norsolorínico (NOR), de cor avermelhada e versicolorina A (VER A), de cor amarela, respectivamente. O gene *verA* de *A. nidulans*, funcionalmente homólogo ao gene *ver-1* de *A. parasiticus*, se localiza no braço esquerdo do cromossomo IV (KELLER *et alii*, 1994).

Recentes estudos realizados por MAHANTI *et alii* (1996) comprovam a existência de um novo gene, *fas-1A*, envolvido na biossíntese de aflatoxina B₁, clonado a partir de complementação genética do mutante UVM8 de *A. parasiticus*, bloqueado em dois únicos sítios.

Para confirmar o papel desses genes na biossíntese da aflatoxina, a inativação recombinacional (“gene disruption”) foi utilizada em linhagens toxigênicas de *A. parasiticus* (*nor-1*, TRAIL *et alii*, 1994; *ver-1*, LIANG & LINZ, 1994) e *A. nidulans* (*verA*, KELLER *et alii*, 1994).

Uma segunda estratégia utilizada no isolamento de genes é a genética reversa, onde as enzimas da via são purificadas. Este procedimento foi utilizado para clonar o gene *omt-1*, de *A. flavus*, que codifica a enzima O-metil transferase, responsável pela conversão da esterigmatocistina a O-metil esterigmatocistina (YU *et alii*, 1993).

A hibridização subtrativa foi outra estratégia utilizada por FENG *et alii* (1992) para isolar vários genes cujos padrões de expressão coincidiam com a produção de aflatoxina em *A. parasiticus*.

3.8.2. Regulação da Expressão dos Genes da Aflatoxina

Em cultura, *A. parasiticus* e *A. flavus* produzem aflatoxina durante a idiofase, isto é, quando cessa o crescimento exponencial e os metabólitos secundários são formados (TRAIL *et alii*, 1995a).

Durante o processo de fermentação de *A. parasiticus*, transcritos de RNA de *ver-1* e *nor-1* se acumulam mais rapidamente durante a transição entre crescimento ativo e fase estacionária (SKORY *et alii*, 1993). A transcrição coordenada destes genes sugeriu que eles eram regulados por um fator regulatório comum.

PAYNE *et alii* (1993) verificaram que o gene *afl-2*, de *A. flavus*, codificava um importante fator regulatório da via biossintética da aflatoxina. No mesmo ano, CHANG *et alii* clonaram em *A. parasiticus* um gene homólogo ao *afl-2*, o *apa-2*, que também mostrava-se regulador da via. A

análise da seqüência de nucleotídeos confirmou mais de 95% de homologia entre estes dois genes.

Os genes regulatórios, de um modo geral, codificam membros da família de proteína “cluster” binuclear de zinco (proteína GAL4), que é um fator de transcrição, descrito pela primeira vez em *Saccharomyces cerevisiae*, responsável pela regulação do metabolismo da galactose (GINIGER *et alii*, 1985). Esse domínio de ligação binuclear de zinco fica localizado na porção amino-terminal dessas proteínas e esta região confere especificidade de ligação ao DNA (BURGER *et alii*, 1991).

O zinco é essencial para a biossíntese da aflatoxina (WLOSTOWSKI *et alii*, 1989). Enquanto o zinco serve como grupo prostético de muitas enzimas (WU & WU, 1983) e afeta tanto o metabolismo primário como o secundário (WEINBERG, 1982), JOHNSTON (1987) verificou que o zinco é necessário para a atividade e integridade estrutural do domínio binuclear de zinco da proteína regulatória GAL4.

PAYNE *et alii* (1993) e WOLOSHUK *et alii* (1994) encontraram um domínio “cluster” binuclear de zinco nos genes regulatórios da aflatoxina, *afl-2* e *apa-2*, posteriormente chamados de gene *aflR* (PAYNE *et alii*, 1993), reforçando a hipótese de que o gene *aflR* seja o regulador da expressão da aflatoxina.

CHANG *et alii* (1995) verificaram que os genes estruturais *nor-1*, *ver-1* e *omtA* de *A. parasiticus* e *A. flavus* são dependentes da transcrição do gene regulatório *aflR* (**Figura 7**).

Análises de ELISA e de Western blot revelaram que o acúmulo de aflatoxina B₁ está diretamente relacionado à expressão da proteína AFLR e é regulado por vários fatores ambientais e nutricionais como temperatura, suprimento de ar, fonte de carbono, fonte de nitrogênio e disponibilidade de zinco (LIU & CHU, 1998).

Pesquisas recentes mostraram que o nitrato regula negativamente a expressão de AFLR, levando à supressão da produção da aflatoxina (LIU & CHU, 1998). Estudos anteriores mostraram que o nitrato exerce um efeito supressor sobre a biossíntese da aflatoxina (KACHHOLZ & DEMAIN, 1983) e inibe a transcrição do gene *aflR* (CHANG *et alii*, 1995).

LIU & CHU (1998) relataram, pela primeira vez, a presença da proteína AFLR em linhagens não aflatoxigênicas de *Aspergillus sojae* e *A. oryzae*, mostrando que ocorre uma regulação na expressão do gene *aflR* também nas espécies não toxigênicas.

3.8.3. “Cluster” Gênico da Aflatoxina

A organização dos genes nas vias do metabolismo secundário está disposta formando agrupamentos (“clusters”) em uma região específica de um cromossomo (MALIK, 1986). Exemplos de “clusters” gênicos são relatados em fungos filamentosos como *Neurospora crassa* (GEEVER *et alii*, 1989), *Aspergillus nidulans* (ARAMAYO *et alii*, 1989), além de bactérias, como diferentes espécies de *Streptomyces* que produzem antibióticos derivados de compostos policetônicos (MARTIN & LIRAS, 1989).

Atualmente, já é possível se identificar “clusters” gênicos, assim como genes isolados, de um cromossomo específico, através dos estudos de mapeamento por eletroforese de campo pulsado (BRODY & CARBON, 1989). Alternativamente, se um único gene fosse clonado e este estivesse ligado a outros genes dos passos de uma via biossintética, ele poderia ser usado para se detectar o cromossomo apropriado e uma biblioteca genômica específica poderia ser construída para análise desse “cluster” (KELLER *et alii*, 1992a).

Para a maioria dos fungos, os cariótipos estão sendo definidos por eletroforese e os mapas genéticos estão sendo feitos por meio de sondas com genes clonados e também por análise de RFLP (ORBACH *et alii*, 1988; BRODY & CARBON, 1989).

Estudos do cariótipo de aspergilos aflatoxigênicos indicam que essas espécies têm de 6 a 8 cromossomos atingindo o tamanho de 3 a ≥ 7 Mb. Além disso, várias cepas exibem segmentos cromossômicos polimórficos e carregam pequenos cromossomos de 1 a 1,5 Mb (KELLER *et alii*, 1992b).

Estudos de mapeamento feitos nos laboratórios USDA em New Orleans, com cosmídios de bibliotecas genômicas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, têm mostrado que o “cluster” gênico da aflatoxina encontra-se num segmento de DNA de 60 Kb, contendo várias regiões ORFs (“open reading frames”) (YU *et alii*, 1995).

Recentemente, FOUTZ *et alii* (1995) mapearam por cariotipagem os genes de *A. flavus* *benA*, *rDNA*, *pyrG*, *nor1*, *aflR*, *adh1* nos respectivos grupos de ligação I, II, II, VII, VII e VIII .

3.8.4. “Cluster” Gênico da Esterigmatocistina

Agrupamentos (“clusters”) de genes funcionalmente relacionados são muito mais característicos em procariotos e muito menos prevalentes em eucariotos. A descoberta de que certos tipos de genes de vias metabólicas encontravam-se agrupados é relativamente recente. Há somente 9 anos atrás HULL *et alii* (1989) verificaram que os genes envolvidos no catabolismo da L-prolina em *Emericella nidulans* encontravam-se agrupados.

O agrupamento gênico em fungos pode ser definido como a ligação mais próxima entre dois ou mais genes que participam de uma via metabólica em comum. Os fungos possuem numerosas vias de funções metabólicas “dispensáveis”, que são tipicamente expressadas sob condições de crescimento subótimas (KELLER & HOHN, 1997).

O “cluster” gênico inteiro da esterigmatocistina (aproximadamente 60 kb contendo 25 genes localizados no braço esquerdo do cromossomo IV) foi sequenciado em *Aspergillus nidulans* por BROWN *et alii* (1996). Esse “cluster” está catalogado no GenBank do NCBI (The National Center for Biotechnology Information)⁵ e pode ser localizado pelo Entrez Search System sob o n^o de acesso: U34740. Ele também já foi incluído no mapa genético do *Aspergillus nidulans* e pode ser encontrado na homepage do Institute of Biomedical and Life Sciences da Universidade de Glasgow (U.K.)⁶ (**Figura 8**).

Em *Aspergillus nidulans*, BROWN *et alii* (1994) verificaram que o gene homólogo ao *aflR*, chamado de *anaflR*, se localiza entre o gene *pksA* e *verA* no “cluster” gênico da esterigmatocistina. Também em *A. nidulans*, YU *et alii* (1996) verificaram que 6 genes no “cluster” da ST codificam o gene *aflR* homólogo e que ele também contém um domínio binuclear de zinco. Dessa forma, eles puderam concluir que a proteína AFLR é um ativador específico da expressão da via ST/AF e que a regulação da expressão de *aflR* determina a ativação desta via.

Comparação das Vias Biossintéticas ST/AF

Os genes estruturais em cada uma das vias recebem denominações diferentes, mas codificam proteínas homólogas (**Figura 9**).

⁵ Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [01/03/99].

⁶ Disponível em: <http://www.gla.ac.uk/Acad/IBLS/molgen/aspergillus/maps.html> [01/03/99].

3.8.5. Duplicação dos Genes Aflatoxigênicos

Estudos de mapeamento físico do cosmídio NorA revelaram que há, pelo menos, duas cópias do gene *ver-1* (*ver-1A* e *ver-1B*) e do gene *aflR* localizadas numa região de 12 Kb no genoma de *A. parasiticus* (LIANG *et alii*, 1994). Esta duplicação dos genes *ver-1* e *aflR* em *A. parasiticus* pode explicar a alta estabilidade da produção da toxina quando comparado com *A. flavus*, no qual essa duplicação não é aparente (TRAIL *et alii*, 1995a).

Trabalhos mais antigos já demonstravam a distribuição das aflatoxinas de acordo com a espécie de *Aspergillus*. Segundo autores como DIENER & DAVIS (1966) e NAGARAJAN & BHAT (1973), somente 10% das culturas de *A. flavus* produziram aflatoxinas B₁ e G₁, o restante (90%) produziu somente AFB₁. PIER (1981) observou que 100% dos *Aspergillus parasiticus* isolados de milho produziram aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e que somente algumas linhagens de *A. flavus* produziram B₁ e B₂.

3.8.6. Evolução

Há um alto grau de homologia entre os genes da aflatoxina (*ver-1*, *aflR*, *omt-1*) em *A. parasiticus*, *A. flavus* e *A. nidulans*. A organização desse “cluster” também é bem conservada. Um fato interessante é que os genes *nor-1* e *ver-1* estão presentes em *A. sojae* e *A. oryzae*, que são linhagens não toxigênicas (RARICK *et alii*, 1994). Estes dados sugerem que a linhagem de *Aspergillus* progenitora, que deu origem às espécies atuais, também possuía a via AF/ST. Por isso, seria interessante determinar se *A. nidulans* possui a capacidade genética de produzir aflatoxina, isto é, se ele possui os genes das

enzimas O-metiltransferase e oxidoreductase, responsáveis por converterem ST em AFB₁ (TRAIL *et alii*, 1995a).

Possivelmente, a via aflatoxigênica tenha se desenvolvido a partir de uma via pré-existente de síntese de um policetônico fúngico, talvez um pigmento miceliano ou conidial (TRAIL *et alii*, 1995a). Dados adicionais fortalecem essa hipótese. Em 1992, MAYORGA & TIMBERLAKE verificaram que o gene *wA* de *A. nidulans* codificava uma nova policetônico-sintase (PKS) relacionada com a pigmentação conidial. No ano seguinte, BROWN *et alii* verificaram que o *A. parasiticus* apresenta um pigmento conidial chamado naftapiranona de estrutura química policetônica. BROWN & SALVO (1994), num estudo similar, determinaram que um pigmento do ascosporo de *A. nidulans* (ascoquinona A) era um dímero de uma antraquinona, cuja origem era policetônica.

Estes dados sugerem que estas vias biossintéticas, ou parte delas, tenham evoluído de um ancestral comum (TRAIL *et alii*, 1995a).

Embora a ordem dos genes não seja a mesma entre o agrupamento gênico da ST em *A. nidulans* e o agrupamento gênico da AF em *A. flavus*/*A. parasiticus* (ver **Figura 9**), parece que o agrupamento é evolucionariamente conservado entre estas três espécies (TRAIL *et alii*, 1995b; YU *et alii*, 1995; BROWN *et alii*, 1996). Isto tem sido demonstrado através de estudos que mostram homologia funcional, estrutural (KELLER *et alii*, 1994; SKORY *et alii*, 1993) e reguladora (YU *et alii*, 1996) entre estes agrupamentos gênicos.

3.8.7. Implementação de Estratégias Moleculares para Controle da Aflatoxina e Esterigmatocistina

Estudos que identificam determinantes moleculares resultantes da produção de micotoxinas são promissores com relação à elaboração de estratégias de controle racional.

Por exemplo, o gene regulador *aflR*, que controla a produção tanto de aflatoxinas como de esterigmatocistina em espécies de *Aspergillus*, é candidato a estratégias de controle dessas micotoxinas no futuro. Outro promissor caminho inclui a elucidação das relações entre crescimento, esporulação assexuada e metabolismo secundário em *Aspergillus*. Vários estudos têm mostrado que linhagens de *Aspergillus* enfraquecidas na reprodução assexuada são, do mesmo modo, enfraquecidas na produção de AF e ST (KALE *et alii*, 1994; KELLER *et alii*, 1995). Recentes evidências têm mostrado que o gene *flbA* de *A. nidulans*, envolvido na regulação da atividade da proteína G mediadora da via de sinal de tradução, necessário ao crescimento (LEE & ADAMS; 1994), age através do gene *aflR* regulando a via biossintética da ST. Isto indica a possibilidade da elaboração de futuras estratégias de controle da AF e ST através da criação de inibidores alvo das vias mediadas pela proteína G (BENNETT & KELLER, 1997).

Outra área promissora de pesquisa envolve a identificação de metabólitos de plantas hospedeiras que possam interferir na biossíntese de AF e ST. Vários estudos têm sugerido que produtos de defesa produzidos pelas plantas, conhecidos como lipoxigenase e jasmonato, inibem a produção de AF (DOEHLERT *et alii*, 1993; GOODRICH-TANRIKULU *et alii*, 1995; ZERINGUE, 1996). Pesquisadores da Texas A & M University estão, atualmente, trabalhando com fatores do hospedeiro que afetam a regulação da produção de micotoxinas em espécies de *Aspergillus*. Desse modo,

identificaram possíveis compostos reguladores da AF/ST derivados da via da lipoxigenase de plantas resistentes e suscetíveis. A meta desse grupo é criar plantas transgênicas contendo genes “resistentes” para AF/ST. Sendo assim, desenvolveram ensaios microbiológicos baseados na fusão de vários genes promotor::repórter para avaliar a habilidade, sob vários parâmetros ambientais, químicos e moleculares, de indução ou bloqueio da biossíntese de micotoxinas no campo e no armazenamento (BUROW *et alii*, submetido).

O método de inibição da produção de micotoxinas de fungos em plantas suscetíveis à contaminação por tais micotoxinas consiste na introdução de um gene que codifica para enzima da via da lipoxigenase. Exemplos de enzimas da via da lipoxigenase são lipoxigenase da soja, aleno oxidase, hidroperoxidase liase e hidroperoxidase desidratase. As plantas transgênicas resultantes demonstraram ampla resistência à contaminação com micotoxinas. Plantas que se mostraram muito resistentes à contaminação de micotoxinas de *Aspergillus* spp foram obtidas pela incorporação de genes antisense para ácido-graxo 9-hidroperóxido produtores de lipoxigenases ⁷.

Vários projetos visam a transformação do amendoim e do milho com o gene clonado da lipoxigenase-1 da soja para determinar se a inibição da produção da micotoxina funcionará *in situ* (BENNETT & KELLER, 1997).

3.9. METILAÇÃO DO GENOMA DE EUCARIOTOS

O estudo das atividades dos genes em células somáticas especializadas e em desenvolvimento foi referido como **epigenética** por WADDINGTON em 1953.

Enquanto a mutação é uma alteração hereditária na seqüência de bases do DNA (substituição de base, adição, deleção, inserção ou outros arranjos), a

⁷ Disponível em: <http://teesweb.tamu.edu/tlo/industry/techs/0919.HTM> [01/03/99].

epimutação é uma anormalidade herdável na expressão do gene e não resulta em mudança na seqüência de bases do DNA. O termo epimutação foi introduzido para distinguir as mutações clássicas das mudanças abruptas na atividade do gene (JEGGO & HOLLIDAY, 1986).

Assim como as células herdam genes, elas também herdam um conjunto de instruções que dizem aos genes quando tornarem-se ativos, em qual tecido e até que ponto. Sem este manual de instruções “epigenéticas”, organismos multicelulares não existiriam. Cada célula herda exatamente o mesmo conjunto de genes, mas é o manual epigenético, que contém diferentes instruções para diferentes tipos de células, quem vai permitir que a célula desenvolva sua própria identidade.

JABLONKA (1995), uma bióloga evolucionária da Universidade de Tel-Aviv, teoriza que a herança epigenética em organismos inferiores tem um papel importante na evolução, fornecendo uma fonte adicional de variação, na qual a pressão seletiva pode agir. Embora as alterações epigenéticas possam ocorrer ao acaso, como as mutações na seqüência de DNA, elas também poderiam ser adaptativas, disparadas por alterações ambientais, capacitando os organismos simples a responderem rapidamente a um ambiente variável. JABLONKA (1995) também sugere que a herança epigenética não é uma disputa com a herança clássica dos genes, mas ela poderia ser um sistema de herança complementar, com a seleção natural de Darwin agindo tanto no gene modificado como nos genes que controlam as modificações epigenéticas .

A metilação do DNA está frequentemente relacionada com a inativação do gene e parece estar sempre associada à presença de excesso de DNA no genoma. O silenciamento gênico resulta de uma inativação gênica completa ou parcial, cujos mecanismos são frequentemente estudados pela Epigenética (IRELAN & SELKER, 1996).

O processo de metilação é tradicionalmente dividido em duas fases: 1) estabelecimento, também chamado de metilação *de novo* e 2) propagação, chamada de manutenção da metilação. A simetria dos sítios metilados 5'mCpG e 3'GpmC reflete a operação de uma "metilase de manutenção" que age somente nas citosinas diagonalmente opostas aos radicais metilcitosina, isto é, sítios CpG hemimetilados (SELKER, 1997).

No processo epigenético são de fundamental importância as regras que governam o desligamento dos genes pela metilação de novo do DNA, sua ativação pela perda da metilação, o número de sítios metilados envolvidos e sua relação com as unidades promotoras e transcricionais (HOLLIDAY, 1990).

Os genomas dos eucariotos não são metilados uniformemente e contêm regiões específicas de metilação com outros domínios que permanecem não metilados. Em mamíferos, os padrões de metilação genômico são apagados e novamente restabelecidos durante o desenvolvimento. Estes padrões são propagados em descendentes mitóticos por um eficiente sistema de manutenção de metilação que adiciona grupos metil em sítios hemimetilados após a replicação do DNA (HOLLIDAY & PUGH, 1975).

São muitas as evidências e diferentes as fontes que mostram que o controle da expressão do gene em organismos superiores está relacionado com o padrão de metilação da citosina no DNA e que este padrão de metilação é hereditário. A perda da metilação, pode resultar em danos no DNA, levando à uma anormalidade na expressão do gene. Isto pode ter relação importante com a oncogênese e com o envelhecimento em organismos multicelulares. Defeitos epigenéticos nas células germinativas, causados pela perda da metilação, podem ser reparados por recombinação na meiose, mas alguns podem ser transmitidos para a progênie (HOLLIDAY, 1987).

O silenciamento do gene pela condensação da cromatina é um processo frequentemente associado com alto nível da metilação da citosina do DNA.

Sabe-se que a formação da heterocromatina no DNA pode levar ao silenciamento epigenético em todos os eucariotos, incluindo leveduras, insetos, plantas, vertebrados e mamíferos. Em alguns casos a heterocromatina mediando o silenciamento do gene é acompanhada pela hipermetilação do DNA (KLEIN & COSTA, 1997).

No DNA de vertebrados, 60% dos dinucleotídeos CpG são metilados na posição 5 da base nitrogenada da citosina. A metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento em mamíferos, mas tem forte aumento mutacional no genoma (BESTOR & JAENISCH, 1992). A mutação mais freqüente no DNA humano, é a mudança de C para T no dinucleotídeo CpG (mutação de transição de C para T), já que a 5-metilcitosina (5mC) pode ser diretamente convertida para T por desaminação (KLEIN & COSTA, 1997).

O estado de metilação de um gene é inversamente relacionado com a sua expressão, de forma que a hipermetilação de certos genes promotores resulta na inativação gênica e a hipometilação desses promotores ativa ou reativa a expressão gênica. A reexpressão de genes silenciados por hipermetilação na presença do agente demetilante 5-azacitidina foi demonstrado para muitos genes endógenos e transfectados (KLEIN & COSTA, 1997; LEE *et alii*, 1995).

Aceita-se que a 5-azacitidina previne a metilação do DNA através da formação de um complexo covalente entre moléculas de DNA metiltransferase e resíduos de 5-azacitidina no DNA (JONES, 1984 *apud* SELKER, 1990).

Em alguns casos, a metilação do DNA interfere com a expressão do DNA em ensaios de transfecção (YISRAELI *et alii*, 1988; WEISSHAAR *et alii*, 1988) e em certas células, o tratamento com 5-azacitidina (que interfere com a metilação do DNA) resulta em claras mudanças na expressão do gene (JONES, 1984 *apud* SELKER, 1990).

Silenciamento de genes por metilação também foi descrito em plantas do gênero *Arabidopsis* (ASSAAD *et alii*, 1993). O mecanismo RIGS (“repeat-

induced gene silencing”) é similar aos sistemas descritos em fungos ascomicetos com relação às seqüências repetidas causando hipermetilação do DNA. O mecanismo de inativação age em segmentos extras presentes no genoma dessas plantas (YE & SIGNER, 1996).

Em fungos, os mecanismos de silenciamento gênico mais conhecidos são: **a) “repeat-induced point mutation” rearranjo induzido premeioticamente (RIP)**, que ocorre durante o ciclo sexual em *Neurospora crassa*, detecta e muta seqüências repetidas com alta eficiência (SELKER & GARRET, 1988; FINCHAM *et alii*, 1989); **b) metilação induzida premeioticamente (MIP)**, onde seqüências repetidas são metiladas durante o ciclo sexual em *Ascobolus immersus* (FAUGERON *et alii*, 1990); **c) “quelling”** em *Neurospora crassa*, onde um sistema de silenciamento gênico epigenético ocorre durante o crescimento vegetativo e pode bloquear a expressão de genes homólogos àqueles do DNA introduzido por transformação (ROMANO & MACINO, 1992) e **d) sistema de inativação gênica (GIS)**, que inativa, através de pesada metilação, genes duplicados durante o ciclo sexual em *Aspergillus nidulans* (CASTRO-PRADO & ZUCCHI, 1996). O sistema GIS não age somente no período entre a fertilização e a cariogamia, como acontece em RIP, mas também ocorre em núcleos diplóides precedendo a meiose. Uma outra característica importante deste sistema é que ele causa inviabilidade dos ascosporos, gerando cleistotécios estéreis, afetando também o número total de classes paternais.

SELKER (1997) verificou que o propósito de RIP e MIP é proteger o genoma de elementos transponíveis, isto é, dos chamados transposons. Desse modo, a metilação de seqüências repetidas funciona como um sistema de defesa genômico. BESTOR & COXON (1993) também sugeriram que a metilação da citosina faz parte de um sistema de defesa genômico que inativa seqüências parasitas como transposons e DNA pró-viral. O reconhecimento e a

metilação *de novo* dos sítios CpG próximos das seqüências devem garantir a inativação de elementos invasores imediatamente após sua integração ao genoma.

A comparação dos segmentos alterados por RIP com a sua cópia nativa mostrou um tipo de mutação de ponto G-C → A-T. Assim, o processo RIP provoca mutações de ponto, sendo que 10% ou mais dos pares G-C de seqüências duplicadas podem ser mutados para pares A-T. Nem todos os pares G-C são igualmente mutáveis por RIP. O mecanismo da mutação G-C para A-T dentro das seqüências duplicadas envolve uma deaminação, provavelmente enzimática, das citosinas ou dos resíduos 5mC e estas mudanças podem não ser reparadas, ou simplesmente foram submetidas ao processo RIP. Talvez as mutações de ponto resultantes de RIP possam ser responsáveis pela orientação da metilação do DNA e pela manutenção desta metilação (CAMBARERI *et alii*, 1989).

Em eucariotos inferiores, como fungos filamentosos, a metilação do DNA regula a expressão gênica por alterar a configuração da cromatina, afetando a interação DNA-proteína, protegendo o DNA contra enzimas de restrição, afetando a replicação, a taxa de mutação e a recombinação. O DNA metilado dos paternos é herdado e mantido durante as divisões celulares pela ação da enzima metiltransferase, que atua na forquilha de replicação (DOERFLER, 1983; SELKER, 1990).

Finalmente, além da função protetora, o processo de metilação age como um sistema de modificação pós replicativo relacionado ao controle da expressão de genes. Em alguns ascomicetos, a inibição da transcrição de vários genes estruturais pela metilação do DNA sustentam esta hipótese (SELKER *et alii*, 1987a). Nestes organismos as regiões cromossômicas ativamente transcritas não são metiladas (SELKER, 1990). Em *Neurospora crassa*, os mais altos níveis de 5-metilcitosina ocorrem no conídio e na fase estacionária

do ciclo. Células em crescimento exponencial apresentam os mais baixos níveis de metilação (RUSSEL & NURSE, 1987).

Desse modo, as seqüências de DNA que podem ser metiladas pela 5-metilcitosina podem regular a expressão dos genes (DOERFLER, 1983; SELKER *et alii*, 1987b). Tais seqüências 5'CpG3' foram observadas próximas ao promotor de certos genes estruturais (HOLLIDAY & PUGH, 1975). Então, a metilação do DNA na transcrição de genes reguladores pode modular a interação da RNA polimerase II com aquelas seqüências de DNA, bloqueando a transcrição. Portanto, o modelo de metilação para regulação da expressão gênica é muito adequado para explicar porque há linhagens de *Aspergillus nidulans* que são produtoras de esterigmatocistina e outras que não produzem esta micotoxina, sem nenhuma mutação típica envolvida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Linhagens

Neste trabalho foi utilizado o fungo *Emericella nidulans* (Eidam) Vuillemin, pertencente à Subdivisão *Ascomycotina*, cuja fase anamórfica é designada de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter.

→ Linhagens haplóides de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter, originárias de Glasgow, foram obtidas a partir dos estoques de Utrecht, Holanda.

De acordo com a nomenclatura proposta por CLUTTERBUCK (1993), o mapa genético do *Aspergillus nidulans* consta no item **8. Anexo** (pág. 125) e os alelos mutantes das linhagens UT448, UT196 e UT184 com seus respectivos grupos de ligação são os descritos a seguir :

UT448 : *wA2* (II), conídios brancos; *riboA1*, *pabaA124* , *biA1* (I), com requerimentos para riboflavina, ácido *p*-aminobenzóico e biotina, respectivamente; *acrA1* (II) resistente a acriflavina.

Esta linhagem não é produtora de esterigmatocistina (DEZOTTI & ZUCCHI, in prep.)

UT196 : *yA2* (I), deficiente em lacase I e conídios amarelos; *metA17* (II), deficiente em cistationina gama-sintase com requerimento para metionina; *piroA4* (IV), com requerimento para piridoxina.

Esta linhagem produz esterigmatocistina (DEZOTTI & ZUCCHI, in prep.)

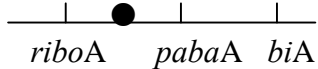
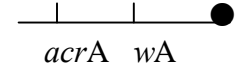
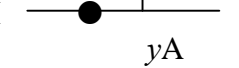
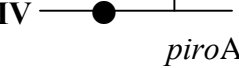
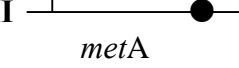
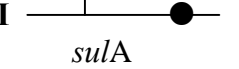
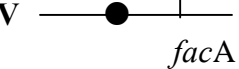
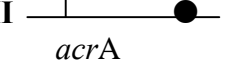
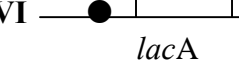
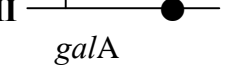

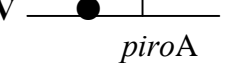
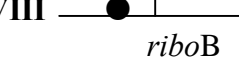
UT184 : *chaA1* (VIII), conídios cor “chartreuse”; *piroA4* (IV); *sB3* (VI); *nicB8* (VII); *riboB2* (VIII), com requerimentos para piridoxina, tiosulfato de sódio, ácido nicotínico e riboflavina, respectivamente; *galA1* (III); *facA303* (V); *lacA1* (VI), com inabilidade de utilizar galactose, acetato e lactose como fontes de carbono, respectivamente; *sulA1* (I); *acrA1* (II), resistente a sulfanilamida e acriflavina, respectivamente.

Esta linhagem não é produtora de esterigmatocistina (DEZOTTI & ZUCCHI, in prep.).

A **Tabela 4** apresenta os mapas genéticos parciais de cada uma das linhagens mutantes UT448, UT196 e UT184 usadas neste trabalho.

➔ Linhagens diplóides de *Aspergillus nidulans* UT448//UT196 e UT448//UT184, ambas com conídios de cor verde, foram obtidas de acordo com a metodologia de ROPER (1952). Os alelos mutantes foram alocados nos grupos de ligação, por haploidização mitótica (FORBES, 1959). A haploidização dos diplóides foi obtida espontaneamente em meio completo (MC). As frequências de recombinação (FR) entre dois marcadores, ligados ou não, foram determinadas em porcentagem (ver item 4.2.5.6.).

Tabela 4 – Mapas parciais das linhagens mutantes de *Aspergillus nidulans*.

Linhagens	Genótipos	Fenótipos
UT448	I  <i>riboA pabaA biA</i> II  <i>acrA wA</i>	Conídios brancos, morfologia da colônia normal <i>ribo, paba, bi, w, acr^R</i>
UT196	I  <i>yA</i> IV  <i>piroA</i> II  <i>metA</i>	Conídios amarelos, morfologia da colônia normal <i>y, met, piro</i>
UT184	I  <i>sulA</i> V  <i>facA</i> II  <i>acrA</i> VI  <i>lacA sB</i> III  <i>galA</i> VII  <i>nicB</i> IV  <i>piroA</i> VIII  <i>riboB chaA</i>	Conídios “chartreuse”, morfologia da colônia normal <i>piro, s, nic, riboB, gal, fac, lac, cha, sul^R, acr^R</i>

Nota: A cor dos conídios em *Aspergillus nidulans* depende dos pigmentos produzidos pelo ascosporo maduro e envolve a expressão de pelo menos dois genes: *yA* and *wA* (in ZUCCHI, 1996). O produto de *yA* é a *p*-difenoloxidase, ou lacase, que transforma o pigmento amarelo precursor em pigmento verde (y^+). O gene *wA* codifica uma policetônico sintase; mutações nesse gene resultam em linhagens com esporos brancos (MAYORGA & TIMBERLAKE, 1992). A cor dos conídios depende do alelo w^+ presente no cromossomo II. Conídios verdes ou amarelos dependem da presença dos alelos y^+ ou y , respectivamente, no cromossomo I. Desse modo, genótipos y^+w^+ , y^+w , yw^+ and yw resultam em conídios com fenótipos verde, branco, amarelo e branco, respectivamente (MAYORGA & TIMBERLAKE, 1990; TILBURN *et alii*, 1990; TIMBERLAKE & MARSHALL, 1988).

→ Linhagens produtoras de ácido norsolorínico (NOR), gentilmente cedidas pela Dra. Nancy P. Keller (Departamento de Fitopatologia e Microbiologia, Texas A&M University, USA). Estas linhagens foram necessárias para servirem como padrão de NOR, já que não há no mercado este metabólito purificado e comercializado pela Sigma:

A. nidulans TJH3.40 : *wA* (II) conídios brancos; *biA1* (I), com requerimento para biotina; *metG1* (IV), deficiente em cistationina β -liase com requerimento para metionina, *stcE::argB2* (IV), o gene *stcE*, que codifica uma redutase necessária para converter ácido norsolorínico em averantina, foi rompido (“knock out”) com o gene *argB*; *veA1* (VIII), morfologia “velvet” com sensibilidade à luz.

A. parasiticus ATCC 90816 : *wh*; *nor-1*. Linhagem mutante de conídios brancos, produtora das 4 aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e que também acumula NOR.

4.1.2. Meios de Cultura e Soluções

Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO *et alii*, 1953b) **Modificado** (VAN DE VATE & JANSEN, 1978) : 6,0 g/L NaNO₃; 1,52 g/L KH₂PO₄; 0,52 g/L MgSO₄.7H₂O; 0,5 g/L KCl; 1,0 mg/L FeSO₄.7H₂O; 1,0 mg/L ZnSO₄.7H₂O; 1,0 mg/L CuSO₄.5H₂O; 10,0 g/L glicose; pH 6,0. Para se preparar MM sólido, adiciona-se 15,0 g/L de Bacto agar Difco.

Meio Completo (MC) (JANSEN, 1970) : 2,0 g/L Bacto peptona Difco; 1,0 g/L Bacto casaminoácidos Difco; 2,0 ml/L solução estoque de vitaminas; 2,5 ml/L solução estoque de hidrolisado de ácidos nucleicos; o volume é

completado com MM líquido, pH 6,0. Para se preparar MC sólido, adiciona-se 15 g/L de Bacto agar Difco.

Solução de Vitaminas (JANSEN, 1970) : 2,0 mg biotina; 50,0 mg piridoxina; 50,0 mg ácido *p*-aminobenzóico; 50,0 mg ácido fólico; 50,0 mg aneurina; 100,0 mg nicotinamida; 100,0 mg riboflavina; 200,0 mg ácido pantotênico; 200,0 mg cloreto de colina; 400,0 mg *meso*-inositol; completar o volume para 200 ml com água desmineralizada. A solução é esterilizada em banho-maria, sob vapor fluente, por 20 minutos e conservada em frasco escuro a 4°C contendo 2,0 ml de clorofórmio.

Hidrolisado de Ácidos Nucleicos (*in* JANSEN, 1970) : esta solução é preparada adicionando-se 2 g de RNA sódico de leveduras em 15 ml de NaOH 1N e 2 g de DNA sódico de timo de bezerro em 15 ml de HCl 1N. As soluções são aquecidas por 20 minutos em banho-maria, misturadas e o pH é ajustado para 6,0. A solução é filtrada quente e o volume é completado para 40 ml. A solução é guardada em frasco escuro a 4°C contendo 1 ml de clorofórmio.

Meio Mínimo com 2% de Meio Completo : ao MM líquido acrescenta-se 2% de MC também líquido. São distribuídos 2,5 ml em tubos esterilizados e mantidos sob refrigeração.

Meio Seletivo (SM) : o meio seletivo é preparado a partir de MM suplementado com todos os nutrientes requeridos pela linhagem analisada, exceto um deles, o requerimento em estudo. Para se verificar a habilidade de utilização de fontes alternativas de carbono, estas são usadas em substituição à glicose, nas concentrações citadas no quadro abaixo. Os nutrientes são

adicionados ao SM a partir de soluções-estoque, previamente preparadas, contendo as seguintes concentrações:

Requerimentos nutricionais	Abrevia-turas	Concentração da solução estoque (mg/100 ml)	Adicionar a 200 ml de MM	Concentração final no meio de cultura (mg/ml)
Riboflavina	<i>ribo</i>	20,0	1,0 ml	1,0
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	<i>paba</i>	13,7	1,0 ml	0,68
Biotina	<i>bi</i>	0,4	1,0 ml	0,02
Acriflavina	<i>acr</i>	500,0	0,25 ml para MM (ou 2,5 ml para MC)	6,25 para MM (ou 62,5 para MC)
L-metionina	<i>met</i>	200,0	2,0 ml	20,0
Piridoxina	<i>piro</i>	10,0	1,0 ml	0,5
Tiosulfato de sódio	<i>s</i>	24800,0	1,0 ml	1240,0
Ácido nicotínico	<i>nic</i>	20,0	1,0 ml	1,0
Galactose	<i>gal</i>	20000,0	10 ml	10000,0
Lactose	<i>lac</i>	20000,0	10 ml	10000,0
Acetato	<i>fac</i>	24000,0	10 ml	12000,0

As soluções-estoque são esterilizadas em banho-maria por 20 minutos e conservadas em frasco escuro a 4°C contendo 1 ml de clorofórmio.

Agar 3% : Mistura-se 30 g de Bacto agar Difco a 1000 ml de água destilada.

Czapek Agar (SAMSON & PITT, 1985) : 3,0 g/L NaNO₃; 1,0 g/L K₂HPO₄; 0,5 g/L KCl ; 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O; 0,01 g/L FeSO₄.7H₂O; 30 g/L sacarose; 15 g/L agar Difco; pH 6,0 a 6,5.

Meio de Aveia (HAJJAR *et alii*, 1989) modificado : 10 g de aveia Quaker flocos finos e 30 ml de água destilada. Autoclavar por 1 hora a 120°C e 1 atm de pressão.

Solução Salina : 8,5 g NaCl em 1000 ml de água destilada.

Solução de Cloreto de Potássio 4% : 4 g de KCl em 100 ml de água destilada.

Solução de Cloreto de Sódio 4% : 4 g de NaCl em 100 ml de água destilada.

Solução de Sulfato de Cobre 10% : 10 g de CuSO₄.5H₂O em 100 ml de água destilada.

Solução de Cloreto de Alumínio 20% em etanol 75% : 20 g AlCl₃.6H₂O em 75 ml de etanol e 25 ml de água destilada.

Solução de 5-azacitidina: (C₈H₁₂N₄O₅ - peso molecular = 244,2 - Sigma Chemical Company n^o. A 2385) 50 mg de 5-azacitidina em 10 ml de tampão fosfato 1M pH = 7,4. Usar 7,3 µl da solução em 50 ml de MC.

4.1.3. Corante

Lactofenol Azul-Algodão (Meio de Amann) : 20 g ácido láctico; 20 g cristais de fenol; 20 g glicerina; 0,05 g azul algodão (Methyl Blue Difco); 20 ml água destilada. Fundir os cristais de fenol em banho-maria e juntar tudo. Esperar 24 horas e filtrar. Corante usado nos microcultivos de *Aspergillus* spp.

4.1.4. Padrões Toxigênicos

Padrão Qualitativo de Aflatoxinas B₁ e G₁ : cedido pela Dra. Maria Antonia Calori Domingues (Laboratório de Micotoxinas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ-USP) e mantido a -10°C.

Padrão Quantitativo de Aflatoxina B₁ : (C₁₇H₁₂O₆ - peso molecular = 312,3) Padrão da Sigma Chemical Company , n^o A-6636, 1 mg. O padrão foi diluído em benzeno/acetoneitrila (98:2) na concentração de 10 µg/ml; foi armazenado em balão volumétrico, envolto em papel alumínio e mantido a -10°C.

Padrão Quantitativo de Esterigmatocistina : (C₁₈H₁₂O₆ - peso molecular = 324,3) Padrão da Sigma Chemical Company, n^o S-3255, 1 mg . O padrão foi diluído em benzeno na concentração de 20 µg/ml; foi armazenado em balão volumétrico, envolto em papel alumínio e mantido a -10°C.

Padrão Quantitativo de O-Metil Esterigmatocistina : (C₁₉H₁₄O₆ - peso molecular = 338,3) Padrão da Sigma Chemical Company, n^o M-8637. O padrão foi diluído em benzeno na concentração de 50 µg/ml; foi armazenado em balão volumétrico, envolto em papel alumínio e mantido a -10°C.

Padrão Qualitativo de Ácido Norsolorínico : Devido à inexistência de padrão purificado de NOR, foram utilizadas linhagens produtoras deste intermediário policetônico, cedidas pela Dra. Nancy Keller (Texas A&M University) (ver item 4.1.1.).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Manutenção das Linhagens de *Aspergillus* spp.

➔ Linhagens haplóides e diplóides de *Aspergillus nidulans* foram mantidas em culturas estoques de meio completo (MC), a partir de colônias isoladas e geneticamente puras, crescidas a 37°C por 3 dias e guardadas a 4°C.

➔ Linhagem de *Aspergillus parasiticus* foi mantida em meio Czapek agar, crescida por 7 dias a 25°C e guardada a 4°C para a manutenção das suas características originais.

4.2.2. Microcultivo das Linhagens de *Aspergillus nidulans*

As linhagens de *Aspergillus nidulans* foram submetidas ao microcultivo em lâmina utilizando-se MC por 3 dias a 37°C (Técnica de RIDDELL, 1950).

Esta técnica foi utilizada para uma detalhada análise micromorfológica e confirmação taxonômica dos aspergilos.

4.2.3. Fotomicrografia dos *Aspergillus nidulans*

As lâminas obtidas a partir do microcultivo de cada linhagem de *Aspergillus nidulans* foram coradas com lactofenol azul-algodão e fotografadas

em microscópio binocular da marca Zeiss com máquina fotográfica acoplada, marca Zeiss modelo M35.

Também foi utilizado um microscópio estereoscópico da marca Zeiss/Jena com máquina fotográfica acoplada, para fotografar detalhes macromorfológicos de estruturas específicas das colônias.

4.2.4. Avaliação da Produção de Esterigmatocistina em Linhagens Haplóides e Diplóides

As linhagens de *Aspergillus nidulans* foram submetidas à pesquisa de esterigmatocistina através da metodologia preconizada por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989). Este método é conhecido como multimétodo por extrair quatro micotoxinas simultaneamente: aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina e esterigmatocistina.

4.2.4.1. Extração da Esterigmatocistina

Foram preparadas suspensões de conídios contendo 1×10^7 conídios/ml e inoculados em 40 g de meio de aveia (HAJJAR *et alii*, 1989) durante 10 dias a 28°C.

Para a extração da esterigmatocistina (ST) foram adicionados 216 ml de metanol p.a. e 24 ml de uma solução de KCl 4% ao frasco do meio de cultura, que foi fechado com tampa, envolto em papel alumínio e agitado manualmente por 30 minutos. A suspensão foi filtrada em papel de filtro Whatmann n°. 1 e uma alíquota de 120 ml foi retirada e transferida para um becker de 600 ml.

4.2.4.2. Purificação da Esterigmatocistina

Aos 120 ml do filtrado foram adicionados 120 ml de uma solução clarificante de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10% e 40 ml de celite, medido em Becker. A suspensão obtida foi, então, agitada com um bastão e, em seguida, filtrada em papel de filtro, de onde foram retirados 120 ml e transferidos para um funil de separação de 500 ml. Em seguida, foram adicionados 120 ml de água destilada e 5 ml de clorofórmio. O conteúdo do funil foi agitado vigorosamente e, após separação das fases, foi recolhida a fase clorofórmica (inferior) em um frasco âmbar. A fração aquosa do funil foi extraída mais uma vez com 5 ml de clorofórmio e concentrada no frasco âmbar até a secura, em banho-Maria a 100°C .

4.2.4.3. Cromatografia da Esterigmatocistina

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada de acordo com SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989).

A cromatografia é uma técnica que separa uma mistura de moléculas e é a técnica de escolha para análise de metabólitos secundários. Na cromatografia há uma interação entre a fase estacionária (sílica gel), a mistura a ser separada e a fase móvel (solventes). Forças físicas e químicas atuam entre as duas fases, causando a separação das moléculas através da sua migração pelo adsorvente (sílica) (BRIDGE, 1992). A análise dessa migração na placa pode ser medida através do valor da “razão de fluxo” (R_f) de cada amostra.

Foram utilizadas placas cromatográficas aluminizadas da Merck (código 1.05553), contendo sílica gel 60, sem indicador de fluorescência, de tamanho 20x20cm e de espessura 0,2mm, de acordo com JONES (1972).

A placa foi demarcada com pontos chamados “spots”, localizados há 2 cm da base inferior da placa, onde foram aplicadas as amostras e o padrão de aflatoxina. Entre os “spots” foi deixada uma distância de pelo menos 1 cm para uma melhor visualização das manchas. O diâmetro do “spot” deve ser sempre o menor possível para não haver dispersão da toxina. Foi delimitada uma linha de “front” de 12 cm da base da placa, riscando-a com um estilete, para limitar a fase móvel do sistema (solventes).

As amostras, previamente extraídas e purificadas, foram redissolvidas em 1 ml de benzeno. Em seguida, alíquotas de 10 µl, tanto das amostras quanto do padrão, foram aplicadas nos “spots” da placa cromatográfica através de micropipeta.

A placa foi colocada verticalmente numa cuba cromatográfica, com tampa de vidro, saturada com o sistema de solventes tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (60 : 40 : 0,5, v/v/v), sistema este indicado para separação simultânea das quatro micotoxinas, a saber: aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina e esterigmatocistina.

Após o sistema de solventes atingir a linha de “front” , a placa foi retirada da cuba, seca ao ar e observada sob câmara escura contendo uma lâmpada de luz ultra-violeta, de comprimento de onda de 365 nm, com emissão máxima de 125 watts, da marca Phillips HPW, distante 30 cm da placa, de acordo com JONES (1972), para verificação de uma mancha de fluorescência vermelho-tijolo, característica da esterigmatocistina (VAN EGMOND *et alii*, 1980).

Através da corrida cromatográfica foi possível calcular a razão de fluxo (Rf) de cada amostra, expressa pela fórmula:

$$Rf = \frac{\text{distância percorrida pela amostra}}{\text{distância percorrida pelo solvente}}$$

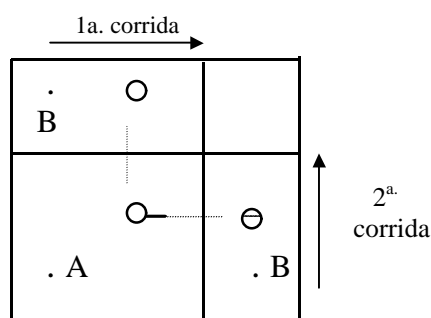
4.2.4.4. Testes Confirmatórios para Esterigmatocistina

Após a corrida cromatográfica, a placa foi borrifada com uma solução de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20% em etanol 75% e foi aquecida a 110°C por 10 minutos com posterior observação sob luz U.V.. A identidade da toxina foi confirmada pela derivação da ST em 1,3,8-trihidroxixantona, uma substância de fluorescência amarela intensa, que é formada pela reação com o cloreto de alumínio, facilitando muito a sua visualização (DAVIES *et alii*, 1960).

Além do cloreto de alumínio, também foi usado outro teste para confirmação da esterigmatocistina: a cromatografia em camada delgada bidimensional.

Neste teste foram feitas duas corridas em direções diferentes e com sistema de solventes diferentes para cada corrida.

O esquema para o desenvolvimento de cromatoplasas em camada delgada bidimensional mostra os “spots” da amostra e do padrão e a direção das corridas.



A = ponto de partida da amostra.

B = pontos de partida do padrão.

Os sistemas de solventes utilizados na corrida bi-dimensional foram os seguintes:

1° sistema de solventes: tolueno/acetato de etila/ ácido fórmico (60:40:0,5)

2° sistema de solventes: benzeno/ácido acético glacial (95:5)

A confirmação é obtida quando a amostra fica localizada perpendicularmente aos padrões, formando um ângulo reto entre eles.

4.2.4.5. Quantificação da Esterigmatocistina

O padrão de esterigmatocistina da Sigma foi quantificado em espectrofotômetro Spectronic Genesys 5 da Spectronic Instruments, segundo metodologia descrita no OFFICIAL Methods of Analysis of AOAC International (1995, section **49.2.02**).

A quantificação da ST tanto das linhagens haplóides como das linhagens diplóides UT448//UT196 e UT448//UT184 e também de alguns segregantes meióticos foi feita a partir da cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando metodologia preconizada pelo OFFICIAL Methods of Analysis of AOAC International (1995, section **49.7.01**). O cálculo utilizado na quantificação das amostras foi descrito a seguir:

$$\mu\text{g/kg} = (S \times Y \times V) / (X \times W) \quad \text{onde}$$

S = μl do padrão de ST cuja mancha originou fluorescência igual a da amostra.

Y = concentração do padrão de ST ($\mu\text{g/ml}$)

V = μl do solvente necessário para diluir o extrato final

X = μl do extrato da amostra cuja mancha originou intensidade de fluorescência igual a do padrão (S).

W = peso em g da amostra original contida no extrato final.

4.2.4.6. Detecção Rápida da Esterigmatocistina

Para ensaios qualitativos de ST foi feita uma adaptação do método descrito por PATERSON (1986).

Inicialmente, as amostras foram inoculadas em meio de aveia (1g de aveia Quaker + 3 ml de água destilada), onde cresceram durante 7 dias a 28°C. Após esse período, “plugs” foram retirados do meio de cultura e colocados diretamente na superfície de uma placa cromatográfica. Os “plugs” eram compostos por conídios, micélio e meio de cultura onde o fungo havia crescido. Eles tinham tamanho aproximado de 4 mm³ e foram colocados na superfície da placa durante 10 segundos, em posições definidas, até umedecerem a placa cromatográfica.

Este método foi adotado em substituição à extração química, para análise qualitativa de ST tanto dos segregantes meióticos como também dos mitóticos.

4.2.5. Técnicas de Análise Genética

As técnicas de análise genética empregadas foram as mesmas descritas por ROPER (1952) e PONTECORVO *et alii* (1953) e envolvem as seguintes etapas:

4.2.5.1. Preparo da Suspensão de Conídios

Conídios de *Aspergillus nidulans* foram coletados de colônias crescidas por 4 dias a 37°C em 5 placas de meio completo (MC). A superfície

de cada placa foi coberta com 10 ml de solução salina-tween esterilizada e os conídios destacados com auxílio de um bastão de vidro estéril com ponta arredondada. A suspensão resultante foi transferida para tubos de centrifuga esterilizados e centrifugada 15 minutos a 2000 g. Os conídios foram lavados com solução salina esterilizada e centrifugados 3 vezes sucessivas. Após a última centrifugação, a suspensão de conídios foi filtrada em tubo com lã de vidro esterilizada e coletada em frasco âmbar esterilizado para ser submetida a forte vibração no ultra-som por 10 minutos, para completa dissociação das cadeias de conídios. A concentração da suspensão de conídios dada em n^o de conídios/ml foi determinada pela contagem em Câmara de Neubauer e o frasco foi mantido a 4°C.

4.2.5.2. Obtenção do Heterocário entre Linhagens de *Aspergillus nidulans*

Heterocariose é um fenômeno comum em fungos que consta da associação de núcleos geneticamente diferentes num sistema capaz de se propagar. O heterocário fornece benefícios às linhagens que o originaram, uma vez que qualquer deficiência genética de uma delas será suprida pela correspondente capacidade normal da outra e vice-versa (RAPER, 1955).

O heterocário pode ser obtido tanto entre fungos que possuam ciclo sexual como o parassexual. Para obtenção do heterocário foram colocados cerca de 10⁶ conídios/ml, das linhagens a serem cruzadas, em tubos contendo 2 ml de MM líquido + 2% MC líquido. O meio completo permite uma pequena germinação dos conídios levando a anastomose entre hifas e uma possível fusão de núcleos geneticamente diferentes (heterocariose).

Após incubação por 72 horas a 37°C, ocorre a formação do heterocário que é constituído de uma massa micelial compacta, formando uma película na superfície do meio líquido.

4.2.5.3. Análise Meiótica do Cruzamento UT448 x UT196

A análise meiótica visa fornecer informações a respeito das distâncias genéticas entre os vários marcadores envolvidos num cruzamento, assim como a localização de novos *loci* mutantes nos diferentes grupos de ligação, além de determinar as suas relações com outros *loci* estudados.

O heterocário, obtido do modo descrito no item 4.2.5.2., foi cortado em quatro pequenos pedaços e estes foram colocados em placa com MM, que foi vedada com plástico Magipack por 18 dias a 37°C. A baixa tensão de oxigênio força a ocorrência do ciclo sexual meiótico no fungo, com produção de cleistotécios híbridos, formados pela fusão de núcleos das linhagens geneticamente diferentes que foram cruzadas.

Após esse período, os cleistotécios contendo todos os produtos da meiose foram limpos sobre a superfície de agar 30% e esmagados no interior de tubos contendo salina, para liberação dos ascosporos. Alíquotas dessa suspensão foram semeadas em cerca de 10 placas de MC, de modo a se obter cerca de 20 colônias por placa. Elas foram incubadas a 37°C por 3 dias. Cada ascosporo viável deu origem a uma colônia. Então, conídios da periferia de cada colônia foram transferidos para 25 posições definidas (padrão 5x5) em “placas mestras” (PM) contendo MC, que foram incubadas a 37°C por 3 dias. Com a utilização de um replicador multifio, cada placa foi replicada para placas de análise, contendo meio seletivo (SM), suplementado de acordo com os marcadores genéticos das linhagens envolvidas no cruzamento. As placas de

análise foram incubadas a 37°C e as leituras dos resultados foram feitas após 24 e 48 horas de incubação.

A partir dos resultados obtidos das placas de análise, foi possível organizar uma lista de genótipos da progênie e, por conseguinte, organizar uma tabela que permitiu o cálculo das frequências de recombinação (FR) entre todos os marcadores envolvidos. Esta tabela (tipo quadrado latino) permitiu verificar as relações de “linkage” ou não dos diversos marcadores genéticos focalizados neste cruzamento (ver item 4.2.5.6.).

4.2.5.4. Obtenção de Diplóides entre Linhagens de *Aspergillus nidulans*

O heterocário, obtido do modo descrito no item 4.2.5.2., foi recolhido do tubo com alça de platina, cortado em 4 partes que foram posicionadas separadamente na superfície de uma placa com meio mínimo (MM) e esta foi incubada a 37°C por 5 dias. Após esse período, foram observados setores de crescimento vigoroso e de cor verde entre as regiões heterocarióticas. Estes setores correspondem ao diplóide heterozigoto que consegue crescer em MM, uma vez que as auxotrofias envolvidas no cruzamento são complementares. Os conídios desses setores foram repicados mais uma vez em MM para isolamento completo do diplóide.

4.2.5.5. Análise Mitótica do Diplóide UT448//UT184

A análise mitótica através do ciclo parassexual visa fornecer informações sobre a segregação dos diferentes cromossomos durante a haploidização. Ela também pode evidenciar alterações nas frequências de recombinação mitótica, bem como qualquer anormalidade na segregação dos

diferentes grupos de ligação, durante a haploidização. Este tipo de análise também pode determinar a ligação de uma nova mutação a um determinado cromossomo.

O diplóide UT448//UT184, obtido do modo descrito no item 4.2.5.4., foi haploidizado espontaneamente em placas contendo MC que foram incubadas a 37°C por 7 dias. Nesse período, o diplóide, que encontra-se numa fase de vida instável, tende a estabilizar seu genoma sofrendo aneuploidias sucessivas ($2n-1$) até chegar à haploidização. Desse modo, diversos setores haplóides surgiram a partir do diplóide e foram, então, purificados em placas de MC. Cada setor purificado foi transferido para uma das 25 posições definidas da “placa mestra” (PM) contendo MC. Depois de 3 dias de incubação a 37°C, estas colônias foram replicadas, com um replicador multifio, para placas de análise contendo meio seletivo (SM), suplementado de acordo com as auxotrofias das linhagens haplóides componentes do diplóide. As placas de análise foram incubadas a 37°C e as leituras foram feitas após 24 e 48 horas de incubação.

A partir dos resultados das placas de análise, foi construída uma lista de genótipos das colônias haplóides e, desse modo, foi possível calcular as frequências de recombinação (FR) entre todos os marcadores envolvidos utilizando tabela do tipo quadrado latino (ver item 4.2.5.6.).

4.2.5.6. “Quadrado Latino” para Análise de Dois Pontos

A apresentação dos resultados dos cruzamentos foi do tipo “quadrado latino”, obtido a partir dos resultados das listas de genótipos dos segregantes meióticos e mitóticos.

Desta forma, o comportamento de cada um dos genes no cruzamento pôde ser relacionado a todos os outros envolvidos no cruzamento meiótico ou mitótico.

Para construção do quadrado latino, os dados devem ser apresentados na seguinte ordem:

- a) Os totais dos alelos mutantes e selvagens segregantes de cada gene envolvido nos cruzamentos devem ser dispostos nas duas metades dos quadros da diagonal maior (vide exemplo a seguir) .
- b) A distribuição das 4 classes possíveis de paternas e recombinantes entre dois genes devem ser colocados à direita da diagonal maior, dispostos de tal forma que os números das classes paternas (P) fiquem em posição diagonal, perpendicular à diagonal maior e os números das classes recombinantes (R) fiquem também em posição diagonal, mas paralela à diagonal maior (vide exemplo a seguir).

Ex: $ab \times a^+b^+$

	a	$a^+ b$	b^+
a^+		26 R	P
a	30	P	R
b^+	FR $a-b$		24
b		32	

- c) Nos quadros situados à esquerda da diagonal maior estão as freqüências de recombinação (FR) entre cada dois marcadores, de onde é calculada por :

$FR = \frac{\text{n}^\circ \text{ de recombinantes}}{\text{n}^\circ \text{ de paternas} + \text{recombinantes}} \times 100$	(in ZUCCHI, 1986).
---	---------------------

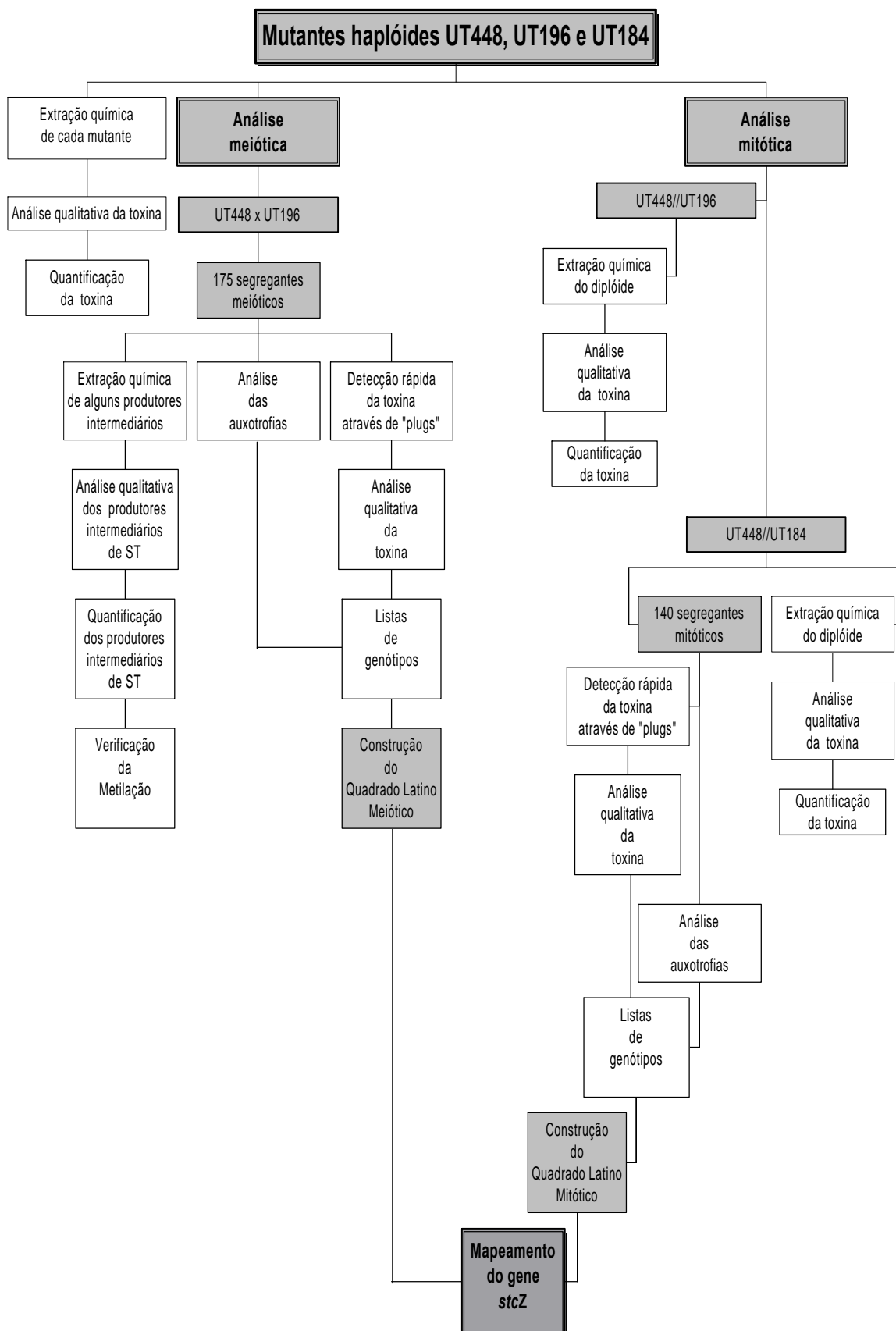
A frequência de recombinantes (FR) de 0,01 ou 1% é definida como uma unidade de mapa, ou também, referida como um centimorgan (cM), em homenagem a Thomas Hunt Morgan (SUZUKI *et alii*, 1992).

4.2.6. Análise da Metilação

O agente desmetilante 5-azacitidina foi utilizado em uma placa mestra contendo 25 segregantes meióticos de UT448 x UT196, não produtores de ST, para verificar sua ação demetiladora em relação à produção de ST.

A placa mestra foi preparada contendo MC adicionado de 300 μ M de 5-azacitidina (BULL & WOOTON, 1984) e incubada durante 5 dias a 37°C. Após esse período, cada um dos segregantes foi repicado em SM para análise de uma eventual mudança na expressão de alguns dos genes em estudo.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE *Aspergillus nidulans*

Todas as linhagens de *Aspergillus nidulans* utilizadas neste trabalho foram, primeiramente avaliadas quanto às suas características morfológicas e taxonômicas para confirmação da espécie.

As características macromorfológicas foram obtidas através da colônia crescida no centro de uma placa de Petri (**Figura 10**) e as características micromorfológicas através do microcultivo em lâmina (**Figura 11**).

As linhagens UT448, UT196 e UT184 de *Aspergillus nidulans* apresentam mutações para cor de conídio e diversas auxotrofias. A partir do microcultivo de cada uma delas, foi possível a verificação das seguintes características morfológicas: cabeças conidiais tipicamente colunares; conidióforos normalmente sinuosos, de paredes lisas e de cor levemente marrom; esterigmata bisseriado; conídios globosos e rugulosos de cor variada, de acordo com a mutação nos genes *y* e *w*. Na fase teleomórfica, este fungo apresentou: cleistotécios normalmente pequenos e globosos e, quando maduros, apresentaram a parede composta por uma camada de células com pigmento marrom-avermelhado; as células Hülle formam uma camada densa que envolve o cleistotécio externamente; ascosporos vermelho-púrpura, lenticulados e de paredes lisas com duas cristas na região equatorial.

Estes termos taxonômicos estão definidos no Dicionário Micológico Rickia (FIDALGO & FIDALGO, 1967).

6.2. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ESTERIGMATOCISTINA

6.2.1. Produção de Esterigmatocistina em Linhagens Haplóides

O meio de cultura utilizado para produção de ST foi o mesmo utilizado por HAJJAR *et alii* (1989): aveia Quaker em flocos dissolvida em água destilada, mas a quantidade de água no meio foi modificada para que o meio tivesse uma atividade de água (A_a) ótima para o desenvolvimento do *A. nidulans*. Dessa forma, foram adicionados 30 ml de água aos 10g de aveia, resultando numa $A_a = 0,930$.

A atividade de água do meio de aveia foi medida na Seção de Micologia do ICB/USP, através do aparelho Aqualab CX-2, da Decagon Devires Incorporation, a uma temperatura de 28°C.

Segundo TROLLER *et alii* (1984), a determinação da A_a de um substrato possibilita a avaliação da água disponível aos microrganismos, sendo um fator mais significativo na composição do substrato do que o conteúdo de umidade. LACEY (1988) afirma que a disponibilidade de água no substrato determina não somente quais microrganismos são capazes de desenvolver-se mas, também, a taxa de germinação de seus esporos, suas interações com outros fungos e habilidade em produzir metabólitos.

ESTEBAN *et alii* (1990) determinaram a A_a de 30 meios de cultura, sólidos e líquidos, utilizados em microbiologia de alimentos. Os valores de A_a variaram entre 0,999 a 0,739, sendo que o ágar não alterou significativamente os níveis de A_a dos meios sólidos.

Dados da WORLD Health Organization (1979) estabeleceram que a $A_a = 0,85$ é o menor valor de atividade de água onde o *A. flavus* consegue crescer e produzir aflatoxinas.

Sendo assim, o valor de A_a encontrado no meio de aveia estava dentro da faixa ideal para os aspergilos produzirem toxinas.

Então, as linhagens mutantes de *A. nidulans* UT448, UT196 e UT184 foram inoculadas em 40g de meio de aveia por 10 dias a 28°C.

Houve vigoroso crescimento, com micélio aéreo bem esporulado (Figura 12).

Como as condições para produção de micotoxinas diferem, sob alguns aspectos, das condições de trabalho para análises genéticas, foram necessárias algumas adaptações e/ou modificações das técnicas originais citadas, até se chegar a uma condição apropriada para se realizar um determinado experimento.

A linhagem de *A. nidulans* foi testada, inicialmente, a 25°C e a 37°C para produção de esterigmatocistina em meio de aveia.

A temperatura de 25°C é a ideal para produção de micotoxinas, mas, por outro lado, a temperatura ideal para o crescimento de *A. nidulans* é 37°C e esta deveria ser a temperatura usada ao longo do trabalho, uma vez que o *A. nidulans* será utilizado, em trabalhos futuros, como linhagem “cloning host” de genes *afl*⁺ para o estudo da via biossintética de aflatoxinas.

Um dos poucos trabalhos no Brasil que analisa geneticamente a produção de aflatoxinas em mutantes de *Aspergillus flavus* foi o de MESSIAS *et alii* (1977). Ele utilizou meio “YES” para crescimento do *A. flavus*, que foi incubado a 28°C por 7 dias.

Pesquisadores como FENG & LEONARD (1995) também utilizaram a temperatura de 28°C para extração de aflatoxina do *A. parasiticus*. Por outro lado, LIU & CHU (1998) verificaram que a temperatura de 37°C suprime a

produção da aflatoxina através da regulação da produção da proteína AFLR. A deficiência na produção da aflatoxina em *A. parasiticus* a 37°C ocorre por causa da inibição da transcrição de certos genes da via biossintética, como o gene *omtA*.

Tendo como base estes trabalhos clássicos citados acima, a temperatura de 28°C foi a escolhida para produção de ST e foi a que mostrou melhores resultados tanto para a produção de esterigmatocistina como para o crescimento das linhagens de *A. nidulans* em meio de aveia.

Com relação à extração de esterigmatocistina, a técnica mais utilizada mundialmente é a de LEE *et alii* (1976), que utiliza acetona aquosa e clorofórmio como solventes extratores e como solventes de corrida benzeno/ácido acético glacial (95 : 5, v/v). Esta técnica foi usada inicialmente neste trabalho para extração de esterigmatocistina das linhagens de *A. nidulans*. Os resultados desta técnica estão apresentados na **Figura 13**.

Esta corrida cromatográfica mostrou que:

- nenhum dos mutantes de *A. nidulans* produziu aflatoxinas;
- somente o mutante UT196 produziu ST, apresentando $R_f = 0,40$;
- o R_f da aflatoxina B₁ foi de 0,09, neste sistema de solventes utilizado;
- o meio de aveia se mostrou adequado para a produção de ST pelo *A. nidulans*.

As manchas não ficaram nitidamente separadas por causa desta técnica empregada, que não purifica as amostras, deixando-as com muitos pigmentos que interferem na leitura dos resultados.

Segundo COLLINS *et alii* (1990), o valor do R_f (razão de fluxo) pode variar de acordo com a espessura do adsorvente, eluentes usados, temperatura e outros fatores.

Por isso, foi testado um método desenvolvido por pesquisadoras da UNICAMP, conhecido como multimétodo (SOARES & RODRIGUEZ-

AMAYA, 1989) que extrai simultaneamente quatro micotoxinas, entre elas a ST. Este método vem sendo usado na rotina laboratorial, como método de referência, para extração de AF e ST, tanto no Instituto Adolfo Lutz como no Instituto de Ciências Biomédicas da USP. O sistema de solventes utilizado no multimétodo fez com que o Rf da ST, tanto do padrão quanto das amostras positivas, tivesse um valor maior ($R_f = 0,70$) em relação ao método de LEE *et alii* (1976), que foi praticamente a metade deste. A placa foi borrifada com cloreto de alumínio para confirmação da ST. Foi possível verificar que as linhagens mutantes UT448 e UT184 não produziram ST em contraste com a UT196, que mostrou-se produtora de 4 ppm (partes por milhão ou mg/kg) de ST.

O teste confirmatório para ST torna-se praticamente indispensável pelo fato desta toxina emitir uma cor escura (vermelho-tijolo), sob luz ultravioleta, dificultando a sua visualização quando em concentrações muito baixas. O aquecimento da placa com cloreto de alumínio transforma a ST em 1,3,8-trihidroxixantona, de fluorescência amarela intensa, facilitando muito a sua visualização.

Através dos métodos de extração química foi possível avaliar a produção de micotoxinas de cada uma das linhagens haplóides paternais deste trabalho.

6.2.2. Produção de Esterigmatocistina em Linhagens Diplóides

O fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* apresenta-se como organismo ideal para estudos de indução de crossing-over mitótico, pois possui genética bem conhecida e também apresenta, além do ciclo sexual, o ciclo parassexual, onde há formação de células diplóides, ocorrência de recombinação mitótica e posterior haploidização, sendo que as células recém-haploidizadas irão

expressar os rearranjos mitóticos ocorridos na fase diplóide (PONTECORVO *et alii*, 1953b; ROPER, 1952).

6.2.2.1. Diplóide UT448//UT196

As linhagens de *Aspergillus nidulans* UT196 (ST^+) e UT448 (ST^-) formaram heterocário em MM + 2% MC. Este heterocário em MM originou um diplóide, de crescimento vigoroso e de conídios verdes (**Figura 14**).

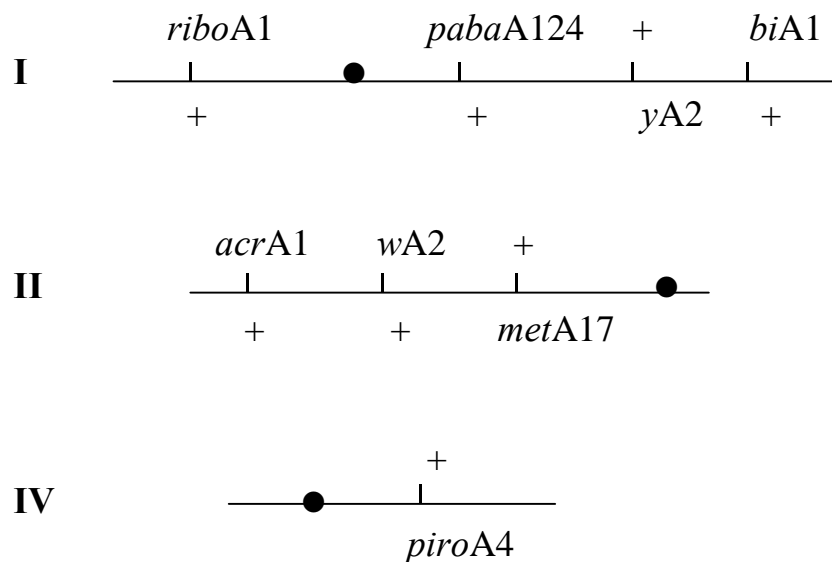


Figura 14 – Esquema do diplóide UT448//UT196. **Obs:** As distâncias entre os marcadores genéticos não estão em escala. Os pontos escuros e densos no esquema correspondem às posições relativas dos centrômeros.

Como estas linhagens são complementares para os marcadores de auxotrofia, o diplóide, resultante desse cruzamento, cresceu normalmente em MM. Então, foi possível isolar-se um diplóide UT448//UT196 de cor verde (w^+y^+) a partir do cruzamento entre estas duas linhagens (**Figura 15**).

O resultado qualitativo da cromatografia em camada delgada (**Figura 16**) revelou que o diplóide UT196//UT448 produziu mais do que o dobro da quantidade de esterigmatocistina expressa pela linhagem paternal UT196.

Este diplóide foi inoculado em meio de aveia para quantificação da produção de ST e foi extraído pelo multimétodo.

Quando a quantificação da toxina foi feita, verificou-se que ele produziu 40 ppm de ST.

O teste da cromatografia em camada delgada bidimensional também foi utilizado para confirmação da produção de ST (**Figura 17**).

Os solventes utilizados na 1^a corrida foram: benzeno/ácido acético glacial (95:5) e os da 2^a corrida foram: tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (60:40:0,5).

6.2.2.2. Diplóide UT448//UT184

Este diplóide mostrou-se adequado para uma completa análise mitótica via ciclo parassexual, pois possui marcadores em todos os oito grupos de ligação.

As linhagens deste diplóide são complementares para os marcadores de auxotrofia e ambas são individualmente não produtoras de ST (**Figura 18**).

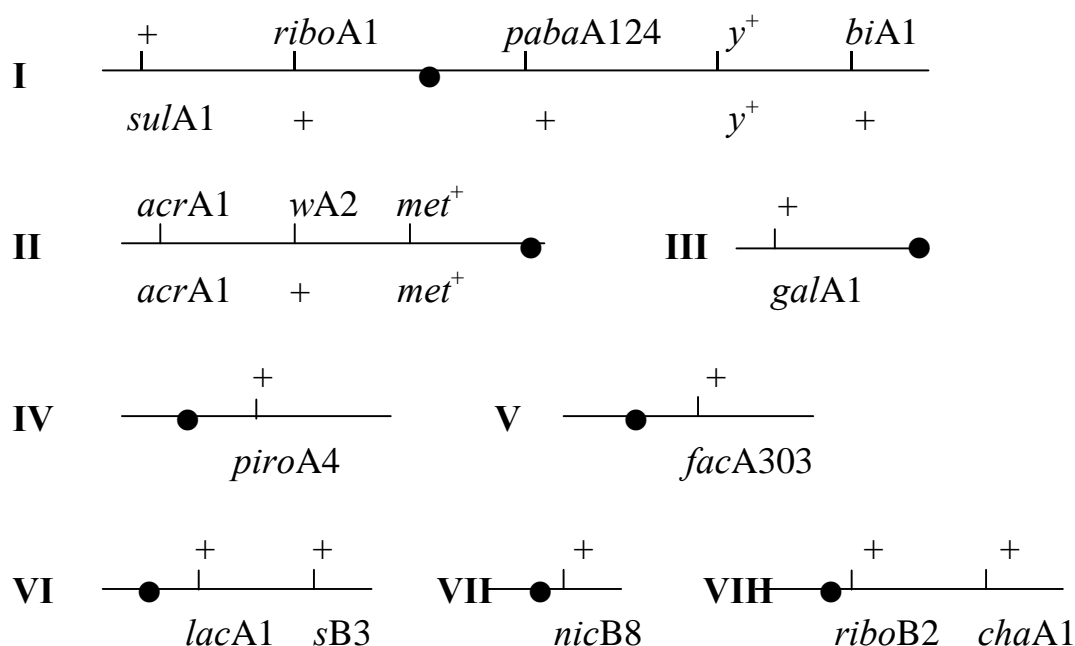


Figura 18 – Esquema do diplóide UT448//UT184.

Obs: As distâncias entre os marcadores genéticos não estão em escala. Os pontos escuros e densos no esquema correspondem às posições relativas dos centrômeros.

Após a extração de ST deste diplóide pelo multimétodo, procedeu-se a quantificação desta micotoxina, que foi de 40 ppm.

A partir deste diplóide foi feita a análise mitótica de 140 segregantes mitóticos, que foram obtidos através de haploidização espontânea em MC (ver item 6.3.2.) (**Figura 19**).

6.3. ANÁLISES GENÉTICAS

Como, nesta etapa do trabalho, houve a necessidade de se analisar um número bastante grande de recombinantes meióticos e mitóticos, seria quase impossível se fazer a extração química de cada um deles individualmente para avaliação da produção de AF e/ou ST. Daí surgiu a necessidade de um método

que fornecesse um resultado simples e rápido sobre a produção de micotoxinas e que pudesse ser usado para um número grande de amostras a cada análise. Sendo assim, foi feita uma adaptação da técnica descrita por PATERSON (1986), utilizada para metabólitos secundários de *Penicillium* spp. O método consistiu na retirada de “plugs” (amostras contendo micélio, conídios e meio de cultura), onde o fungo cresceu por um determinado período e na transferência destes para a superfície de uma placa cromatográfica para detecção da presença de metabólitos secundários. Esta é uma técnica básica e simples, cuja utilização para toxinas de aspergilos é inédita (DEZOTTI & ZUCCHI, in prep.).

Apesar de não ser muito sensível, esta nova técnica facilitou sobremaneira as análises genéticas que envolvem a produção de micotoxinas, servindo como ótimo “screening” de linhagens toxigênicas, sem a necessidade de utilização dos métodos convencionais de extração química, que são demorados e caros. Além disso, a sua aplicação fica restrita quase que somente a este tipo de análise genética, onde não importa a quantidade da toxina produzida, mas o fato de ser ou não produzida, caracterizando a expressão de um ou mais genes.

Os “plugs” foram recortados da superfície do meio de aveia após 7 dias a 28°C e foram levemente pressionados por 10 segundos na placa cromatográfica, até umedecerem a sílica (**Figura 20**).

As análises fenotípicas, genotípicas e de produção de micotoxinas forneceram um perfil fisiológico das linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho (**Tabelas 5 e 13**).

Como as linhagens UT448 e UT184, individualmente, eram não produtoras de ST e os diplóides envolvendo estas linhagens se mostraram altos produtores de ST, tornou-se necessária a verificação da produção desta micotoxina no heterocáριο das linhagens cruzadas. Então, tanto o heterocáριο

das linhagens cruzadas meioticamente (UT448 e UT196) como o heterocário das linhagens com cruzamento mitótico (UT448 e UT184) mostraram-se produtores de ST, indicando que estas 3 linhagens mutantes têm o(s) gene(s) para produção da micotoxina, mas que em duas linhagens estes genes encontram-se “silenciados” de alguma forma.

A partir de todos os resultados e observações obtidos até então, foi possível realizar análises genéticas que levassem ao mapeamento dos genes analisados.

Para isso, linhagens de *A. nidulans* produtoras e não produtoras de esterigmatocistina foram selecionadas para possibilitar cruzamentos, cujos procedimentos encontram-se descritos nos itens 6.3.1. e 6.3.2.

6.3.1. Análise Meiótica do Cruzamento UT448 x UT196

Segregantes meióticos do cruzamento UT196 (*stc*⁺) x UT448 (*stc*) foram analisados com a finalidade de se mapear o gene da esterigmatocistina (*stc*).

Neste cruzamento os marcadores dos grupos de ligação I, II e IV estão em heterozigose (ver **Tabela 4**).

Os genótipos das linhagens cruzadas são ➔ UT196 : *yA2* (I) conídios amarelos; *metA17* (II); *piroA4* (IV). UT448 : *wA2* (II) conídios brancos; *riboA1*, *pabaA124*, *biA1* (I); *acrA1* (II). Estas linhagens quando inoculadas em meios seletivos apresentam os genótipos da **Tabela 5**.

Tabela 5 – Genótipo das linhagens UT448 e UT196 relacionadas com a expressão da esterigmatocistina (ST).

Linhagens	Cor de							Expressão de ST
	conídios	<i>ribo</i>	<i>paba</i>	<i>bi</i>	<i>acr</i>	<i>met</i>	<i>piro</i>	
UT448	y^+w (B)	-	-	-	-	+	+	-
UT196	yw^+ (A)	+	+	+	+	-	-	+

Nota: **B** e **A** significam conídios brancos e amarelos, respectivamente; (+) e (-) indicam genótipos selvagem e mutante, respectivamente. *acr* (-) e *acr* (+) indicam resistência e sensibilidade a acriflavina, respectivamente. No caso de esterigmatocistina: (+) indica toxina produzida e (-) indica toxina não detectada pelo método utilizado.

Do heterocário foi selecionado um cleistotécio híbrido para análise dos ascosporos segregantes (**Figura 21**).

Foram semeadas alíquotas de diluições seriadas em MC para isolamento de cada um dos segregantes meióticos (item 4.2.5.3.).

Além de colônias amarelas ($y w^+$) e brancas (y^+w ; $y w$), semelhantes aos paternos, também foram encontradas colônias de cor verde (y^+w^+) como resultado da segregação meiótica.

No total, 175 colônias foram transferidas para 7 placas mestras contendo MC e incubadas por 3 dias a 37°C (**Figura 22**).

De um total de 175 segregantes meióticos, 92 eram brancos (y^+w ; $y w$), 45 verdes (y^+w^+) e 38 amarelos ($y w^+$).

Todos os 175 segregantes meióticos foram analisados em meio SM quanto aos requerimentos nutricionais e de resistência a antifúngico. Os marcadores de auxotrofia analisados foram: riboflavina (*ribo*); ácido *p*-aminobenzóico (*paba*); biotina (*bi*); metionina (*met*) e piridoxina (*piro*) e o marcador de resistência a antifúngico foi a acriflavina (*acr*). Outro marcador analisado nos segregantes obtidos desse cruzamento foi a produção de esterigmatocistina (**Tabela 6**).

Neste caso, a extração química para verificação da produção de ST, de cada um dos segregantes meióticos, tornaria este trabalho dispendioso e demandaria muito tempo. Por isso, o método do “plug” se mostrou adequado às nossas necessidades.

De acordo com metodologia descrita no item 4.2.4.6. cada um dos 175 segregantes meióticos foi testado para a produção de ST e os diferentes padrões de expressão da toxina estão documentados na [Figura 23](#).

A partir dos resultados obtidos, foram construídas as listas de genótipos como mostra a **Tabela 6**.

Tabela 6 – Listas de genótipos dos 175 segregantes meióticos do cruzamento UT448 x UT196 .

Conídios amarelos (yw^+)

<i>ribo</i>	<i>paba</i>	<i>bi</i>	<i>acr</i>	<i>met</i>	<i>piro</i>	<i>stc</i>	nº col.
+	+	+	R	-	+	+	3
+	+	+	S	-	-	+	8
+	+	+	S	-	-	+	1
-	+	+	R	-	-	-	1
+	+	-	S	-	-	+	1
+	+	-	S	-	+	+	1
+	+	+	R	-	-	+	4
-	-	+	S	-	+	-	2
+	+	+	S	-	+	+	4
+	+	+	S	-	+	+ i	1 i
+	+	+	S	+	+	+	1
-	+	+	R	-	+	-	1
-	-	+	R	-	-	-	2
+	-	+	S	-	+	+ i	1 i
-	+	+	S	-	+	-	2
-	+	+	S	-	-	-	5
Sub total							38

Conídios verdes (y^+w^+)

<i>ribo</i>	<i>paba</i>	<i>bi</i>	<i>acr</i>	<i>met</i>	<i>piro</i>	<i>stc</i>	n ^o col.
-	-	-	S	-	+	-	13
+	-	-	R	-	-	+ i	1 i
+	-	-	S	-	+	+	5
+	-	-	S	-	-	+	6
+	-	-	S	-	-	+ i	1 i
+	-	-	S	-	-	-	1
-	-	-	R	-	+	-	1
+	-	-	R	-	+	+	2
+	-	-	R	-	+	-	1
-	-	-	R	-	-	-	2
+	-	+	S	-	+	+	1
-	+	-	R	-	+	-	1
-	-	-	S	-	-	-	3
+	+	-	R	-	+	+	2
-	+	-	S	-	-	-	1
-	+	-	R	-	-	-	1
+	+	-	S	-	+	+	2
-	+	-	S	-	+	-	1
Sub total							45

Conídios brancos (y^2w)

<i>ribo</i>	<i>paba</i>	<i>bi</i>	<i>acr</i>	<i>met</i>	<i>piro</i>	<i>stc</i>	n ^o col.
+	-	+	R	+	+	+	3
+	-	+	R	+	+	+ i	1 i
+	-	+	R	+	+	-	1
+	+	-	R	+	-	+	4
+	-	+	R	+	-	+ i	2 i
+	-	+	R	+	-	+	1
-	+	+	R	+	-	-	6
+	+	+	S	+	+	+	2
+	+	+	S	+	+	+ i	1 i
-	-	-	S	+	-	-	5
-	-	-	S	+	+	-	1
+	-	-	R	+	+	+	2
+	-	-	R	+	+	+ i	4 i
-	-	-	R	+	-	-	3
-	-	-	R	+	-	+	1
-	-	-	R	+	+	-	6

-	-	+	S	+	+	-	2
+	+	+	R	+	+	+	7
+	+	+	R	+	-	+	5
+	+	+	R	+	-	-	1
-	-	+	R	+	-	+	1
+	-	-	R	+	-	+	4
+	-	-	R	+	-	+ i	2 i
+	+	-	S	+	+	+	3
-	+	+	R	+	+	-	2
+	-	-	S	+	-	+	2
+	-	-	S	+	-	+ i	1 i
-	-	+	R	+	+	-	2
-	+	+	S	+	-	-	2
+	-	+	S	-	+	+	1
-	+	-	R	+	+	-	1
+	+	+	S	+	-	+	7
-	-	+	S	+	-	-	1
-	+	-	R	+	-	-	1
+	+	-	S	+	-	+	1
+	-	-	S	+	+	+ i	2 i
+	+	-	R	+	+	+	1
Sub total							92
Total							175

Nota: (+) e (-) indica genótipos selvagem e mutante, respectivamente. *stc*⁺ e *stc* indicam produção de esterigmatocistina e não detecção de ST, respectivamente. *i* significa produção intermediária de ST. **S** e **R** indicam sensibilidade e resistência a acriflavina, respectivamente.

Os resultados da segregação meiótica dos grupos de ligação I, II e IV, mostrados na **Tabela 6**, foram organizados na **Tabela 7**, dispostos na forma de “quadrado latino”, de modo a evidenciar: **a)** a taxa de segregação alélica de todos os marcadores no cruzamento heterozigoto; **b)** a frequência de recombinação de cada gene combinado com todos os outros; **c)** a segregação total das classes recombinantes e paternas em cada intervalo cromossômico.

Tabela 7 – Análise meiótica do cruzamento UT448 x UT196. 175 colônias ascospóricas foram analisadas.

448																	
196	<i>ribo</i> +	<i>paba</i> +	+ <i>y</i>	<i>bi</i> +	<i>acr</i> +	<i>w</i> +	+ <i>met</i>	+ <i>piro</i>	<i>stc</i> +								
	+ 105	45 60	22 25	49 56	51 54	58 47	58 47	52 53	04 101								
	<i>ribo</i> 70	45 25	23 13	41 29	32 38	34 36	34 36	35 35	68 02								
	+ 70/175	85	08 33	21 64	40 44	44 41	45 40	36 49	26 59								
	<i>paba</i> 40,0%	90	37 05	69 21	42 48	48 42	47 43	51 39	46 44								
	<i>y</i> 35/83	13/83	38	02 36	11 27	0 38	01 37	16 22	13 25								
	+ 42,1%	15,6%	45	44 01	11 34	0 45	0 45	29 16	25 20								
	+ 78/175	42/175	03/83	85	43 42	48 37	48 37	38 47	30 55								
	<i>bi</i> 44,5%	24,0%	3,6%	90	40 50	44 46	44 46	49 41	42 48								
	+ 89/175	89/175	45/83	93/175	92	31 61	31 61	46 46	38 53								
	<i>acr</i> 50,8%	50,8%	54,2%	53,1%	83	61 22	61 22	41 42	33 50								
	+ 94/175	86/175	45/83	94/175	53/175	83	01 82	45 38	38 45								
	<i>w</i> 53,7%	49,1%	54,2%	53,7%	30,2%	92	91 01	42 50	34 58								
	+ 94/175	88/175	46/83	94/175	53/175	02/175	83	45 38	38 45								
	+ 53,7%	50,2%	55,4%	53,7%	30,2%	1,14%	92	42 50	34 58								
	<i>piro</i> 87/175	75/175	32/83	79/175	88/175	95/175	95/175	88	35 53								
	+ 49,7%	42,8%	38,5%	45,1%	50,2%	54,2%	54,2%	87	37 50								
	+ 06/175	70/175	33/83	78/175	89/175	96/175	96/175	85/175	103								
	<i>stc</i> 3,4%	40,0%	39,7%	44,5%	50,8%	54,8%	54,8%	48,5%	72								

No “quadrado latino”, o comportamento meiótico dos alelos mutantes e selvagens, de cada gene, foi comparado com os alelos dos outros genes. Além disso, as distâncias intergênicas e as relações de “linkage” foram dadas pelas frequências de recombinação (em %).

De acordo com os dados dispostos no “quadrado latino“ (**Tabela 7**), foi possível concluir que a segregação dos alelos mutantes e selvagens, da maioria dos genes analisados, apresentou razão de 1:1, indicando tratarem-se de genes

simples, com um padrão típico Mendeliano, com exceção dos genes *riboA* e *stc*.

Somente as colônias apresentando níveis de produção de ST similares ao do paternal UT196 foram consideradas *stc*⁺ (ou produtoras de ST). A ausência de esterigmatocistina, idêntica ao resultado do paternal UT448, foi considerada *stc* (não produtoras de ST).

Os resultados mostraram uma inter-relação no modo de segregação entre os genes *stc* e *ribo*.

Além disso, também foi observado que entre os segregantes *stc*⁺ haviam algumas colônias que mostraram uma mancha fraca na placa cromatográfica. Estas foram definidas como colônias de produção intermediária de ST (*stc*ⁱ). Estas colônias com produção intermediária de ST evidenciaram a existência de um possível fator de regulação na expressão do gene *stc*. A frequência dessas colônias de produção intermediária entre os 175 segregantes foi de 9,7% de colônias *stc*ⁱ (17 segregantes).

6.3.1.1. Quantificação da ST entre os Segregantes Meióticos com Produção Intermediária

Os 17 segregantes meióticos com produção intermediária de ST foram quantificados segundo metodologia descrita no item 4.2.4.5.

Os fenótipos, genótipos e a quantificação da ST de cada segregante constam na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Quantificação da ST entre os segregantes meióticos de produção intermediária.

Intermediários	Cor	Auxotrofias	“PLUGS”		MULTIMÉTODO	
			ST	P.V.	Quantificação de ST (ppm)	P.V.
1 ²	Branco	<i>paba ; acr</i>	Muito fraco	-	3,20	+
1 ³	Verde	<i>paba, bi ; acr, met ; piro</i>	Muito fraco	-	1,60	+
1 ⁹	Branco	<i>paba ; acr ; piro</i>	Fraco	Muito fraco	0,40	+
1 ¹² *	Branco	Prototrófico	Fraco	Fraco	4,00	+
1 ¹⁸	Branco	<i>paba, bi ; acr</i>	Muito fraco	Muito fraco	0,53	+
2 ¹	Branco	<i>paba, bi ; acr</i>	Fraco	-	0,80	+
3 ⁶ ♦	Branco	<i>paba, bi ; acr</i>	Fraco	-	4,40	+
3 ⁹	Branco	<i>paba, bi ; acr</i>	Fraco	-	0,64	+
4 ²⁵	Branco	<i>paba ; acr ; piro</i>	Muito fraco	-	0,08	-
5 ¹	Branco	<i>paba, bi ; acr ; piro</i>	Muito fraco	Muito fraco	0,53	+
5 ¹⁰	Branco	<i>paba, bi ; piro</i>	Muito fraco	+	1,06	+
5 ²⁵	Branco	<i>paba, bi ; acr ; piro</i>	Muito fraco	Muito fraco	0,80	+
6 ²	Verde	<i>paba, bi ; met ; piro</i>	Fraco	-	0,40	+
6 ⁷	Branco	<i>paba, bi</i>	Muito fraco	+	1,60	+
6 ¹⁷ *	Branco	<i>paba, bi</i>	Muito fraco	-	4,00	+
6 ¹⁸	Amarelo	<i>paba ; met</i>	Fraco	-	0,40	+
7 ¹⁴ *	Amarelo	<i>met</i>	Fraco	Fraco	4,00	+
Controle UT 196	Amarelo	<i>met ; piro</i>	+	+	4,00	+

Nota: P.V. (pigmento vermelho): (+) produção do metabólito e (-) metabólito não detectável pelo método utilizado. (*) produção de ST igual à do paternal UT196; (♦) produção de ST acima da do paternal UT196; ppm : partes por milhão ou mg/kg.

O método de “plugs” foi usado para selecionar os segregantes produtores e não produtores de ST de modo rápido. Este método revelou a presença não só de ST como também de um pigmento vermelho (P.V.), de $R_f = 0,10$ (Figura 23). Quando um segregante produzia ST, esse pigmento vermelho também era produzido, na grande maioria das vezes. O que não ocorreu foi a presença do pigmento vermelho sem a presença da ST.

Quando foi utilizado o método de extração química, esse pigmento vermelho passou a apresentar $R_f = 0,90$. Com isso, fica claro que este pigmento não pode corresponder ao ácido norsolorínico (NOR), já que este último apresenta R_f de 0,72. O NOR, na cromatoplaça, apresentou-se como uma mancha avermelhada logo acima da ST e o pigmento vermelho mostrou-

se visível na cromatoplaça à luz normal, mesmo sem a utilização do revelador AlCl_3 .

As linhagens mutantes UT448, UT184 e UT196, independente da expressão de ST, foram todas produtoras desse pigmento vermelho que, muito provavelmente, pode corresponder a um produto do metabolismo secundário de origem policetônica produzido pelo ascosporo do fungo como, por exemplo, a ascoquinona A, caracterizada por BROWN & SALVO em 1994 ou um produto semelhante.

Com relação à quantificação dos produtores intermediários de ST, foi evidente a ação do mecanismo de regulação gênica atuando nesses intermediários.

Na **Tabela 8** foi possível confirmar que dos 17 produtores intermediários detectados pelo método do “plug”, 3 apresentaram produção de ST igual à do paternal UT196 (4 ppm) e um segregante apresentou produção de ST acima de 4 ppm. Isto os excluiu da classe intermediária de produção de ST.

O fenótipo definitivo para a expressão intermediária de ST foi dado pelo multimétodo. Dessa forma, 13 segregantes meióticos confirmaram nitidamente sua produção intermediária de ST.

6.3.1.2. Mapeamento do Gene *stcZ*⁺

Excluindo-se a população de 13 produtores intermediários de ST, entre os 162 segregantes meióticos restantes, a segregação foi 1 *stc*⁺ : 1 *stc* (**Tabela 9**).

Tabela 9 – Análise meiótica do cruzamento UT448 x UT196, com destaque para a produção intermediária de ST (dados já apresentados na **Tabela 7**).

448																		<i>stc</i> ⁱ
196	<i>ribo</i> +	<i>paba</i> +	+ <i>y</i>	<i>bi</i> +	<i>acr</i> +	<i>w</i> +	+ <i>met</i>	+ <i>piro</i>	<i>stc</i>									
	105	45 60	22 25	49 56	51 54	58 47	58 47	52 53	04 13	8								
<i>ribo</i>	70	45 25	23 13	41 29	32 38	34 36	34 36	35 35	68 0	0								
	70/175	85	08 33	21 64	41 44	44 41	45 40	36 49	26 0	5								
<i>paba</i>	40,0%	90	37 05	69 21	42 48	48 42	47 43	51 39	46 13	3								
<i>y</i>	35/83	13/83	38	02 36	11 27	0 38	01 37	16 22	13 1	2								
	42,1%	15,6%	45	44 01	11 34	0 45	0 45	29 16	25 2	1								
	78/175	42/175	03/83	85	43 42	48 37	48 37	38 47	30 4	5								
<i>bi</i>	44,5%	24,0%	3,6%	90	40 50	44 46	44 46	49 41	42 9	3								
	89/175	89/175	45/83	93/175	92	31 61	31 61	46 46	39 4	4								
<i>acr</i>	50,8%	50,8%	54,2%	53,1%	83	61 22	61 22	41 42	33 9	4								
	94/175	86/175	45/83	94/175	53/175	83	01 82	45 38	38 3	4								
<i>w</i>	53,7%	49,1%	54,2%	53,7%	30,2%	92	91 01	42 50	34 10	4								
<i>met</i>	94/175	88/175	46/83	94/175	53/175	02/175	83	45 38	38 3	4								
	53,7%	50,2%	55,4%	53,7%	30,2%	1,14%	92	42 50	34 10	4								
<i>piro</i>	87/175	75/175	32/83	79/175	88/175	95/175	95/175	88	35 7	4								
	49,7%	42,8%	38,5%	45,1%	50,2%	54,2%	54,2%	87	37 6	4								
<i>stc</i> ⁱ →	06/162	57/162	31/80	69/162	80/162	86/162	86/162	79/162		9								
<i>stc</i>	3,7%	35,1%	38,7%	42,6%	49,3%	53,0%	53,0%	48,7%	72	13								

Como este gene está sendo mostrado no cromossomo I de *A. nidulans* pela primeira vez, ele recebeu a designação de *stcZ*, considerando-se que 24 transcritos de *stc* (de *stcA* até *stcX*) já foram descritos por BROWN *et alii* (1996).

A nomenclatura deste gene seguiu as normas de nomenclatura genética descritas por CLUTTERBUCK (1993).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 9, a localização do gene *stcZ*⁺ foi determinada no braço esquerdo do cromossomo I, 4% distante do gene *ribo*⁺ na linhagem UT196 (Diagrama 1). Este gene é, muito

provavelmente, um gene estrutural. A posição dos outros marcadores genéticos estão de acordo com aqueles apresentados no mapa do *A. nidulans* (Tabela 4).

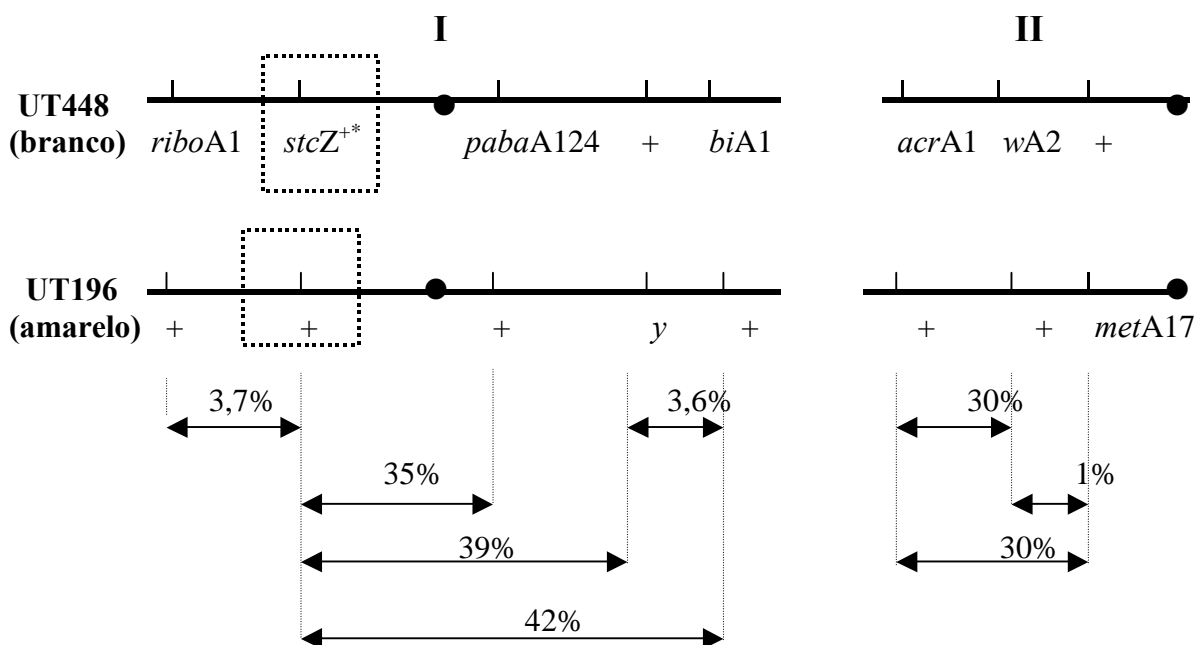


Diagrama 1 – Localização do gene *stcZ*⁺ em *A. nidulans*.

Nota: (*) significa que o gene não é mutante verdadeiro, mas provavelmente, esteja silenciado por pesada metilação (vide texto). O gene *stcZ* foi mapeado no braço esquerdo do cromossomo I; as distâncias genéticas correspondem às frequências de recombinação obtidas a partir do cruzamento UT448 x UT196. 175 colônias ascospóricas foram analisadas.

6.3.1.3. Relações entre o Gene *stcZ*⁺ e o Intervalo *w-met* do Cromossomo II

De acordo com os dados da Tabela 9 e com os genótipos apresentados na Tabela 6, 13 colônias *stcZ*ⁱ apresentaram baixa produção de ST.

Quando se exclui os *stcZ*ⁱ, a taxa de segregação alélica de *stc*⁺ : *stc* retorna à segregação esperada para gene simples (1:1).

Observando-se simultaneamente 3 genes *ribo*, *paba* e *w* e relacionando-os à produção intermediária de ST, verifica-se na Tabela 10 que todos os *stcZ*ⁱ são *ribo*⁺. Isto mostra que o gene *stc* está intimamente ligado ao gene *ribo*⁺ do

cromossomo I da linhagem UT196. As frequências de recombinação de *stc* a *paba* e *bi* (**Tabela 9**) confirmam a sua localização no braço esquerdo do cromossomo I. O alelo mutante *wA* (da linhagem UT448) parece estar relacionado à produção intermediária de ST. Todas as colônias brancas (*w*), *stcZⁱ* são também *ribo⁺ paba*. Uma vez que *w* é um gene da linhagem UT448, parece que um fator próximo da mutação *wA2* é capaz de controlar o nível da produção de esterigmatocistina. Este controle pode variar quando há diferentes sítios de “crossing-over” entre *ribo* e *paba*. Na configuração paternal *ribo⁺ stc⁺ paba⁺ / w⁺*, onde não ocorreu “crossing-over”, a expressão de *stcZ⁺* foi normal (28 colônias). Já na configuração *ribo⁺ stc paba / w*, onde ocorreu “crossing-over” entre *ribo* e *paba*, a expressão de *stcZ⁺* foi nula (uma colônia) ou intermediária (10 colônias) (**Tabelas 6, 10 e Figura 24**).

Tabela 10 – Segregantes meióticos, produtores intermediários de ST, relacionados à presença dos genes *ribo*, *paba* e *w* das linhagens UT448 e UT196 (dados da **Tabela 6**).

	<i>w⁺</i>	<i>w</i>	Total parcial	Total
<i>stcZⁱ</i> {	<i>ribo⁺</i>	3	10	13
	<i>ribo</i>	0	0	
<i>stcZⁱ</i> {	<i>paba⁺</i>	0	0	13
	<i>paba</i>	3	10	

Os dados mostrados na **Tabela 10** foram ilustrados na **Figura 24**.

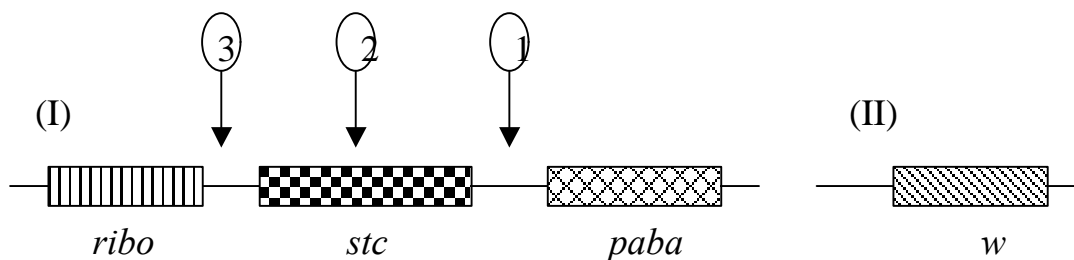


Figura 24 – Representação esquemática dos dados contidos na **Tabela 10**.

Nota: As setas indicam três diferentes sítios de “crossing-over” que podem ter ocorrido entre os paternais, resultando nas seguintes classes fenotípicas:

1- $ribo^+ stcZ^+ paba / w = 15$ colônias

2- $ribo^+ stcZ^i paba / w = 10$ colônias

3- $ribo^+ stcZ^{+*} paba / w =$ uma colônia

(*) gene provavelmente silenciado (ver texto).

6.3.1.4. Hipóteses da Metilação

A segregação correta dos alelos de *stc* (1+ : 1-), depois de feita a correção das distorções promovidas pela classe dos intermediários, sugere que ele seja um gene estrutural e que as classes intermediárias são resultado do mecanismo de regulação (**Tabela 9**). O fator próximo da mutação *wA2* do cromossomo II da linhagem UT448, é capaz de silenciar completamente o gene stc^+ (resultando em segregantes *stc*) ou, quando não consegue silenciar completamente o gene stc^+ , expressa o caráter ST^i , principalmente se houver ocorrência de “crossing-over” entre *ribo* e *paba* (**Tabelas 9 e 10**).

Um mecanismo bem conhecido e que pode afetar a expressão de um gene de modo temporário é o silenciamento por metilação, que ocorre muito comumente na maioria dos organismos eucariotos. Desse modo, é possível que

o gene $stcZ^+$ não seja capaz de expressar ST (representado por $stcZ^{+*}$) nas linhagens UT448 e UT184. Assim, estas linhagens não seriam portadoras de mutação stc , mas sim portadoras do gene $stcZ^+$ silenciado (ou $stcZ^{+*}$).

Se isso for verdadeiro, “reversões” freqüentes ($stc^+ \rightleftharpoons stc$) poderiam ocorrer espontaneamente ou serem induzidas durante as divisões celulares mitótica e/ou meiótica. Estes mecanismos são conhecidos pelas siglas RIP em *Neurospora crassa* (SELKER & GARRETT, 1988), MIP em *Ascobolus immersus* (FAUGERON *et alii*, 1990), GIS em *Aspergillus nidulans* (CASTRO-PRADO & ZUCCHI, 1996) e RIGS em plantas (MATZKE *et alii*, 1994; MATZKE & MATZKE, 1995).

A nossa hipótese para explicar este comportamento baseia-se no fato de que os segregantes com expressão intermediária de ST só ocorrem na meiose e dependem da presença do gene w .

A partir dos resultados das **Tabelas 6 e 7**, é possível se especular que o fator genético, supostamente presente no cromossomo II, reprime a expressão do gene $stcZ^+$, na linhagem UT448. Esta repressão pode ser feita por vários mecanismos, mas acreditamos que seja pela síntese de uma proteína repressora (R) que, ao se complexar com o DNA (gene $stcZ^+$), impede a sua transcrição e, conseqüentemente, não há produção de ST pela linhagem UT448 (**Diagrama 2a**).

A linhagem UT196 não apresenta silenciamento do gene $stcZ^+$ uma vez que ele é bem expresso nesta linhagem haplóide. Pode-se hipotetizar que em UT196, o fator regulatório (R), presente no cromossomo II, tenha a sua expressão silenciada por estar hipermetilado. A ausência da proteína repressora faz UT196 expressar constitutivamente a esterigmatocistina. Este fator alterado no cromossomo II de UT196 foi designado por R^- (**Diagrama 2a**). Evidências disto foram apresentadas nas **Tabelas 6 e 7**, onde todos os segregantes $stcZ^+$

são *ribo*⁺ e todos os *ribo* são *stcZ*; na **Tabela 10**, todos os *stcZ*ⁱ são *ribo*⁺ *paba* e, finalmente, 77% dos segregantes *stcZ*ⁱ são *w*.

Já no caso de expressão intermediária (STⁱ) entre segregantes *ribo*⁺ *paba* (que sofreram “crossing-over” entre *ribo* e *paba*), verifica-se que este fenótipo intermediário só acontece quando o intervalo *w met*⁺ do cromossomo II segrega junto com *ribo*⁺ *paba*, entre aqueles segregantes. Este intervalo é da linhagem UT448 e contém o fator R⁺ (repressor normal), mas a seqüência de *stcZ*⁺ é da linhagem UT196. Isto deve dificultar o reconhecimento da seqüência do DNA de UT196 pelo repressor da linhagem UT448. Daí a possibilidade de expressão reduzida da proteína esterigmatocistina (ver **Figura 24**). Assim, a baixa especificidade do repressor de UT448 (R⁺) pela seqüência de UT196 (*stc*⁺) é responsável pela produção intermediária de ST (**Diagrama 2b**).

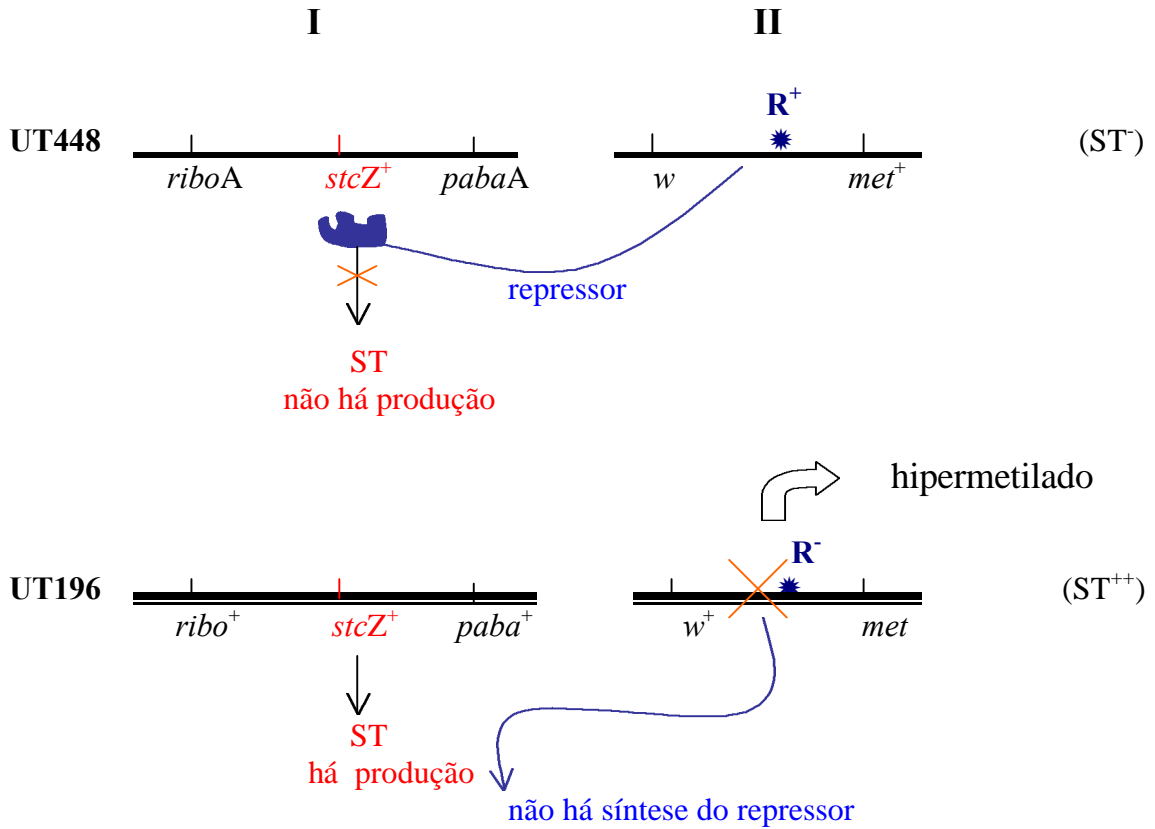
A atividade de silenciamento do cromossomo II deve ser muito estável e forte, mas é possível anular esta pesada metilação e liberar o gene *stcZ*⁺ de maneira que ele possa se expressar. Recentemente, em nosso laboratório, conseguimos a reativação da expressão do gene *stcZ*⁺ da linhagem UT448 por indução com material biológico. Isto indica que o gene *stcZ* estava silenciado por pesada metilação, mas que ao ser desmetilado, passou a expressar ST. Este achado confirma o modelo proposto de regulação por metilação (ZUCCHI *et alii*, *in prep.*)

O processo meiótico também é estressante o suficiente para disparar o mecanismo de metilação do DNA (*in* BESTOR & TYCKO, 1996).

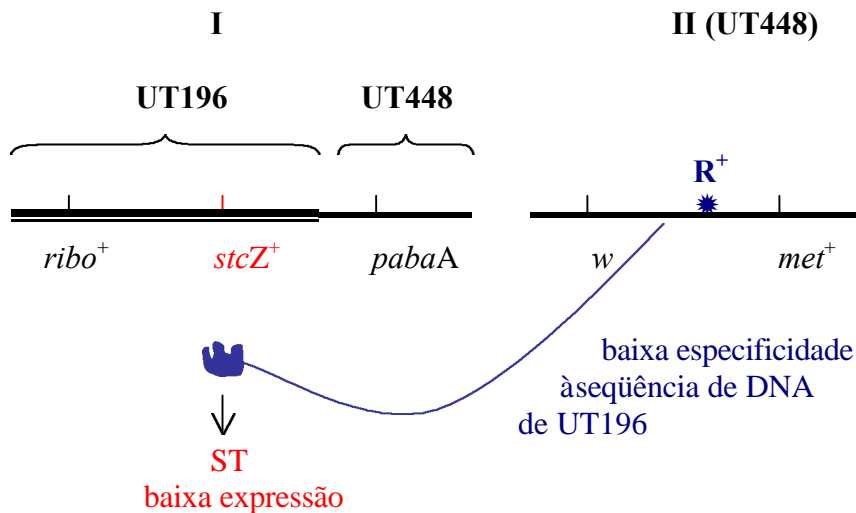
O modelo de metilação aplicado à regulação da expressão de esterigmatocistina pode ser utilizado para explicar porque algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* são produtoras de ST e outras não, sem nenhuma mutação verdadeira envolvida.

Diagrama 2. Modelo provisório de regulação do gene *stcZ*⁺ em linhagens haplóides, baseado na hipótese da metilação do DNA (por ZUCCHI, *in prep.*)

a) Linhagens haplóides



b) Produção intermediária de esterigmatocistina. Segregante meiótico de UT448 x UT196 (ST⁺)



6.3.1.5. Verificação da Metilação

Para se verificar o estado de metilação de alguns segregantes meióticos de UT448 x UT196, não produtores de ST, foi utilizado o agente desmetilante 5-azacitidina. Com isso, esperávamos obter uma mudança no padrão de metilação desses segregantes, caso o gene *stcZ*⁺ estivesse silenciado por metilação.

Os genótipos dos 25 segregantes meióticos selecionados constam na **Tabela 11**.

Tabela 11 – Genótipos dos 25 segregantes meióticos, do cruzamento UT448 x UT196, selecionados para o tratamento com 5-azacitidina.

Segregantes	Cor de conídios	<i>ribo</i>	<i>paba</i>	<i>bi</i>	<i>acr</i>	<i>met</i>	<i>piro</i>	<i>stcZ</i>
1 ¹	<i>y</i> ⁺ <i>w</i> ⁺ (V)	-	-	-	S	-	+	-
1 ⁸	<i>yw</i> ⁺ (A)	-	+	+	S	-	-	-
1 ¹⁴	<i>y</i> [?] <i>w</i> (B)	-	-	-	S	+	-	-
2 ⁶	<i>yw</i> ⁺ (A)	-	+	+	R	-	-	-
2 ⁹	<i>y</i> [?] <i>w</i> (B)	-	+	+	R	+	-	-
2 ²²	<i>y</i> ⁺ <i>w</i> ⁺ (V)	-	-	-	R	-	+	-
3 ³	<i>yw</i> ⁺ (A)	-	-	+	S	-	+	-
3 ⁵	<i>y</i> ⁺ <i>w</i> ⁺ (V)	-	-	-	R	-	-	-
3 ²⁵	<i>y</i> [?] <i>w</i> (B)	-	+	+	R	+	+	-
4 ¹⁰	<i>yw</i> ⁺ (A)	-	+	+	S	-	-	-
4 ¹¹	<i>y</i> [?] <i>w</i> (B)	-	+	-	R	+	-	-
4 ¹⁷	<i>y</i> ⁺ <i>w</i> ⁺ (V)	-	-	-	S	-	+	-
5 ⁹	<i>yw</i> ⁺ (A)	-	+	+	R	-	+	-
5 ¹⁹	<i>y</i> ⁺ <i>w</i> ⁺ (V)	-	+	-	R	-	-	-
5 ²⁰	<i>y</i> [?] <i>w</i> (B)	-	-	-	R	+	+	-
6 ¹	<i>yw</i> ⁺ (A)	-	-	+	R	-	-	-
6 ¹⁰	<i>y</i> [?] <i>w</i> (B)	-	-	-	R	+	-	-
6 ²⁴	<i>y</i> ⁺ <i>w</i> ⁺ (V)	-	-	-	S	-	-	-
7 ⁹	<i>yw</i> ⁺ (A)	-	+	+	S	-	+	-
7 ¹³	<i>y</i> ⁺ <i>w</i> ⁺ (V)	-	-	-	R	-	-	-

7 ¹⁷	y [?] w (B)	-	-	+	R	+	+	-
2 ¹⁸	y ⁺ w ⁺ (V)	+	-	-	S	-	-	-
3 ¹⁶	y ⁺ w ⁺ (V)	+	-	-	R	-	+	-
3 ²¹	y [?] w (B)	+	-	+	R	+	+	-
5 ²	y [?] w (B)	+	+	+	R	+	-	-
Controle UT196	yw ⁺ (A)	+	+	+	S	-	-	+

Nota: **B**, **A** e **V** significam conídios brancos, amarelos e verdes; (+) e (-) indicam genótipos selvagem e mutante, respectivamente; **R** e **S** indicam resistência e sensibilidade a acriflavina, respectivamente. No caso da **ST** (gene **stcZ**): (+) indica toxina produzida e (-) indica toxina não detectada pelo método utilizado. Os segregantes são discriminados de acordo com as colônias de cada placa mestra (por exemplo: 1⁸ → placa mestra 1, colônia 8).

Após incubação destes segregantes com 5-azacitidina, alguns revelaram mudanças nas auxotrofias, como mostra a **Tabela 12**.

Tabela 12 – Genótipos dos 25 segregantes meióticos pós-tratamento com 5-azacitidina.

Segregantes	Cor de conídios	<i>ribo</i>	<i>paba</i>	<i>bi</i>	<i>acr</i>	<i>met</i>	<i>piro</i>	<i>stcZ</i>
1 ¹	y ⁺ w ⁺ (V)	-	-	-	S	-	+	-
1 ⁸	yw ⁺ (A)	-	+	+	S	-	-	-
1 ¹⁴	y [?] w (B)	-	-	-	S	+	-	-
2 ⁶	yw ⁺ (A)	-	+	+	R	-	-	-
2 ⁹	y [?] w (B)	-	+	+	R	+	-	-
2 ²²	y ⁺ w ⁺ (V)	-	-	-	R	-	+	-
3 ³	yw ⁺ (A)	-	-	+	S	-	+	-
3 ⁵	y ⁺ w ⁺ (V)	-	-	-	R	-	-	-
3 ²⁵	y [?] w (B)	-	+	+	R	+	+	-
4 ¹⁰	yw ⁺ (A)	-	+	+	S	-	-	-
4 ¹¹	y [?] w (B)	-	+	-	R	+	-	-
4 ¹⁷	y ⁺ w ⁺ (V)	-	-	-	S	-	+	-
5 ⁹	yw ⁺ (A)	-	+	+	R	-	+	-
5 ¹⁹	y ⁺ w ⁺ (V)	-	+	-	R	-	-	-
5 ²⁰	y [?] w (B)	-	-	-	R	+	+	-

6 ¹	yw ⁺ (A)	-	-	+	R	-	-	-
6 ¹⁰	y [?] w (B)	-	⊕	⊕	R	+	-	-
6 ²⁴	y ⁺ w ⁺ (V)	-	-	-	S	-	-	-
7 ⁹	yw ⁺ (A)	-	+	+	S	-	+	-
7 ¹³	y ⁺ w ⁺ (V)	-	⊕	-	R	-	⊕	-
7 ¹⁷	y [?] w (B)	-	-	+	R	+	+	-
2 ¹⁸	y ⁺ w ⁺ (V)	+	-	-	S	-	-	-
3 ¹⁶	y ⁺ w ⁺ (V)	⊖	-	-	R	-	⊖	-
3 ²¹	y [?] w (B)	+	-	+	R	+	+	-
5 ²	y [?] w (B)	⊖	+	+	R	+	-	-
Controle UT196	yw ⁺ (A)	+	+	+	S	-	-	+

Nota: Os segregantes e suas respectivas auxotrofas marcadas com um círculo evidenciam a ação desmetilante da 5-azacitidina.

Embora 4 segregantes apresentassem mudanças na expressão de alguns genes devido à ação da 5-azacitidina, evidenciando alterações de metilação do DNA, não houve mudança no padrão de expressão da ST de nenhum segregante meiótico.

No entanto, este experimento não pode ser considerado conclusivo, uma vez que a amostragem foi muito pequena. Outros experimentos envolvendo um número muito maior de segregantes meióticos deverão ser executados. Cada segregante meiótico deverá ser testado para se verificar qual a frequência de “reversão” para cada gene estudado.

6.3.2. Análise Mitótica de UT448//UT184

No cruzamento mitótico, as linhagens UT448 e UT184 quando inoculadas em SM apresentam os seguintes genótipos da **Tabela 13**.

Tabela 13 – Genótipos das linhagens UT448 e UT184 relacionadas com a expressão da esterigmatocistina (ST).

Linha- gens	Cor	<i>ribo</i>	<i>paba</i>	<i>bi</i>	<i>acr</i>	<i>gal</i>	<i>piro</i>	<i>fac</i>	<i>lac</i>	<i>s</i>	<i>nic</i>	Expressão de ST
UT448	y^+wcha^+ branco	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
UT184	y^+w^+cha chartreuse	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: (+) e (-) indicam genótipos selvagem e mutante, respectivamente; **acr** (-) indica resistência a acriflavina. No caso de **ST**: (-) indica toxina não detectada pelo método utilizado.

Nesta análise mitótica, 140 segregantes foram analisados a partir de 6 placas mestras contendo MC (**Figura 25**). Desse modo, foram analisados 101 segregantes mitóticos brancos (y^+wcha^+), 25 chartreuse (y^+w^+cha) e 14 verdes ($y^+w^+cha^+$).

A hipótese de que o gene *stc* poderia estar fortemente regulado nas linhagens UT448 e UT184 se fundamenta na observação de que ambas as linhagens haplóides foram incapazes de produzir ST independentemente. Mas, quando na condição diplóide (UT448//UT184), a produção de ST se mostrou muito alta (40 ppm). Resultados similares foram encontrados por WOLOSHUK *et alii* (1989) em *Aspergillus flavus*, quando diplóides prototróficos produziram uma quantidade de aflatoxina 300 vezes maior do que as linhagens haplóides. Esta alta produção do diplóide ocorreu mesmo quando envolvia linhagens não produtoras de aflatoxina (*afl*). Isto indica que alguns alelos *afl* podem ser complementados no núcleo diplóide.

Este foi o melhor indício de que o gene tipo selvagem *stcZ*⁺ estava silenciado (ou reprimido) em ambas as linhagens UT448 e UT184 por metilação do gene estrutural *stcZ*⁺ afetando a produção de esterigmatocistina.

A análise mitótica é importante para se mapear os genes regulatórios. Na análise meiótica previamente mencionada, um fator regulador no cromossomo II da linhagem UT448 foi evidenciado e localizado no intervalo *w-met*.

A análise genotípica dos 140 segregantes mitóticos do diplóide UT448//UT184 foi apresentada na **Tabela 14**.

Tabela 14 – Listas de genótipos dos 140 segregantes mitóticos do diplóide UT448//UT184.

Conídios verdes ($y^+w^+cha^+$)

<i>ribo</i>	<i>paba</i>	<i>bi</i>	<i>piro</i>	<i>lac</i>	<i>s</i>	<i>nic</i>	<i>stcZ</i>	n ^o . col.
-	-	-	+	-	-	-	-	5
-	-	-	-	-	+	-	-	1
+	+	+	+	+	+	-	+	4
-	-	-	+	+	+	-	-	1
+	+	+	-	+	+	-	+	1
+	+	+	+	+	-	+	+	1
-	-	-	-	-	-	-	-	1
Sub total								14

Conídios chartreuse (y^+w^+cha)

<i>ribo</i>	<i>paba</i>	<i>bi</i>	<i>piro</i>	<i>lac</i>	<i>s</i>	<i>nic</i>	<i>stcZ</i>	n ^o . col.
-	+	+	+	+	+	-	-	2
+	+	+	+	+	+	+	+	5
-	-	-	+	+	+	-	-	2
-	-	-	+	-	-	-	-	3
-	+	+	+	+	+	+	-	8
-	+	+	-	+	-	+	-	1
-	+	+	+	-	-	-	-	1
-	+	+	+	+	+	-	-	1
-	+	+	+	+	-	+	-	1
-	+	+	-	-	-	-	-	1
Sub total								25

Conídios brancos (y^+wcha^+)

<i>ribo</i>	<i>paba</i>	<i>bi</i>	<i>piro</i>	<i>lac</i>	<i>s</i>	<i>nic</i>	<i>stcZ</i>	n ^o . col.
-	-	-	-	-	-	-	-	11
-	-	-	-	+	+	+	-	3
-	+	+	+	+	+	+	-	2
-	+	+	+	+	+	-	-	1
-	-	-	+	-	-	-	-	14
-	-	-	+	+	+	-	-	2
-	-	-	+	-	+	-	-	9
+	+	+	-	-	-	+	+	1
-	-	-	+	+	+	+	-	4
+	+	+	-	+	+	-	+	3
+	-	-	+	-	-	-	-	1
-	+	+	+	-	-	+	-	2
-	+	+	-	-	+	-	-	5
+	+	+	-	-	-	-	+	6
-	+	+	+	+	+	-	-	6
-	-	-	-	-	+	-	-	2
+	+	+	+	+	+	+	+	11
-	-	-	-	+	+	-	-	2
-	-	-	-	-	-	+	-	1
+	+	+	+	-	-	-	+	2
+	+	+	-	+	+	+	+	1
-	+	+	+	-	+	-	-	4
-	-	-	-	-	+	+	-	2
-	-	-	-	+	-	-	-	1
+	+	+	+	-	-	+	+	1
-	-	-	+	+	-	-	-	1
+	+	+	+	+	-	+	+	2
+	+	+	+	+	+	-	+	1
Sub total								101
Total								140

Nota: (+) e (-) indicam genótipos selvagem e mutante, respectivamente. *stcZ*⁺ e *stcZ* indicam produção de esterigmatocistina e não detecção de ST, respectivamente.

A segregação alélica da maioria dos marcadores genéticos encontra-se de acordo com o esperado para genes simples numa segregação Mendeliana

1:1, mas, os genes *ribo*, *w* e *stc* mostraram índices de segregação alélica similares, apresentando idênticas distorções em seus índices, a saber: 100:40, 101:39 e 101:39, respectivamente (**Tabela 15**). Isto confirma novamente os dados da análise meiótica que já havia sugerido as inter-relações entre estes genes.

Tabela 15 – Análise mitótica do diplóide UT448//UT184. Número de segregantes analisados: 140.

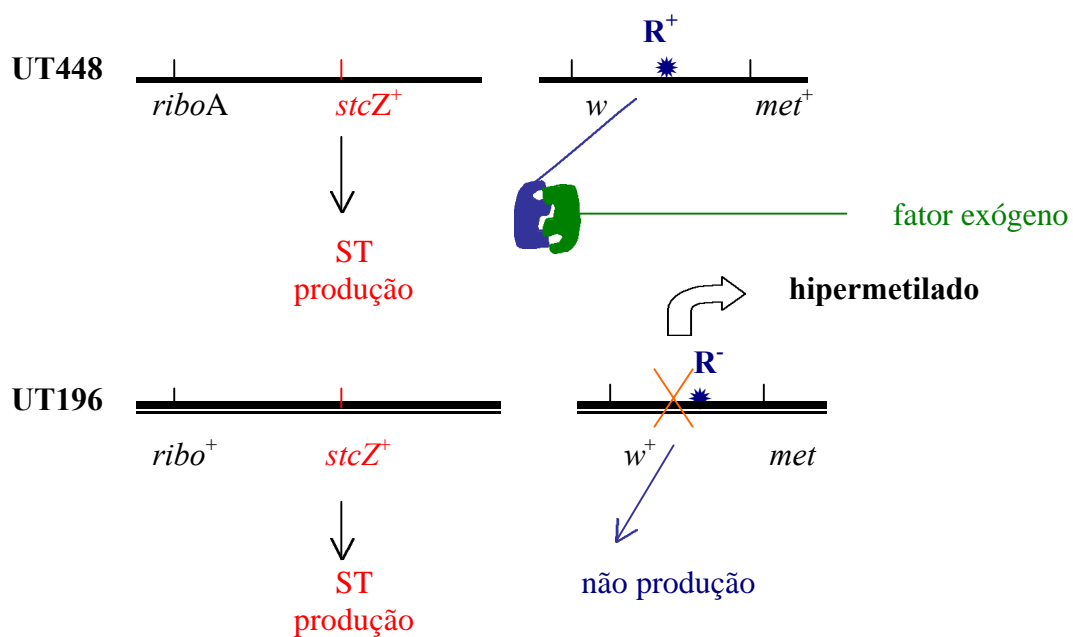
448																		
184	<i>ribo</i> +	<i>paba</i> +	<i>bi</i> +	<i>w</i> +	<i>piro</i> +	<i>lac</i> +	<i>s</i> +	<i>nic</i> +	<i>stc</i> +									
	40	1 39	1 39	29 11	28 12	29 11	26 14	22 18	1 39									
<i>ribo</i>	100	65 35	65 35	72 28	69 31	38 62	57 43	24 76	100 0									
	36/140	74	0 74	48 26	55 19	51 23	55 19	36 38	35 39									
<i>paba</i>	25,7%	66	66 0	53 13	42 24	16 50	28 38	10 56	66 0									
	36/140	0/140	74	48 26	55 19	51 23	55 19	36 38	35 39									
<i>bi</i>	25,7%	0,0%	66	53 13	43 23	16 50	28 38	10 56	66 0									
	57/140	61/140	61/140	39	34 5	27 12	25 14	16 23	28 11									
<i>w</i>	40,7%	43,5%	43,5%	101	63 38	40 61	58 43	30 71	73 28									
<i>piro</i>	39/140	79/140	78/140	72/140	43	12 31	20 23	9 34	31 12									
	42,1%	56,4%	55,7%	51,4%	97	55 42	63 34	37 60	70 27									
<i>lac</i>	91/140	101/140	101/140	88/140	54/140	73	23 50	7 66	63 10									
	65,0%	72,1%	72,1%	62,8%	38,5%	67	60 7	39 28	38 29									
<i>s</i>	69/140	93/140	93/140	68/140	54/140	30/140	57	10 47	44 13									
	49,2%	66,4%	66,4%	48,5%	38,5%	21,4%	83	36 47	57 26									
<i>nic</i>	98/140	92/140	92/140	87/140	69/140	35/140	57/140	94	77 17									
	70,0%	65,7%	65,7%	62,1%	49,2%	25,0%	40,7%	46	24 22									
	1/140	35/140	35/140	56/140	58/140	92/140	70/140	99/140	39									
<i>stc</i>	0,7%	25,0%	25,0%	40,0%	41,4%	65,7%	50,0%	70,7%	101									

As frequências de crossing-over mitótico revelaram uma ligação próxima entre *stcZ*⁺ e *riboA* no braço esquerdo do cromossomo I.

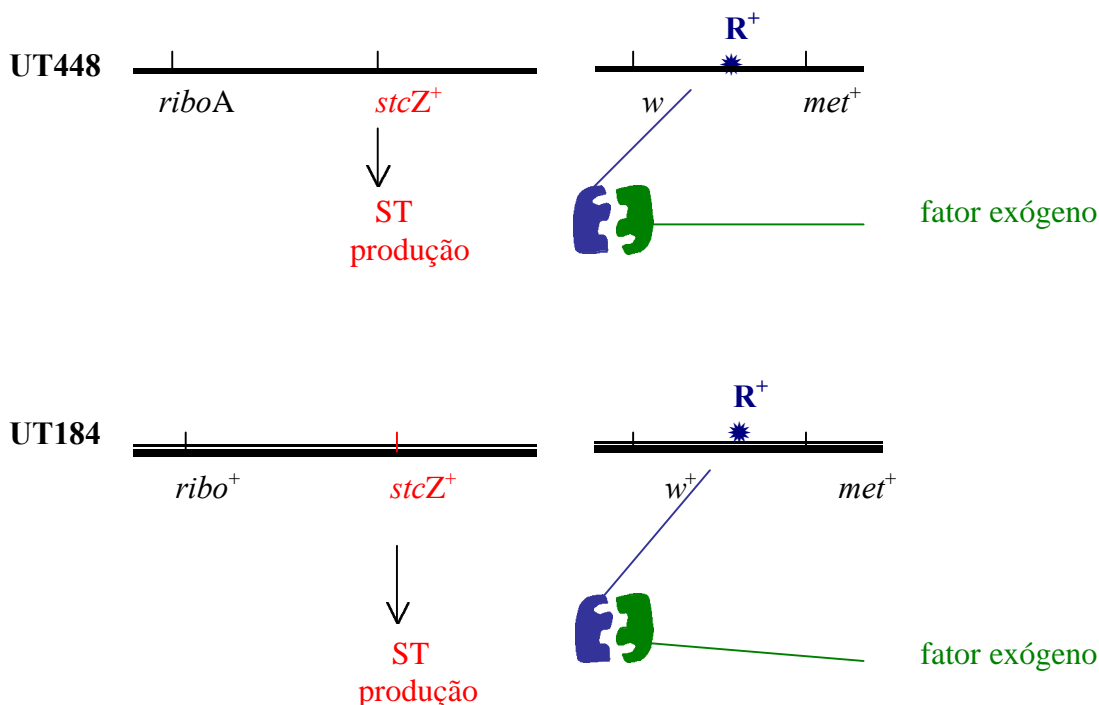
Um modelo proposto para a regulação da expressão do gene *stc* foi baseado no silenciamento ou reativação da expressão desses genes através da mudança dos seus padrões de metilação (**Diagramas 3a e 3b**).

Diagrama 3 – Modelo provisório de regulação do gene *stcZ*⁺ em linhagens diplóides, baseado na hipótese da metilação do DNA (por ZUCCHI, *in prep.*).

a) Diplóide UT448//UT196 (*ST*⁺⁺⁺) → alta produção de *ST*.



b) Diplóide UT448//UT184 (ST^{+++}) \longrightarrow alta produção de ST.



O fator exógeno mencionado no modelo acima pode estar relacionado a um fator ambiental externo como temperatura, estresse osmótico, pH do substrato ou qualquer outro fator abiótico. Esta hipótese coincide com observações feitas por FENG & LEONARD (1998), que sugerem a existência de elementos reguladores ambientais externos na ativação do gene *aflR* que é o responsável pela regulação da via biossintética AF/ST. Também LIU & CHU (1998) relataram o efeito de fatores ambientais e nutricionais na formação da aflatoxina através da presença da proteína AFLR.

Finalmente, foi possível mostrar esquematicamente a disposição correta dos genes em todas as linhagens utilizadas neste trabalho, os seus fenótipos e os seus verdadeiros genótipos (Tabela 16).

Tabela 16 – Fenótipos e genótipos definitivos das linhagens UT448, UT196 e UT184.

Linhagens	Genótipo	Fenótipo				Cor dos conídios
		<i>ribo</i>	ST	<i>paba</i>	<i>cha</i>	
UT448		-	-	-	+	Branco
UT196		+	+	+	+	Amarelo
UT184		-	-	+	-	Chartreuse

Nota: (*) significa silenciado por metilação.

O gene estrutural *stcZ*⁺ e a região reguladora (R) da expressão de *stcZ*⁺, ambos marcados com círculos, foram mapeados neste trabalho.

7. CONCLUSÕES

O emprego de técnicas genéticas realizadas com o objetivo de se estudar a produção e expressão da ST em linhagens de *Aspergillus nidulans* nos permitiu as seguintes conclusões:

- 1) O meio de aveia mostrou bons resultados para a indução da produção de ST na temperatura de 28°C.
- 2) O multimétodo utilizado foi muito mais eficiente para a extração de ST do que o método da acetona aquosa.
- 3) As linhagens UT448 e UT184 não apresentaram produção de ST; somente a linhagem UT196 se mostrou produtora dessa micotoxina, na quantidade de 4 ppm.
- 4) Para tornar possível a análise micotoxicológica de um número muito grande de segregantes meióticos, foi desenvolvido um método rápido de triagem de linhagens toxigênicas retirando-se “plugs” do meio de cultura contendo o fungo e transferindo-os diretamente para a placa cromatográfica. Dessa forma, todos os 175 segregantes meióticos do cruzamento UT448 x UT196 e os 140 segregantes mitóticos de UT448//UT184 puderam ser avaliados

quanto à produção ou não de ST. Além da produção de ST, todos estes segregantes também foram analisados quanto aos marcadores de auxotrofia e de resistência à acriflavina.

- 5) A partir dos resultados das análises meióticas e mitóticas, foram calculadas as frequências de recombinação e de segregação de cada um dos marcadores e, dessa forma, foi possível localizar com precisão o gene estrutural da ST (*stcZ*) no braço esquerdo do cromossomo I, a exatamente 4% de distância do gene da riboflavina (*riboA1*).
- 6) Os diplóides UT448//UT196 e UT448//UT184 produziram esterigmatocistina na concentração de 40 ppm, 10 vezes mais do que a linhagem paternal UT196.
- 7) Todos os segregantes meióticos e mitóticos, produtores ou não de ST, apresentaram também a produção de um pigmento vermelho de $R_f = 0,90$, detectado pelo multimétodo e que, provavelmente, seja um pigmento policetônico produzido pelos ascósporos do fungo.
- 8) A baixa expressão da produção de ST em 13 segregantes meióticos e a alta expressão dessa micotoxina nos diplóides (UT448//UT196 e UT448//UT184) permitiram concluir a existência de um gene regulador no cromossomo II, na região compreendida entre *w* e *met*, responsável pela expressão ou não do gene estrutural *stcZ*⁺ no cromossomo I.
- 9) As linhagens UT448 e UT184 são ambas *stcZ*⁺, mas este gene não é capaz de se expressar por estar regulado. A pesada metilação do gene regulador no cromossomo II silencia *stcZ*⁺.

- 10) No intervalo *w-met* do cromossomo II há o fator R que afeta o padrão de metilação do gene *stcZ*⁺, silenciando-o.

- 11) O fator R pode ser geneticamente removido (ou complexado) com elementos exógenos, regulando indiretamente a expressão do gene *stcZ*⁺.

8. ANEXO

Mapa genético do *Aspergillus nidulans* (anexo 8).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

- ABDEL-KADER, M. I. A.; MOUBASHER, A. H.; ABDEL-HAFEZ, S. I. I. Survey of the mycoflora of barley grains in Egypt. **Mycopathologia**, **69**: 143-7, 1979.
- ABDOLLAHI, A. & BUCHANAN, R. L. Regulation of aflatoxin biosynthesis: characterization of glucose as an apparent inducer of aflatoxin production. **J. Food Sci.**, **47**: 143-6, 1981.
- ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J.-H. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, **62**: 35-54, 1998.
- ALMEIDA, R. M. A **ARROZ BENEFICIADO: Isolamento da microbiota fúngica e espécies aflatoxigênicas do gênero *Aspergillus*. Influência da temperatura e da umidade na produção de aflatoxina em amostras contaminadas artificialmente por *Aspergillus flavus* Link.** São Paulo, 1989. 90 p. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
- ARAMAYO, R.; ADAMS, T. H.; TIMBERLAKE, W. E. A large cluster of highly expressed genes is dispensable for growth and development in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, **122**: 65-71, 1989.
- ARAMAYO, R. & TIMBERLAKE, W. E. Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* *yA* (laccase I) gene. **Nucleic Acids Res.**, **18**: 3415, 1990.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas : NB-6023. Rio de Janeiro: ABNT, 1989.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of Journals Indexed in Index Medicus. Bethesda: NLM, 1997.

- ASSAAD, F. F.; TUCKER, K. L.; SIGNER, E. R. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. **Plant Mol. Biol.**, **22**: 1067-85, 1993.
- AYERST, G. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. **J. Stored Prod. Res.**, **5**: 669-87, 1969.
- AZEVEDO, J. L. Recombinação em fungos filamentosos. *In*: PINTO DA COSTA, S. O. (Coord.). **Genética Molecular e de Microrganismos. Os fundamentos da Engenharia Genética**. São Paulo: Editora Manole, 1987. p. 393-407.
- BARGER, G. & CARR, F. H. Alkaloids of ergot. **J. Chem. Soc.**, **91**: 337-53, 1907.
- BARR, M. E. Prodrumus to nonlichenized, pyrenomycetous members of class Hymenoascomycetes. **Mycotaxon**, **39**: 43-184, 1990.
- BENNETT, J. W. Aflatoxins and anthraquinones from diploids of *Aspergillus parasiticus*. **J. Gen. Microbiol.**, **113**: 127-36, 1979.
- BENNETT, J. W. Differentiation and secondary metabolism in mycelial fungi. *In*: BENNETT, J. W. & CIEGLER, A. (Eds.). **Secondary Metabolism and Differentiation in Fungi**. New York: Marcel Dekker, 1983. p. 1-32.
- BENNETT, J. W. Taxonomy of fungi and biology of the Aspergilli. *In*: DEMAIN, A. L. & SOLOMON, N. (Eds.). **Biology of Industrial Microorganisms**. Stoneham, MA: Butterworths Publishers, 1985. p. 359 - 406.
- BENNETT, J. W. & CHRISTENSEN, S. B. New perspectives on aflatoxin biosynthesis. **Adv. Appl. Microbiol.**, **29**: 53-92, 1983.
- BENNETT, J. W. & KELLER, N. P. Mycotoxins and their prevention. *In*: ANKE, T. (Ed.). **Fungal Biotechnology**. London: Chapman & Hall, 1997. p. 265-73.

- BENNETT, J. W. & PAPA, K. E. The aflatoxigenic *Aspergillus* spp. In: INGRAM, D. S. & WILLIAMS, P. H. (Eds.). **Advances in plant pathology - Vol. 6 Genetics of plant pathogenic fungi**. New York: Academic Press, 1988a. p. 321-5.
- BENNETT, J. W. & PAPA, K. E. The aflatoxigenic *Aspergillus* species. **Adv. Plant Pathol.**, **6**: 263-280, 1988b.
- BENNETT, J. W.; HOROWITZ, P. C.; LEE, L. S. Production of sclerotia by aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Mycologia**, **71**: 415, 1979.
- BENNETT, J. W.; LEE, L. S.; SHOSS, S. M.; BOUDREAUX, G. H. Identification of averantin as an aflatoxin B₁ precursor. **Appl. Environ. Microbiol.**, **39**: 835-9, 1980b.
- BENNETT, J. W.; VINNETT, C. H.; GOYNES, W. R., Jr. Aspects of parasexual analysis in *Aspergillus parasiticus*. **Can. J. Microbiol.**, **26**: 706-13, 1980a.
- BESTOR, T. H. & COXON, A. The pros and cons of cytosine methylation. **Curr. Biol.**, **3**: 384-386, 1993.
- BESTOR, T. H. & JAENISCH, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell**, **61**: 915-26, 1992.
- BESTOR, T. H. & TYCKO, B. Creation of genomic methylation patterns. **Nat. Genet.**, **12**: 363-7, 1996.
- BHATNAGAR, D. & CLEVELAND, T. E. Purification and characterization of a reductase from *Aspergillus parasiticus* SRRC 2043 involved in aflatoxin biosynthesis. **Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.**, **4**: A 2727, 1990.
- BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K. C.; CLEVELAND, T. E. Oxidation-reduction reactions in biosynthesis of secondary metabolites. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E. B.; ARORA, D. K. (Eds.). **Handbook of Applied Mycology - Mycotoxins in Ecological Systems**. New York: Marcel Dekker, 1992. v. 5. p. 255-86.

- BHATNAGAR, D.; PAYNE, G.; LINZ, J. E.; CLEVELAND, T. E. Molecular biology to eliminate aflatoxins. **Inform**, **6**: 262-71, 1995.
- BHATNAGAR, D.; ULLAH, A. H. J.; CLEVELAND, T. E. Purification and characterization of a methyltransferase from *Aspergillus parasiticus* SRRC 163 involved in aflatoxin biosynthetic pathway. **Prep. Biochem.**, **18**: 321-49, 1988.
- BIBB, M. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Microbiology**, **142**: 1335-44, 1996.
- BONNETT, M. & TAYLOR, E. R. The structure of aflatoxin B₁-DNA adduct at N⁷ of guanine. Theoretical intercalation and covalent adduct models. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, **7**: 127-49, 1989.
- BRADLEY, S. G. Parasexual phenomena in microorganisms. **Annu. Rev. Microbiol.**, **16**: 35-52, 1962.
- BRADSHAW, R. E.; BENNETT, J. W.; PEBERDY, J. F. Parasexual analysis of *Aspergillus parasiticus*. **J. Gen. Microbiol.**, **129**: 2117-23, 1983.
- BRIDGE, P. D. Modern methods for fungal taxonomy. *In*: **Advances in fungal taxonomy**. Campinas, SP: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 16-20 novembro 1992. (apostila)
- BRODY, H. & CARBON, J. Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **86**: 6260-3, 1989.
- BROWN, D. W. & SALVO, J. J. Isolation and characterization of sexual spore pigments from *Aspergillus nidulans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60**: 979-83, 1994.
- BROWN, D. W.; HAUSER, F. M.; TOMMASI, R.; CORLETT, S.; SALVO, J. J. Structural elucidation of a putative conidial pigment intermediate in *Aspergillus parasiticus*. **Tetrahedron Lett.**, **34**: 419-22, 1993.

- BROWN, D.; KELKAR, H.; NESBITT, C.; FERNANDES, M.; SEGNER, S.; BHATNAGAR, D.; KELLER, N.; ADAMS, T. Analysis of the sterigmatocystin gene cluster of *Aspergillus nidulans*. In: ANNUAL AFLATOXIN ELIMINATION WORKSHOP MEETING. 7., Beltsville, MD: USDA-ARS, 1994. **Proceedings**. October 24-25.
- BROWN, D. W., YU, J.-H.; KELKAR, H. S., FERNANDES, M.; NESBITT, T. C.; KELLER, N. P.; ADAMS, T.; LEONARD, T. J. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **93**: 1418-22, 1996.
- BU'LOCK, J. D. **Essays in Biosynthesis and Microbial Development**. New York: Wiley, 1967.
- BULL, J. H. & WOOTON, J. C. Heavily methylated amplified DNA in transformants of *Neurospora crassa*. **Nature**, **310**: 701-4, 1984.
- BURGER, G.; STRAUSS, J.; SCAZZOCCHIO, C.; LANG, B. F. *nirA*, the pathway-specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative GAL4-type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. **Mol. Cell Biol.**, **11**: 5746-55, 1991.
- BUROW, G. B.; NESBITT, T. C.; DUNLAP, J. D.; KELLER, N. P. Differential effects of 13S- and 9S-hydroperoxy fatty acids on *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis. **Mol. Plant Microbe Inter.** (submitted).
- BUSBY, F. & WOGAN, G. N. Food borne mycotoxin and alimentary mycotoxicosis. In: RIEMANN, H. & BRYAN, F. L. (Eds.). **Food borne infection and intoxications**. 2 ed. New York: Academic Press, 1979.
- CAMBARERI, E. B.; JENNSSEN, B. C.; SCHABTACH, E.; SELKER, E. U. Repeat induced G-C to A-T mutations in *Neurospora*. **Science**, **244**: 1571-5, 1989.
- CASTRO-PRADO, M. A. A. & ZUCCHI, T. M. A. D. A gene inactivation system (GIS) acting in meiosis of a duplicated strain of *Aspergillus nidulans*. **Braz. J. Genet.**, **19**: 17-25, 1996.

- CHAMPNES, W. C. & CHATER, K. F. Regulation and integration of antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces* spp. In: PIGGOT, P. J.; MORAN, C. P.; YOUNGMAN, P. (Eds.). **Regulation of Bacterial Differentiation**. Washington: American Society for Microbiology, 1994.
- CHANG, P.-K.; SKORY, C. D.; LINZ, J. E. Cloning of a gene associated with aflatoxin B₁ biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. **Curr. Genet.**, **21**: 231-33, 1992.
- CHANG, P.-K.; CARY, J. W.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; BENNETT, J. W.; LINZ, J. E.; WOLOSHUK, C. P.; PAYNE, G. A. Cloning of the *Aspergillus parasiticus* *apa-2* gene associated with the regulation of aflatoxin biosynthesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**: 3273-9, 1993.
- CHANG, P.-K.; EHRLICH, K. C.; YU, J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E. Increased expression of *Aspergillus parasiticus* *afIR*, encoding a sequence-specific DNA-binding protein, relieves nitrate inhibition of aflatoxin biosynthesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61**: 2372-7, 1995.
- CHUTURGOON, A. A. & DUTTON, M. F. The affinity purification and characterization of a dehydrogenase from *Aspergillus parasiticus* involved in aflatoxin B₁ biosynthesis. **Prep. Biochem.**, **21**: 125-40, 1991.
- CLEVELAND, T. E.; LAX, A. R.; LEE, L. S.; BHATNAGAR, D. Appearance of enzyme activities catalyzing conversion of sterigmatocystin to aflatoxin B₁ in late-growth-phase *Aspergillus parasiticus* cultures. **Appl. Environ. Microbiol.**, **53**: 1711-3, 1987.
- CLUTTERBUCK, A. J. *Aspergillus nidulans*. In: KING, R. C. (Ed.) **Handbook of Genetics**. New York: Plenum Press, 1974. v. 1
- CLUTTERBUCK, A. J. Sexual and parasexual genetics of *Aspergillus* species. In: BENNETT, J. W. & KLICH, M. A. (Eds.). **Aspergillus: Biology and Industrial Applications**. Biotechnology Series. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. v. 23. p.3-18.

- CLUTTERBUCK, A. J. *Aspergillus nidulans*. In: O'BRIEN, S. J. (Ed.) **Genetic Maps. Locus Maps of Complex Genomes**. 6.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. p. 3.71 - 3.84
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 4. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990. 279p.
- CORTES, J.; HAYDOCK. S. F.; ROBERTS, G. A.; BEVITT. D. J.; LEADLAY, P. F. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. **Nature**, **346**: 176-8, 1990.
- COVE, D. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. In: SMITH, J. E. & PATEMAN, J. A. (Eds.). **Genetics and Physiology of *Aspergillus***. New York: Academic Press, 1977. p. 81-95.
- CROFT, J. H. & JINKS, J. L. Aspects of the population genetics of *Aspergillus nidulans*. In: SMITH, J. E. & PATEMAN, J. A. (Eds.). **Genetics and Physiology of *Aspergillus***. New York: Academic Press, 1977. p. 339-60.
- DAVIES, J. E.; KIRKALDY, D.; ROBERTS, J. C. Studies in mycological chemistry. Part VII. Sterigmatocystin, a metabolite of *Aspergillus versicolor* (Vuillemin) Tiraboschi. **J. Chem. Soc.**, 2169-78, 1960.
- DIENER, U. L. & DAVIS, N. D. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, **50**: 1390-3, 1966.
- DIMROTH, P.; WALTER, H.; LYNEN, F. Biosynthese von 6-methylsalicylsäure. **Eur. J. Biochem.**, **13**: 98-110, 1971.
- DOEHLERT, D. C.; WICKLOW, D. T.; GARDNER, H. W. Evidence implicating the lipoxigenase pathway in providing resistance to soybeans against *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, **83**: 1473-7, 1993.
- DOERFLER, W. DNA methylation and gene activity. **Annu. Rev. Biochem.**, **52**: 93-124, 1983.

- DONADIO, S.; STAVER, M. J.; MCALPINE, J. B.; SWANSON, S. J.; KATZ, L. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. **Science**, **252**: 675-9, 1991.
- DUTTON, M. F. Enzymes and aflatoxin biosynthesis. **Microbiol. Rev.**, **52**: 274-95, 1988.
- DVORACKOVA, I. **Aflatoxins and Human Health**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990.
- EIDAM, E. Zur Kenntniss der Entwicklung bei den Ascomyceten. III. *Sterigmatocystis nidulans* n.sp. **Beitr. Biol. Pflanzen**, **3**: 392-411, 1883.
- ESTEBAN, M. A.; ALCALA, M.; MORROS, A.; FERNANDEZ-SALGUERO, J.; GARCIA DE FERNANDO, G. D.; ORDONEZ, J. A.; SANZ, B. Water activity of culture media used in food microbiology. **Int. J. Food Sci. Technol.**, **25**: 464-68, 1990.
- FAUGERON, G.; RHOUNIM, L.; ROSSIGNOL, J.-L. How does the cell count the number of ectopic copies of a gene in the premeiotic inactivation process acting in *Ascobolus immersus*? **Genetics**, **124**: 585-91, 1990.
- FENG, G. H.; CHU, F. S.; LEONARD T. J. Molecular cloning of genes related to aflatoxin biosynthesis by differential screening. **Appl. Environ. Microbiol.**, **58**: 455-60, 1992.
- FENG, G. H. & LEONARD, T. J. Characterization of the polyketide synthase gene (*pksL1*) required for aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. **J. Bacteriol.**, **177**: 6246-54, 1995.
- FENG, G. H. & LEONARD, T. J. Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64**: 2275-7, 1998.
- FIDALGO, O. & FIDALGO, M. E. P. K. **Rickia - Dicionário Micológico**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1967. 221 p. Supl.2.

- FINCHAM, J. R. S.; CONNERTON, I. F.; NOTARIANNI, E.; HARRINGTON, K. Premeiotic disruption of duplicated and triplicated copies of the *Neurospora crassa am* (glutamate dehydrogenase) gene. **Curr. Genet.**, **15**: 327-34, 1989.
- FORBES, E. Use of mitotic segregation for assigning genes to linkage groups in *Aspergillus nidulans*. **Heredity**, **13**: 67-80, 1959.
- FOUTZ, K. R.; WOLOSHUK, C. P.; PAYNE, G. A. Cloning and assignment of linkage group loci to a karyotypic map of the filamentous fungus *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, **87**: 787-94, 1995.
- FRANCIS, O. J.; WARE, G. M.; CARMAN, A. S.; KUAN, S. S. Thin layer chromatographic determination of sterigmatocystin in cheese. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, **68**: 643, 1985.
- GAMS, W. Report of the committee for fungi and lichens: new series, 2. **Taxon**, **41**: 99-113, 1992.
- GAMS, W.; CHRISTENSEN, M.; ONIONS, A. H. S.; PITT, J. I.; SAMSON, R. A. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: SAMSON, R. A. & PITT, J. I. (Eds.) **Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics**. New York: Plenum Press, 1986. p. 55-62.
- GEEVER, R. F.; HUIITE, L.; BAUM, J. A.; TYLER, B. M.; PATEL, V. B.; RUTLEDGE, B. J.; CASE, M. E.; GILES, N. H. DNA sequence, organization and regulation of the *qa* gene cluster of *Neurospora crassa*. **J. Mol. Biol.**, **207**: 15-34, 1989.
- GIMENO, A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, **62**: 579, 1979.
- GINIGER, E.; VARNUM, S. M.; PTASHNE, M. Specific DNA-binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. **Cell**, **40**: 767-74, 1985.
- GOODRICH-TANRIKULU, M.; MAHONEY, N.; RODRIGUES, S. B. The plant growth regulator methyl jasmonate inhibits aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Microbiology**, **141**: 2831-7, 1995.

- GOTO, T.; WICKLOW, D. T.; ITO, Y. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**: 4036-38, 1996.
- GREUTER, W.; BURDET, H. M.; CHALONER, W. G.; DEMOULIN, V.; GROLLE, R.; HAWKSWORTH, D. L.; NICOLSON, D. H.; SILVA, P. C.; STAFLEU, F. A.; VOSS, E. G.; MCNEILL, J. (Eds.) **International code of botanical nomenclature**, adopted by the Fourteenth International Botanical Congress, Berlin, 1987. *Regnum Vegetabile*, 118, 1988.
- GROOPMAN, J. D.; BUSBY, W. F. Jr.; WOGAN, G. N. Nuclear distribution of aflatoxin B₁ and its interaction with histones in rat liver in vivo. **Cancer Res.**, **40**: 4343-51, 1980.
- GUENGERICH, F. P. Roles of cytochrome P450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. **Cancer Res.**, **48**: 2946-54, 1988.
- GUZMÁN-DE-PEÑA, D.; AGUIRRE, J.; RUIZ-HERRERA, J. Correlation between the regulation of sterigmatocystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emericella nidulans*. **Antonie Leeuwenhoek**, **73**: 199-205, 1998.
- HAJJAR, J. D.; BENNETT, J. W.; BHATNAGAR, D.; BAHU, R. Sterigmatocystin production by laboratory strains of *Aspergillus nidulans*. **Mycol. Res.**, **94**: 548-51, 1989.
- HARA, O. & BEPPU, T. Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus*. The role of A-factor. **J. Antibio.**, **35**: 349-58, 1982.
- HERRERA, T. & ULLOA, M. **El Reino de los Hongos - Micología básica y aplicada**. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1990. 552 p.
- HESELTIME, C. W. Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds. *In*: RODERICKS, J. V. (Ed.). **Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems**. Washington: American Chemical Society, 1976. p. 1 - 22.

- HOLLIDAY, R. The inheritance of epigenetics defects. **Science**, **238**: 163-70, 1987.
- HOLLIDAY, R. DNA methylation and epigenetic inheritance. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.**, **326**: 329-38, 1990.
- HOLLIDAY, R. & PUGH, J. E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. **Science**, **187**: 226-32, 1975.
- HOLZAPFEL, C. W.; PURCHASE, I. F. H.; STEYN, P. S.; GOUWS, L. The toxicity and chemical assay of sterigmatocystin, a carcinogenic mycotoxin, and its isolation from two new fungal sources. **S. Afr. Med. J.**, **40**: 1100-1, 1966.
- HOOPWOOD, D. A. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. **Proc. Roy. Soc. Lond. B**, **235**: 121-38, 1988.
- HOPWOOD, D. A. & KHOSLA, C. Genes for polyketide secondary metabolic pathways in microorganisms and plants. *In*: CHADWICK D. J. & WHELAN, J. (Eds.). **Secondary Metabolites: Their Function and Evolution**. Chichester, England: John Wiley & Sons, 1992. p. 88-112 (Ciba Found. Symp., 171).
- HOPWOOD, D. A. & SHERMAN, D. H. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. **Annu. Rev. Genet.**, **24**: 37-66, 1990.
- HORNG, J. S.; CHANG, P. K.; PESTKA, J. J.; LINZ, J. E. Development of a homologous transformation system for *Aspergillus parasiticus* with the gene encoding nitrate reductase. **Mol. Gen. Genet.**, **224**: 294-296, 1990.
- HULL, E. P.; GREEN, P. M.; ARST, H. N.; SCAZZOCCHIO, C. Cloning and physical characterization of the L-proline catabolism gene cluster of *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.**, **3**: 553-9, 1989.
- HUTCHINSON, C. & FUJII, I. Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. **Annu. Rev. Microbiol.**, **49**: 201-38, 1995.

- IRELAN, J. T. & SELKER, E. U. Gene silencing in filamentous fungi: RIP, MIP and quelling. **J. Genet.**, **75**: 313-24, 1996.
- JABLONKA, E. & LAMB, M. J. **Epigenetic Inheritance and Evolution: The Lamarckian Dimension**. Oxford: Oxford University Press, 1995.
- JANSEN, G. J. O. Survival of *uvsB* and *uvsC* mutants of *Aspergillus nidulans* after UV-irradiation. **Mutat. Res.**, **10**: 21-32, 1970.
- JEGGO, P. A. & HOLLIDAY, R. Azacytidine-induced reactivation of a DNA repair gene in Chinese hamster ovary cells. **Mol. Cell Biol.**, **6**: 2944-9, 1986.
- JOHNSTON, M. Genetic evidence that zinc is an essential cofactor in the DNA binding domain of GAL4 protein. *Nature*, **328**: 353-5, 1987.
- JOINT FAO/WHO/UNEP Mycotoxins report. *In*: **CONFERENCE ON MYCOTOXINS**, Nairobi, Kenia: 1977. 105 p.
- JONES, B. D. **Methods of aflatoxin analysis**. London: Tropical Products Institute, 1972. 58 p. (Report G 70).
- JONES, P. A. *In*: RAZIN, A.; CEDAR, H. & RIGGS, A. D. (Eds.). **DNA Methylation: Biochemistry and Biological Significance**. New York: Springer-Verlag, 1984. p. 165-187.
- JOSEFSSON, B. G. E. & MÖLLER, T. E. Screening method for the detection of aflatoxins, ochratoxin, patulin, sterigmatocystin and zearalenone in cereals. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, **60**: 1369, 1977.
- KACHHOLZ, T. & DEMAIN, A. L. Nitrate repression of averufin and aflatoxin biosynthesis. **J. Nat. Prod.**, **46**: 499-506, 1983.
- KÄFER, E. An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. **Adv. Genet.**, **9**: 105-45, 1958.
- KALE, S. P.; BHATNAGAR, D.; BENNETT, J. W. Isolation and characterization of morphological variants of *Aspergillus parasiticus* deficient in secondary metabolite production. **Mycol. Res.**, **98**: 645-52, 1994.

- KELLER, N. P. & HOHN, T. M. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. **Fungal Genet. Biol.**, **21**: 17-29, 1997.
- KELLER, N. P.; CLEVELAND, T. E.; BHATNAGAR, D. A molecular approach towards understanding aflatoxin production. *In*: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E. B.; ARORA, D. K. (Eds.). **Handbook of Applied Mycology - Mycotoxins in Ecological Systems**. New York: Marcel Dekker Inc., 1992a. v. 5. p. 287-310.
- KELLER, N. P.; CLEVELAND, T. E.; BHATNAGAR, D. Variable electrophoretic karyotypes of members of *Aspergillus* Section *Flavi*. **Curr. Genet.**, **21**: 371-5, 1992b.
- KELLER, N. P.; KANTZ, N. J.; ADAMS, T. H. *Aspergillus nidulans* *verA* is required for production of the mycotoxin sterigmatocystin. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60**: 1444-50, 1994.
- KELLER, N.P; BROWN, D.; BUTCHKO, R. A. E. A conserved polyketide mycotoxin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *In*: RICHARD, J. L. (Ed.). **Molecular Approaches to Food Safety Issues Involving Toxic Microorganisms**. Fort Collins, CO: Alaken, 1995. p. 263-77.
- KEVEI, F. & PEBERDY, J. Induced segregation in interspecific hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. **Mol. Gen. Genet.**, **170**: 213-8, 1979.
- KLEIN, C. B. & COSTA, M. DNA methylation, heterocromatin and epigenetic carcinogens. **Mutat. Res.**, **386**: 163-80, 1997.
- KOZAKIEWICZ, Z. & SMITH, D. Physiology of *Aspergillus*. *In*: ATKINSON, T. & SHERWOOD, R. F. (Eds.) **Biotechnology Handbooks: Aspergillus**. New York: Plenum Press, 1994. p. 23-40.
- KUME, T.; ITO, H.; IIZUKA, H.; TAKEHISA, M. Radiosensitivity of *Aspergillus versicolor* isolated from animal feeds and destruction of sterigmatocystin by gamma-irradiation. **Agric. Biol. Chem.**, **47**: 1065-9, 1983.

- KURATA, H. & ICHINOE, M. Studies on the population of toxigenic fungi in foodstuffs. I. Fungal flora of flour-type foodstuffs. **J. Food Hyg. Soc. Jpn.**, **8**: 237-46, 1967.
- KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaris*. **Antonie Leeuwenhoek**, **53**: 147-58, 1987.
- KUTHUBUTHEEN, A. J. Thermophilic fungi associated with freshly harvested rice seeds. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, **73**: 357-9, 1979.
- LACEY, J. Water availability and the occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in stored products. *In*: **INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS**, 7., Tokyo: 1988. p.186-9.
- LANCASTER, M. D.; JENKINS, F. P.; PHILIP, J. M. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**, **192**: 1095-6, 1961.
- LAW, D. J. & TIMBERLAKE, W. E. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. **J. Bacteriol.**, **144**: 509-17, 1980.
- LEE, B. N. & ADAMS, T. H. Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. **Mol. Microbiol.**, **14**: 323-34, 1994.
- LEE, K. Y.; POOLE, C. F.; ZLATKIS, A. Simultaneous multi-mycotoxin determination by high performance thin-layer chromatography. **Anal. Chem.**, **52**: 837, 1980.
- LEE, L. S. Metabolic precursor regulation of aflatoxin formation in toxigenic and non-toxic strains of *Aspergillus flavus*. **Mycopathologia**, **107**: 127-30, 1989.
- LEE, L. S.; BENNETT, J. W.; CUCULLU, A. F.; ORY, R. L. Biosynthesis of aflatoxin B₁ conversion of versicolorin A to aflatoxin B₁ by *Aspergillus parasiticus*. **J. Agric. Food Chem.**, **24**: 1167-70, 1976.

- LEE, Y. W.; KLEIN, C. B.; KARGACIN, B.; SALNIKOW, K.; KITAHARA, J.; DOWJAT, K.; ZHITKOVITCH, A.; CHRISTIE, N. T.; COSTA, M. Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: A new model for epigenetic carcinogens. **Mol. Cell. Biol.**, **15**: 2547-57, 1995.
- LENNOX, J. E. & DAVIS, C. K. Selection and complementation analysis among aflatoxin-deficient mutants of *Aspergillus parasiticus*. **Exp. Mycol.**, **7**: 192-195, 1983.
- LEONG, P. M; BENNETT, J. W.; CIEGLER, A. Protoplasts from auxotrophs of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Dev. Ind. Microbiol.**, **22**: 661-8, 1981.
- LIANG, S. H. & LINZ, J. E. Structural and functional characterization of the *ver-1* genes and proteins from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversion of versicolorin A to sterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. *In*: CURRENT ISSUES IN FOOD SAFETY. National Food Safety Toxicology Center: Michigan State University, 1994. **Proceedings**.
- LIANG, S. H.; MAHANTI, N.; RARICK, M.; TRAIL, F.; WILSON, D.; WU, T. S.; ZHOU, R.; LINZ, J. E. Molecular genetic approaches to preharvest elimination of aflatoxin contamination. *In*: ANNUAL AFLATOXIN ELIMINATION WORKSHOP MEETING. 7., Beltsville, MD: USDA-ARS, 1994. **Proceedings**. October 24-25.
- LILLEHOJ, E. B. Aflatoxin: an ecologically elicited genetic activation signal. *In*: SMITH, J. E. & HENDERSON, R. S. (Eds.). **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.1-35.
- LILLEHOJ, E. B. & CIEGLER, A. Biological activity of sterigmatocystin. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, **35**: 373, 1968.
- LIN, B.-K. & ANDERSON, J. A. Purification and properties of versiconal cyclase from *Aspergillus parasiticus*. **Arch. Biochem. Biophys.**, **293**: 67-70, 1992.

- LINTON, K. J.; COOPER, H. N.; HUNTER, I. S.; LEADLAY, P. F. An ABC-transporter from *Streptomyces longisporoflavus* confers resistance to the polyether-ionophore antibiotic tetronasin. **Mol. Microbiol.**, **11**: 777-85, 1994.
- LIU, B-H. & CHU, F. S. Regulation of *aflR* and its product, AflR, associated with aflatoxin biosynthesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64**: 3718-23, 1998.
- LUCKNER, M. Alkaloid biosynthesis in *Penicillium cyclopium* – Does it reflect general features of secondary metabolism? **J. Nat. Prod.**, **43**: 21-40, 1980.
- MACCABE, A. P.; RIACH, M. B.; UNKELS, S. E.; KINGHORN, J. R. The *Aspergillus nidulans npeA* locus consists of three contiguous genes required for penicillin biosynthesis. **Eur. Mol. Biol. Organ. J.**, **9**: 279-87, 1990.
- MACNEIL, D. J.; OCCI, J. L.; GEWAIN, K. M.; MACNEIL, T. Correlation of the avermectin polyketide synthase genes to the avermectin structure. **Ann. NY Acad. Sci.**, **721**: 123-32, 1994.
- MAGOON, K. K.; GUPTA, S. K.; VENKITASUBRAMANIAN, T. A. Biosynthesis of aflatoxins. **Bacteriol. Rev.**, **41**: 822-55, 1977.
- MAHANTI, N.; BHATNAGAR, D.; CARY, J. W.; JOUBRAN, J.; LINZ, J. E. Structure and function of *fas-1A*, a gene encoding a putative fatty acid synthetase directly involved in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**: 191-5, 1996.
- MALIK, V. S. Genetics of secondary metabolism. *In*: REHM, H. J. & REED, G. (Eds.). **Biotechnology**, Vol.4., Weinheim: VCH, 1986, p. 39-68.
- MALPARTIDA, F. & HOPWOOD, D. A. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. **Nature**, **309**: 462-4, 1984.

- MALPARTIDA, F.; HALLAM, S. E.; KIESER, H. M.; MOTAMED, H.; HUTCHINSON, C. R. Homology between *Streptomyces* genes coding for synthesis of different polyketides used to clone antibiotic biosynthetic genes. **Nature**, **325**: 818-20, 1987.
- MANABE, M.; MINAMISAWA, M.; MATSURA, S. Extraction and clean-up method for the sterigmatocystin analysis of rice. **J. Agric. Chem. Soc. Jpn.**, **47**: 209, 1973.
- MANN, J. **Secondary Metabolism**. Oxford : Clarendon, 1987.
- MARTIN, C. N. & GARNER, R. C. Aflatoxin B₁-oxide generated by chemical or enzymatic oxidation of aflatoxin B₁ causes guanine substitution in nucleic acids. **Nature**, **267**: 863-5, 1977.
- MARTIN, J. F. & LIRAS, P. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. **Annu. Rev. Microbiol.**, **43**: 173-206, 1989.
- MATSUSHIMA, K.-I.; ANDO, Y.; HAMASAKI, T.; YABE, K. Purification and characterization of two versiconal hemiacetal acetate reductases involved in aflatoxin biosynthesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60**: 2561-67, 1994.
- MATZKE, M. A. & MATZKE, A. J. M. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: what does it really tell us? **Trends Genet.**, **11**: 1-3, 1995.
- MATZKE, A. J. M.; NEUHUBER, F.; PARK, Y. D.; AMBROS, P. F.; MATZKE, M. A. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. **Mol. Gen. Genet.**, **244**: 219-29, 1994.
- MAYORGA, M. E. & TIMBERLAKE, W. E. Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* wA gene. **Genetics**, **126**: 73-9, 1990.
- MAYORGA, M. E. & TIMBERLAKE, W. E. The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* wA gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthase. **Mol. Gen. Genet.**, **235**: 205-12, 1992.

- McCORMICK, S. P.; BHATNAGAR, D.; LEE, L. S. Averufanin is an aflatoxin precursor between averantin and averufin in the biosynthetic pathway. **Appl. Environ. Microbiol.**, **53**: 14-16, 1987.
- McMAHON, G.; DAVIS, E. F.; HUBER, L. J.; KIM, W.; WOGAN, G. N. Characterization of *c-Ki-ras* and *N-ras* in aflatoxin B₁ induced rat liver tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **83**: 9418-22, 1986.
- MESSIAS, C. L. **Parassexualidade e produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus* Link.** Piracicaba, 1977. 75 p. [Dissertação de mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo].
- MILLS, J. T. & WALLACE, H. A. H. Microflora and condition of cereal seeds after a wet harvest. **Can. J. Plant Sci.**, **59**: 645-51, 1979.
- MINTO, R. E. & TOWNSEND, C. A. Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis. **Chem. Rev.**, **97**: 2537-55, 1997.
- MIYAKE, K.; KUZUYAMA, T.; HORINOUCI, S.; BEPPU, T. The A-factor binding protein of *Streptomyces* negatively controls streptomycin production and sporulation. **J. Bacteriol.**, **171**: 4298-302, 1990.
- MOSS, M. O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. *In*: SMITH, J. E. & HENDERSON, R. S. (Eds.). **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.37-56.
- MOTAMEDI, H. & HUTCHINSON, C. R. Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomicina C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**: 4445-9, 1987.
- MOUBASHER, A. H.; EL-NAGHY, M. A.; ABDEL-HAFEZ, S. I. Studies on the fungus flora of the three grains in Egypt. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, **47**: 261-74, 1972.
- NAGARAJAN, V. & BHAT, R. V. Aflatoxin production in peanut varieties by *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. **Appl. Microbiol.**, **25**: 319-21, 1973.

- NEELY, F. L. & EMERSON, C. S. Determination of sterigmatocystin in fermentation broths by reversed-phase high-performance liquid chromatography using post-column fluorescence enhancement. **J. Chromatogr.**, **523**: 305-11, 1990.
- NORTHOLT, M. D.; VERHULSDONK, C. A. H.; SOENTORO, P. S. S.; PAULSCH, W. E. Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **J. Milk Food Technol.**, **39**: 170, 1976.
- OFFICIAL Methods of Analysis of AOAC International. Ed. Patricia Cunniff. 16.ed. Arlington, VA.: AOAC International, 1995. sections **49.2.02**; **49.7.01**.
- OMINSKI, K. H.; MARQUARDT, R. R.; SINHA, R. N.; ABRAMSON, D. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. *In*: MILLER, J. D. & TRENHOLM, H. L. (Eds.). **Mycotoxins in Grain – Compounds Other than Aflatoxin**. St. Paul, USA: Eagan Press, 1994. p. 287 - 312.
- ORBACH, M. J.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R. W.; YANOFSKY, C. An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. **Mol. Cell. Biol.**, **8**: 1469-73, 1988.
- PAPA, K. E. The parasexual cycle of *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, **65**: 1201-5, 1973.
- PAPA, K. E. Linkage groups in *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, **68**: 159-65, 1976.
- PAPA, K. E. Genetics of aflatoxin production in *Aspergillus flavus*: linkage between a gene for a high B₂-B₁ ratio and the histidine locus on linkage group VIII. **Mycologia**, **69**: 1185-90, 1977.
- PAPA, K. E. The parasexual cycle of *Aspergillus parasiticus*. **Mycologia**, **70**: 766-73, 1978.
- PAPA, K. E. Genetics of *Aspergillus flavus*: complementation and mapping of aflatoxin mutants. **Genet. Res.**, **34**: 1-9, 1979.

- PAPA, K. E. Dominant aflatoxin mutant of *Aspergillus flavus*. **J. Gen. Microbiol.**, **118**: 279-82, 1980.
- PAPA, K. E. Genetics of *Aspergillus flavus*: linkage of aflatoxin mutants. **Can. J. Microbiol.**, **30**: 68-73, 1984.
- PAPA, K. E. Heterokaryon incompatibility in *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, **78**: 98-101, 1986.
- PATERSON, R. R. M. Standardized one- and two-dimensional thin-layer chromatographic methods for the identification of secondary metabolites in *Penicillium* and other fungi. **J. Chromatogr.**, **368**: 249-64, 1986.
- PAYNE, G. A.; NYSTROM, G. J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; WOLOSHUK, C. P. Cloning of the *afl-2* gene involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus flavus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59** : 156-62, 1993.
- PIER, A. C. Mycotoxins and animal health. **Adv. Vet. Comp. Med.**, **25**: 185-243, 1981.
- PITT, J. I. Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. *In*: DUCKWORTH, R. B. (Ed.). **Water Relations of Foods**. London: Academic Press, 1975. p. 273-307.
- PITT, J. I. **The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces***. London: Academic Press, 1979.
- PITT, J. I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **J. Med. Vet. Mycol.**, **32**: 17-32, 1994.
- PITT, J. I. & HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 593p.
- PITT, J. I. & SAMSON, R. A. Species names in current use in the *Trichocomaceae* (Fungi, Eurotiales). *In*: GREUTER, W. (Ed.). **NCU-2: Names in Current Use in the Families *Trichocomaceae*, *Cladoniaceae*, *Pinaceae* and *Lemnaceae***. Königstein, Germany: Koeltz Scientific Books, 1993. (Regnum Vegetabile, 128: 13 – 57).

- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; FORBES, E. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. **J. Gen. Microbiol.**, **8**: 198-210, 1953a.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MacDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Adv. Genet.**, **5**: 141-238, 1953b.
- PURCHASE, I. F. H. & VAN DER WATT, J. J. Carcinogenicity of sterigmatocystin. **Food Cosmet. Toxicol.**, **8**: 289, 1970.
- RAPER, J. R. Heterokaryosis and sexuality in fungi. **Trans. NY Acad. Sci.**, **17**: 627-35, 1955.
- RAPER, K. B. & FENNELL, D. I. **The Genus *Aspergillus***. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1965. 875 p.
- RAPER, K. B. & THOM, C. **A Manual of *Penicillia***. Baltimore: Williams and Wilkins. 1949.
- RARICK, M.; THOMAS, R.; SKORY, C. D.; LINZ, J. E. Identification and analysis of the aflatoxin biosynthetic genes *nor-1* and *ver-1* in the commercial species *Aspergillus sojae* and *A. oryzae* as well as toxigenic and nontoxigenic strains of *A. flavus*. In: CURRENT ISSUES IN FOOD SAFETY. National Food Safety Toxicology Center: Michigan State University, 1994. **Proceedings**.
- RASCATI, R. J. & McNEELY, M. Induction of retrovirus gene expression by aflatoxin B₁ and 2-acetylaminofluorene. **Mutat. Res.**, **122**: 235-41, 1983.
- RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, **42**: 265-70, 1950.
- ROMANO, N. & MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Mol. Microbiol.**, **6**: 3343-53, 1992.
- ROPER, J. A. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. **Experientia**, **8**: 14-5, 1952.

- ROPER, J. A. The parasexual cycle. *In*: AINSWORTH, G. C. & SUSSMAN, A. S. (Eds.). **The Fungi- Vol. 2 Fungal Organisms**. New York: Academic Press, 1966. p. 589-617.
- RUSSEL, P. & NURSE, P. The mitotic inducer *nim*⁺ function in a regulatory network of protein kinase homologs controlling the initiation of mitosis. **Cell**, **49**: 569-76, 1987.
- SABINO, M. Variações de níveis de aflatoxina B₁ em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, **40**: 153-8, 1980.
- SAMSON, R. A. & GAMS, W. Typification of the species of *Aspergillus* and associated teleomorphs. *In*: SAMSON R. A. & PITT, J. I. (Eds) **Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics**. New York: Plenum Press, 1986. p. 31-54.
- SAMSON, R. A. & PITT, J. I. **Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics** . Nato Asi Ser., 102: 1986.
- SAMSON, R. A. & PITT, J. I. **Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification**. New York: Plenum Press, 1990.
- SCOTT, P. M. Analysis of mycotoxins other than aflatoxins in foodstuffs. *In*: TOUCHSTONE, J. C. & ROGERS D. (Eds.). **Thin Layer Chromatography: Quantitative Clinical and Environmental Applications**. New York: Wiley Interscience, 1980. p. 253-74.
- SCOTT, P. M. *Penicillium* and *Aspergillus* toxins. *In*: MILLER, J. D. & TRENHOLM, H. L. (Eds.). **Mycotoxins in Grain – Compounds Other than Aflatoxin**. St. Paul, USA: Eagan Press, 1994. p. 261 - 85.
- SCOTT, W. J. Water relations of food spoilage microorganisms. **Adv. Food Res.**, **7**: 83-127, 1957.
- SELKER, E. U. DNA methylation and chromatin structure: a view from below. **Trends Biochem. Sci.**,**15**: 103-7, 1990.
- SELKER, E. U. Epigenetic phenomena in filamentous fungi: useful paradigms or repeated-induced confusion? **Trends Genet.**, **13**: 296-301, 1997.

- SELKER, E. U. & GARRETT, P. W. DNA sequence duplications trigger gene inactivation in *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, **85**: 6870-4, 1988.
- SELKER, E. U.; CAMBARERI, E. B.; JENSEN, B. C.; HAACK, K. R. Rearrangement of duplicated DNA in specialized cells of *Neurospora*. **Cell**, **51**: 741-52, 1987a.
- SELKER, E. U.; JENSEN, B. C.; RICHARDSON, G. A. A portable signal causing faithful DNA methylation *de novo* in *Neurospora crassa*. **Science**, **238**: 48-53, 1987b.
- SINHA, R. N. Ecology of storage. **Ann. Technol. Agric.**, **22**: 351-69, 1973.
- SKORY, C. D.; HORNG, J. S.; PESTKA, J. J.; LINZ, J. E. Transformation of *Aspergillus parasiticus* with a homologous gene (*pyrG*) involved in pyrimidine biosynthesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, **56**: 3315-20, 1990.
- SKORY, C. D.; CHANG, P.-K.; CARY, J.; LINZ, J. E. Isolation and characterization of a gene from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversion of versicolorin A to sterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, **58**: 3527-37, 1992.
- SKORY, C. D.; CHANG, P.-K.; LINZ, J. E. Regulated expression of the *nor-1* and *ver-1* genes associated with aflatoxin biosynthesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**: 1642-6, 1993.
- SMITH, J. E. & MOSS, M. O. **Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance**. Great Britain: John Wiley & Sons, 1985, 148 p.
- SNOW, D. Germination of mould spores at controlled humidities. **Ann. Appl. Biol.**, **36**: 1-13, 1949.
- SOARES, L. M. V. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, **72**: 22-6, 1989.

- SPEARE, A. T. Fungi parasitic upon insects injurious to sugar cane. **Hawaii. Sugar Plant. Assoc. Exp. St., Pathol. Physiol. Ser.**, Bull. 12, p. 1 - 62, 1912.
- SPENCER, J. B. & JORDAN, P. M. Purification and properties of 6-methylsalicylic acid synthase from *Penicillium patulum*. **Biochem. J.**, **288**: 839-46, 1992.
- STACK, M. & RODRICKS, J. V. Method for analysis and chemical confirmation of sterigmatocystin. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, **54**: 86-90, 1971.
- STEYN, P. S.; VLEGGAR, R.; WESSELS, P. L. The biosynthesis of aflatoxin and its congeners. *In*: STEYN, P. S. (Ed.). **Biosynthesis of Mycotoxins: A Study in Secondary Metabolism**. New York: Academic Press, 1980, p. 105-55.
- SUZUKI, D. T.; GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. **Introdução à Genética**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p.76-120.
- TERAO, K.; ITO, E.; UDAGAWA, S.; KAWAI, K.; NOZAKA, K. [Acute intoxication induced by emestrin, a new mycotoxin from *Emericella* species.] **Maikotokishin (Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.)**, **27**: 31-2, 1988.
- TICE, G. & BUCHANAN, R. L. Regulation of aflatoxin biosynthesis: effect of exogenously supplied cyclic nucleotides. **J. Food Sci.**, **47**: 153-7, 1981.
- TILBURN, J.; ROUSSEL, F.; SCAZZOCCHIO, C. Insertional and cloning of the *wA* gene of *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, **126**:81-90, 1990.
- TIMBERLAKE, W. & MARSHALL, M. A. Genetics engineering of filamentous fungi. **Science**, **244**:1313-7, 1988.
- TOWNSEND, C. A.; MCGUIRE, S. M.; BROBST, S. W.; GRAYBILL, T. L.; PAL, K.; BARRY, C. E. Examination of tetrahydro- and dihydrobisfuran formation in aflatoxin biosynthesis: from whole cells to purified enzymes. *In*: PETROSKI, R. J.; McCORMICK, S. P. (Eds.). **Secondary Metabolite Biosynthesis and Metabolism**. New York: Plenum Press, 1991. p. 141-54.

- TRAIL, F.; CHANG, P.-K.; CARY, J.; LINZ, J.E. Structural and functional analysis of the *nor-1* gene involved in the biosynthesis of aflatoxins by *Aspergillus parasiticus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60**: 4078-85, 1994.
- TRAIL, F.; MAHANTI, N.; LINZ, J. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. **Microbiology**, **141**: 755-65, 1995a.
- TRAIL, F.; MAHANTI, N.; RARICK, M.; MEHIGH, R.; LIANG, S. -H., ZHOU, R.; LINZ, J. E. Physical and transcriptional map of an aflatoxin gene cluster in *Aspergillus parasiticus* and functional disruption of a gene involved early in the aflatoxin pathway. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61**: 2665-73, 1995b.
- TROLLER, J. A.; BERNARD, D. T.; SCOTT, N. C. Measurement of water activity. *In*: SPECK, L. M. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. New York: American Public Health Association, 1984. p. 124-34.
- VAN DE VATE, C. & JANSEN, G. J. O. Meiotic recombination in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. **Genet. Res.**, **31**: 29-52, 1978.
- VAN DER WATT, J. J. Sterigmatocystin. *In*: PURCHASE, I. F. H. (Ed.). **Mycotoxins**. Amsterdam: Elsevier, 1974. p. 369.
- VAN EGMOND, H. D.; PAULSCH, W. E.; DEIJLL, E.; SCHULLER, P. L. Thin layer chromatographic method for analysis and chemical confirmation of sterigmatocystin in cheese. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, **63**: 110-4, 1980.
- VINING, L. C. Functions of secondary metabolites. **Annu. Rev. Microbiol.**, **44**: 395-427, 1990.
- VUILLEMIN, P. *Sartorya*, nouveau genre de Plectascinées angiocarpes. **Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.**, **184**: 136-7, 1927.
- WADDINGTON, C. H. Epigenetics and evolution. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, **7**: 186-99, 1953.

- WATANABE, C. M. H.; WILSON, D.; LINZ, J. E.; TOWNSEND, C. A. Demonstration of the catalytic roles and evidence for the physical association of type I fatty acid synthases and a polyketide synthase in the biosynthesis of aflatoxin. **Chem. Biol.**, **3**: 463-9, 1996.
- WEINBERG, E. D. Biosynthesis of microbial metabolites—regulation by mineral elements and temperature. *In*: KRUMPHANZL, V.; SIKYTA, B. & VANEK, Z. (Eds.). **Overproduction of Microbial Products**. London: Academic Press, 1982. p. 181-94.
- WEISSHAAR, B.; LANGNER, K.; JÜTTERMANN, R.; MÜLLER, U.; ZOCK, C.; KLIMKAIT, T.; DOERFLER, W. Reactivation of the methylation-inactivated late E2A promoter of adenovirus type 2 by E1A (13S) functions. **J. Mol. Biol.**, **202**: 255-70, 1988.
- WICKLOW, D. T. & COLE, R. J. Tremorgenic indole metabolites and aflatoxins in sclerotia of *Aspergillus flavus*: an evolutionary perspective. **Can. J. Bot.**, **60**: 525, 1982.
- WINTER, G. Die Pilze Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. **Rabenhorst's Kryptogamen-Flora**, 2.ed., **1**: 62, 1884.
- WLOSTOWSKI, T.; BERNACKA, B.; PEPINSKI, W. The relationship of mycelial zinc to aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Acta Microbiol. Pol.**, **38**: 37-43, 1989.
- WOLOSHUK, C. P.; SEIP, E. R.; PAYNE, G.; ADKINS, C. R. Genetic transformation system for the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **55**: 86-90, 1989.
- 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. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60**: 2408-14, 1994.
- WOLOSHUK, C. P. & PRIETO, R. Genetic organization and function of the aflatoxin B₁ biosynthetic genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, **160**: 169-76, 1998.

- WORLD Health Organization - Environmental Health Criteria 11 - **Mycotoxins**. Geneva: WHO, 1979, 127 p.
- WU, F. Y. H. & WU, C. W. The role of zinc in DNA and RNA polymerases. *In: SIGEL, H. (Ed.). Zinc and its Role in Biology and Nutrition*. New York: Marcel Dekker, 1983. p. 157-92.
- YE, F. & SIGNER, E. R. RIGS (repeat-induced gene silencing) in *Arabidopsis* is transcriptional and alters chromatin configuration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **93**: 10881-6, 1996.
- YELTON, M. M.; TIMBERLAKE, W. E.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. A cosmid for selecting genes by complementation in *Aspergillus nidulans*: selection of the developmentally regulated *yA* locus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **82**: 834-8, 1985.
- YISRAELI, J.; FRANK, D.; RAZIN, A.; CEDAR, H. Effect of *in vitro* DNA methylation on β -globin gene expression. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **85**: 4638-42, 1988.
- YU, F. L.; GERONIMO, I. H.; BENDER, W.; PERMTHAMSIN, J. Correlation studies between the binding of aflatoxin B₁ to chromatin components and the inhibition of RNA synthesis. **Carcinogenesis**, **9**: 527-32, 1988.
- YU, F. L.; BENDER, W.; GERONIMO, I. H. Base and sequence specificities of aflatoxin B₁ binding to single and double-stranded DNAs. **Carcinogenesis**, **11**: 475-8, 1990.
- YU, J.; CARY, J. W.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; KELLER, N. P.; CHU, F. S. Cloning and characterization of a cDNA from *Aspergillus parasiticus* encoding an O-methyltransferase involved in aflatoxin biosynthesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**: 3564-71, 1993.
- YU, J.; CHANG, P. K.; CARY, J. W.; WRIGHT, M.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; PAYNE, G. A.; LINZ, J. E. Comparative mapping of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61**: 2365-71, 1995.

- 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 *Aspergillus flavus*. **Curr. Genet.**, **29**: 549-55, 1996.
- ZÄHNER, H.; ANKE, H.; ANKE, T. Evolution and secondary pathways. *In*: BENNETT, J. W. & CIEGLER, A. (Eds.). **Secondary Metabolism and Differentiation in Fungi**. New York: Marcel Dekker, 1983. p. 153-71.
- ZERINGUE, H. J. Jr. Possible involvement of lipoxigenase in a defense response in aflatoxigenic *Aspergillus*-cotton plant interactions. **Can. J. Bot.**, **74**: 98-102, 1996.
- ZUCCHI, T. M. A. D. **Estudos de fatores genéticos que alteram as frequências de recombinação em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter**. Ribeirão Preto, 1986. v.1. 244 p. [Tese de Livre-Docência - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo].
- ZUCCHI, T. M. A. D. RNA-mediated transformation of *Aspergillus nidulans* recovers gene functions lost by deletion or by point mutations. **Cell. Mol. Biol.**, **42**: 889-904, 1996.

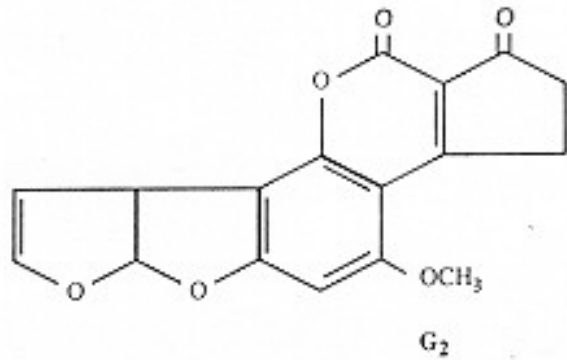
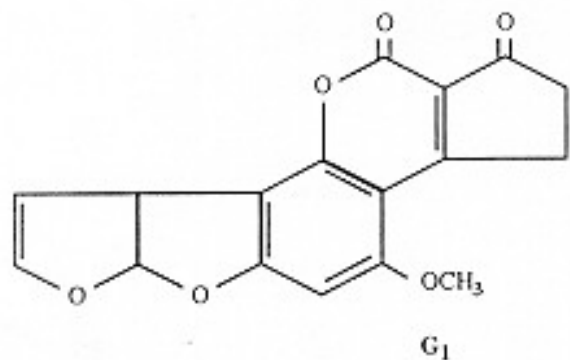
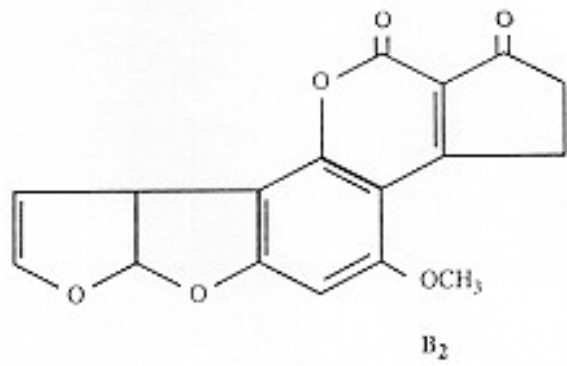
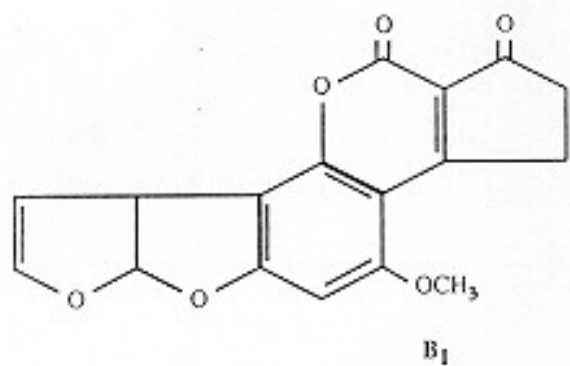


Figura 2 – Estrutura química das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

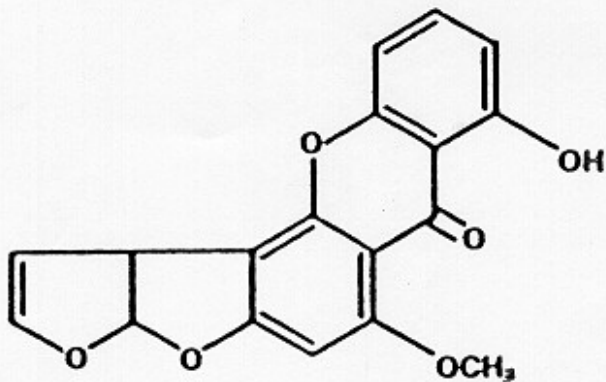
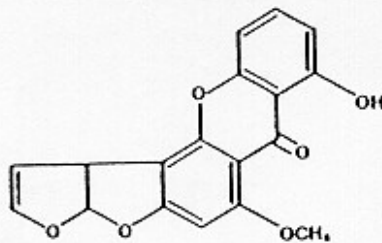
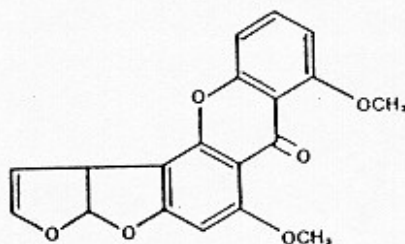


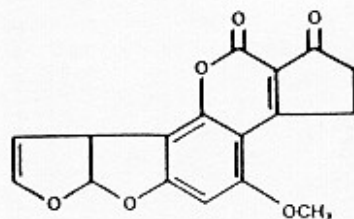
Figura 3 – Estrutura química da esterigmatocistina.



Esterigmatocistina



O-metilesterigmatocistina



Aflatoxina

Figura 4 – Conversão da esterigmatocistina à aflatoxina B₁ (CLEVELAND *et alii*, 1987).

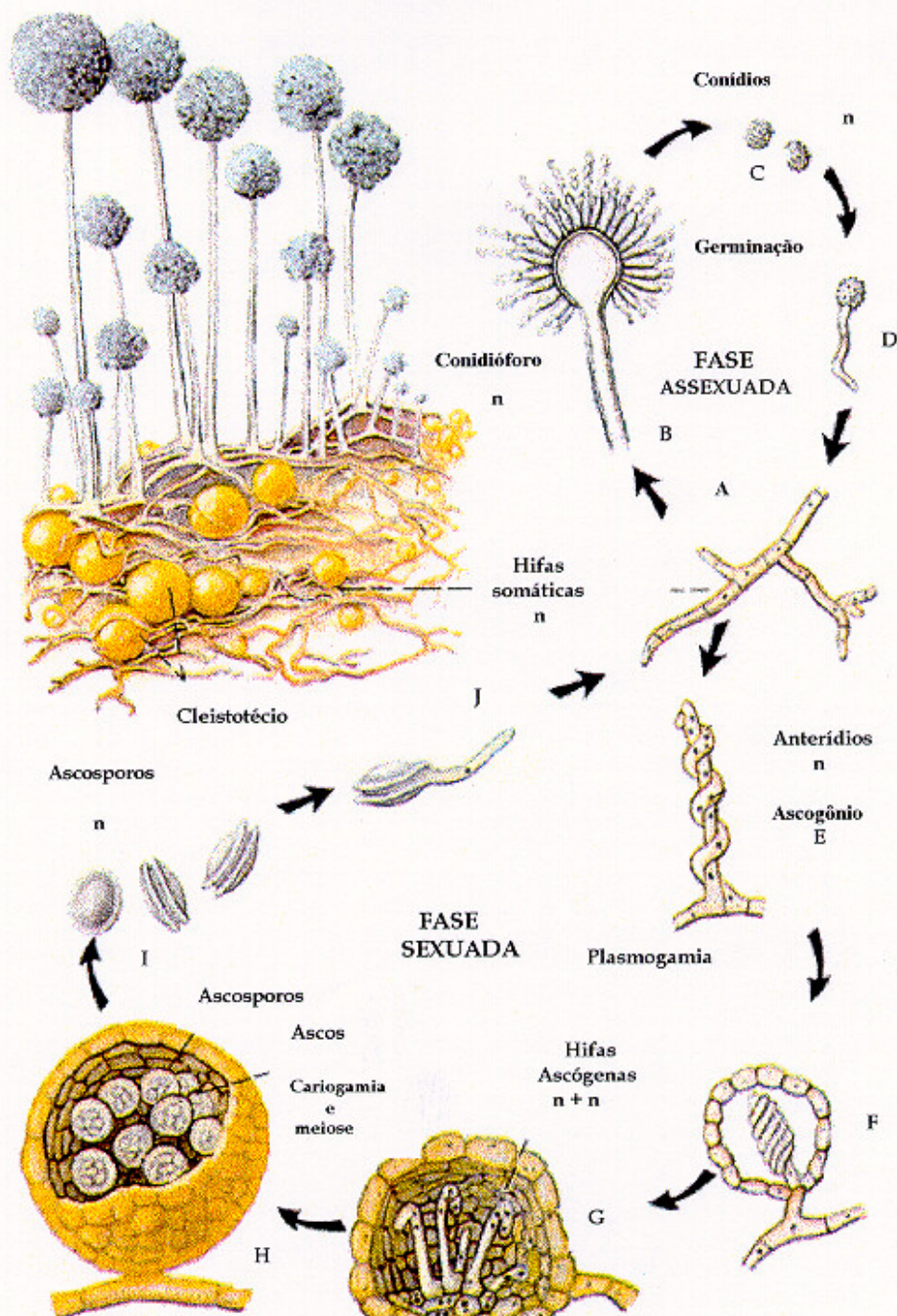


Figura 5 – Ciclo de vida de *Emericella nidulans*. **A - D** fase de reprodução assexuada, haplóide, na qual as hifas somáticas se desenvolvem no substrato e produzem conidióforos com cabeças conidiais. Os conídios germinam e se desenvolvem nas hifas somáticas. **E - J** fase de reprodução sexuada, que envolve a formação de ascogônios e anterídios multinucleados, freqüentemente helicoidais. Eles se enrolam um no outro, os núcleos do anterídio migram para o ascogônio e permanecem aos pares sem ocorrer fusão. As hifas ascógenas dicarióticas se desenvolvem no interior do ascocarpo (cleistotécio) e dão origem aos ascos, cada um deles com 8 ascosporos binucleados. Cada ascosporo, quando livre, germina e origina hifas somáticas (Adaptado de HERRERA & ULLOA, 1990).

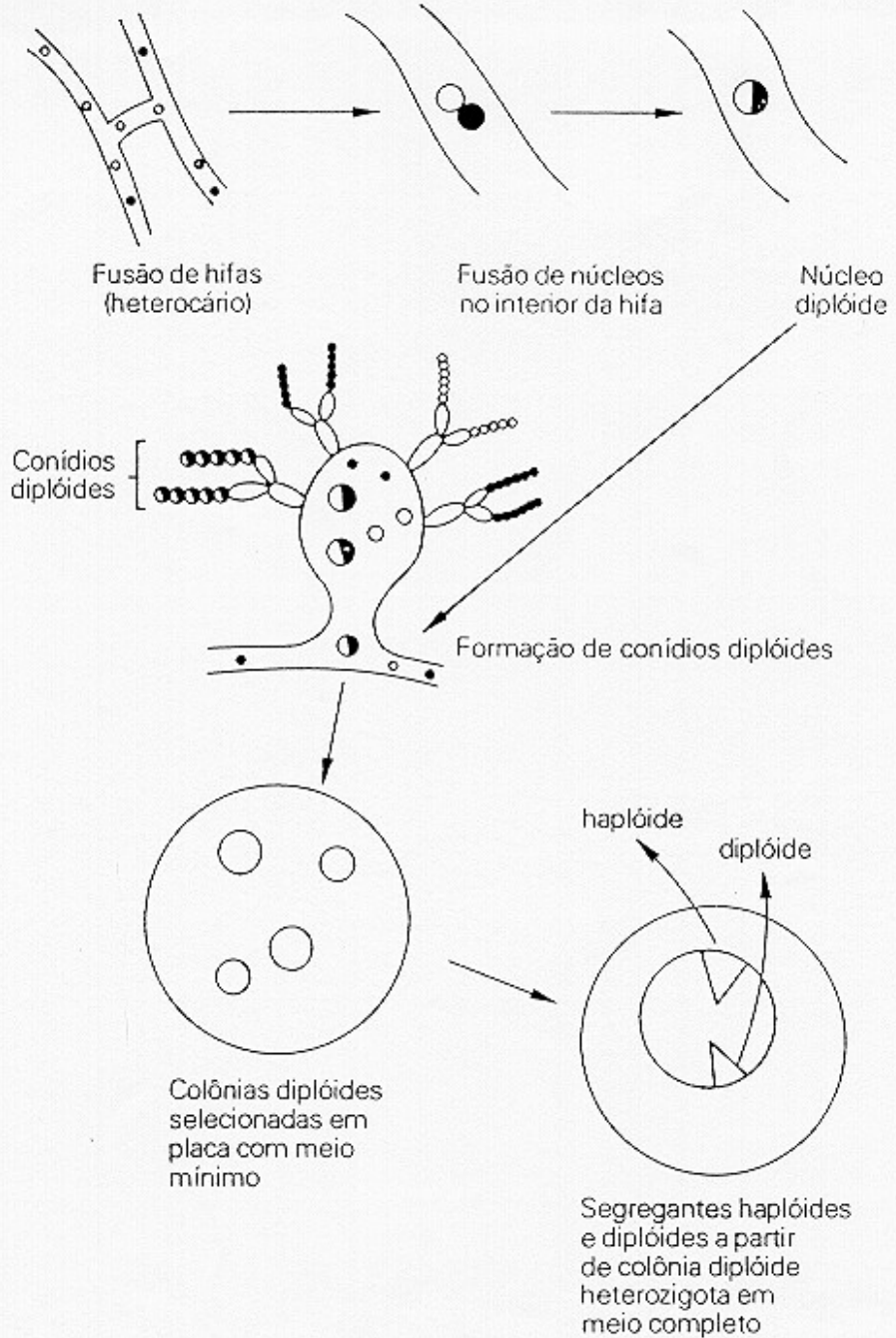


Figura 6 - Ciclo parassexual em *Aspergillus* spp (AZEVEDO, 1987).

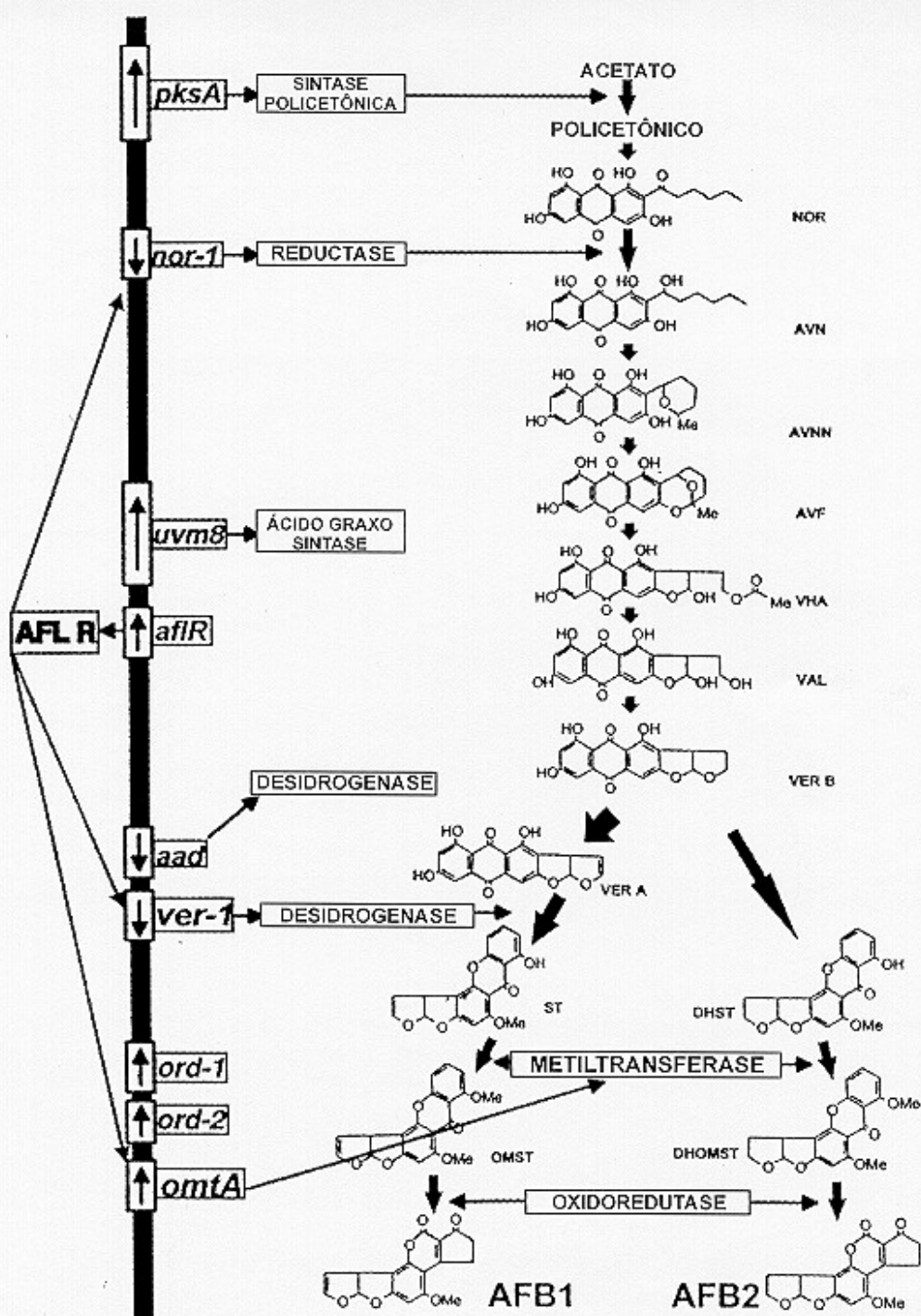


Figura 7 – Genes e enzimas da via biossintética das aflatoxinas B₁ e B₂ em *A. parasiticus* e *A. flavus*. O gene regulatório *aflR*, que codifica a enzima regulatória AFLR, controla a expressão dos genes estruturais *nor-1*, *ver-1* e *omtA*. O produto do gene *ver-1* não foi totalmente caracterizado; os passos catalíticos de *uvm8* (ácido-graxo sintase) e *aad* (aril-álcool desidrogenase) não foram definidos; os produtos dos genes *ord-1* e *ord-2* estão sendo estudados. O tamanho aproximado, a localização relativa e a direção de transcrição dos genes identificados estão indicados. A transcrição dos genes estruturais *nor-1*, *ver-1* e *omtA* é regulada pela AFLR. Abreviaturas : NOR, ácido norsolorínico; AVN, averantina; AVNN, averufanina; AVF, averufina; VHA, acetato versiconal hemiacetal; VHOH versiconal; VER B, versicolorina B; VER A, versicolorina A; ST, esterigmatocistina; DST, dihidroesterigmatocistina; OMST, O-metil esterigmatocistina; DHOMST, dihidro-O-metil esterigmatocistina; AFB₁ e AFB₂ aflatoxinas B₁ e B₂ (YU *et alii*, 1995).

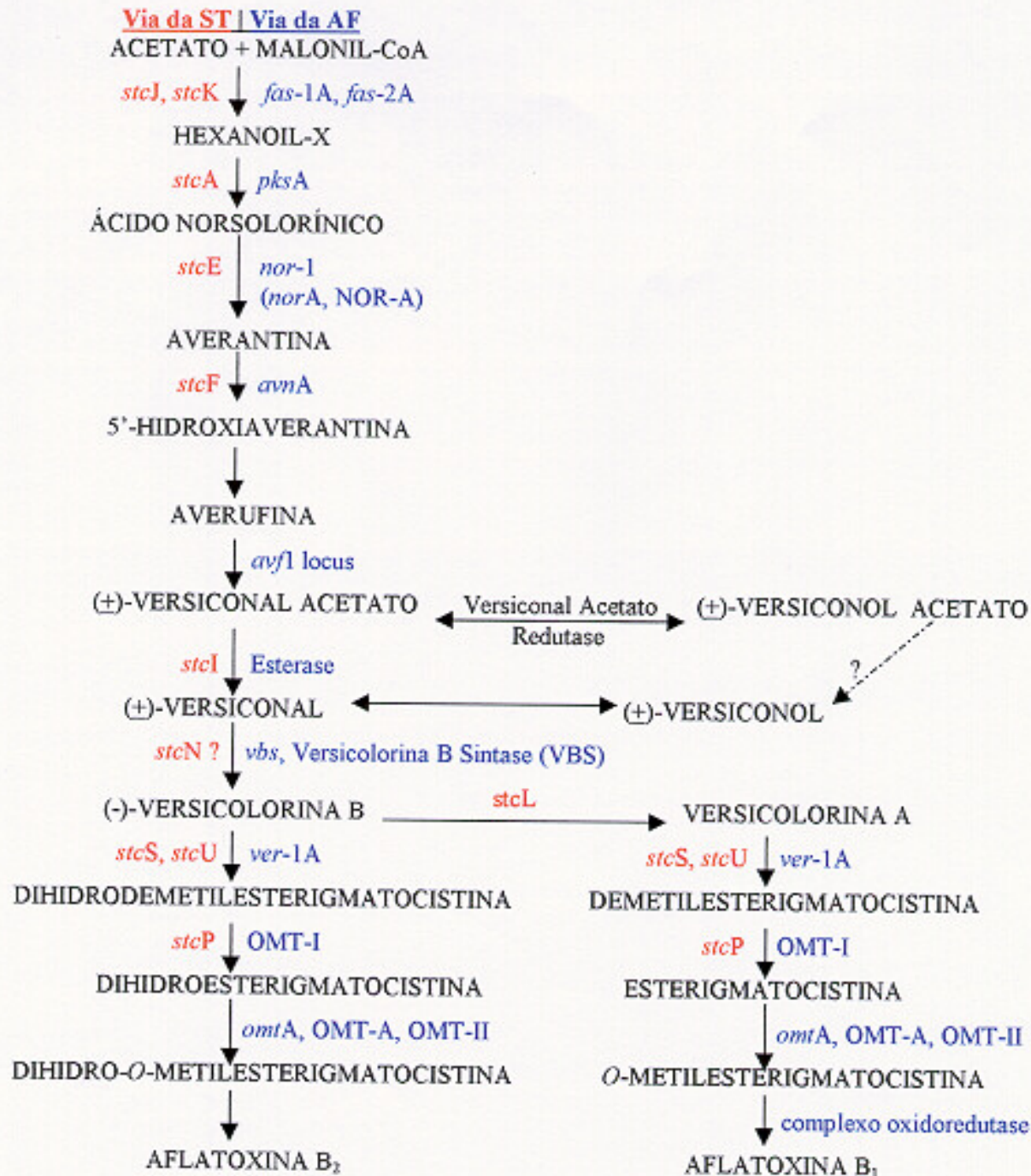


Figura 9 – Comparação entre as vias biossintéticas da esterigmatocistina em *A. nidulans* e aflatoxina em *A. parasiticus* (MINTO & TOWNSEND, 1997).



Figura 10 – Colônias de *Aspergillus nidulans* UT44 (branca), UT184 (chartreuse) e UT196 (amarela), crescidas em placa de MC a 37°C por 2 dias.



Figura 11 – Fotomicrografia do microcultivo de *Aspergillus nidulans*. Presença de cabeças conidiais bisseriadas e células Hülle de paredes duplas e refringentes (aumento de 400 x).



Figura 12 – Frascos contendo 40g de meio de aveia com a linhagem UT196. Nota-se a pigmentação avermelhada na superfície do meio, logo abaixo do micélio.

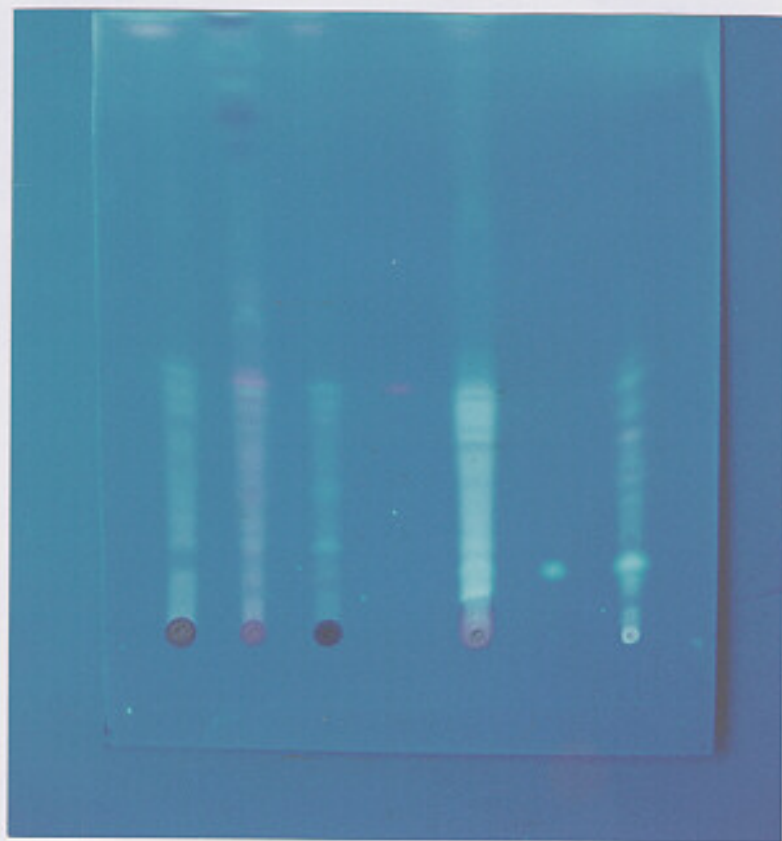


Figura 13 – Placa cromatográfica sob luz ultravioleta. Coluna 1: UT184; coluna 2: UT196; coluna 3: UT448; coluna 4: padrão ST [20µg/ml]; coluna 5: *A. parasiticus*; coluna 6: padrão AFB₁ [10µg/ml]; coluna 7: padrão qualitativo de AF.

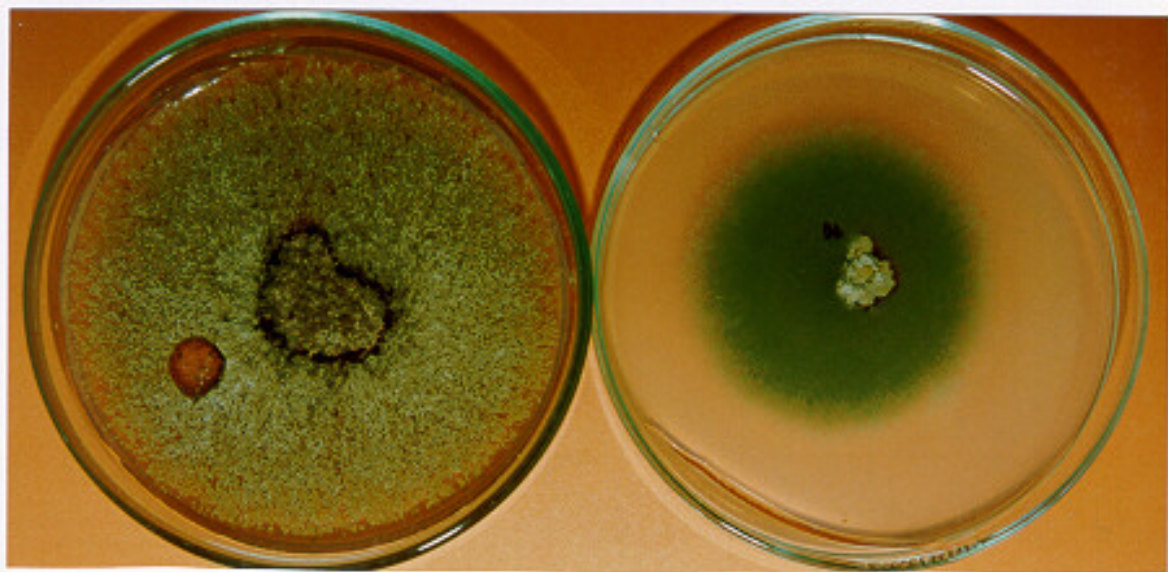


Figura 15 – Diplóide UT448//UT196, de cor verde, isolado a partir de uma placa heterocariótica.

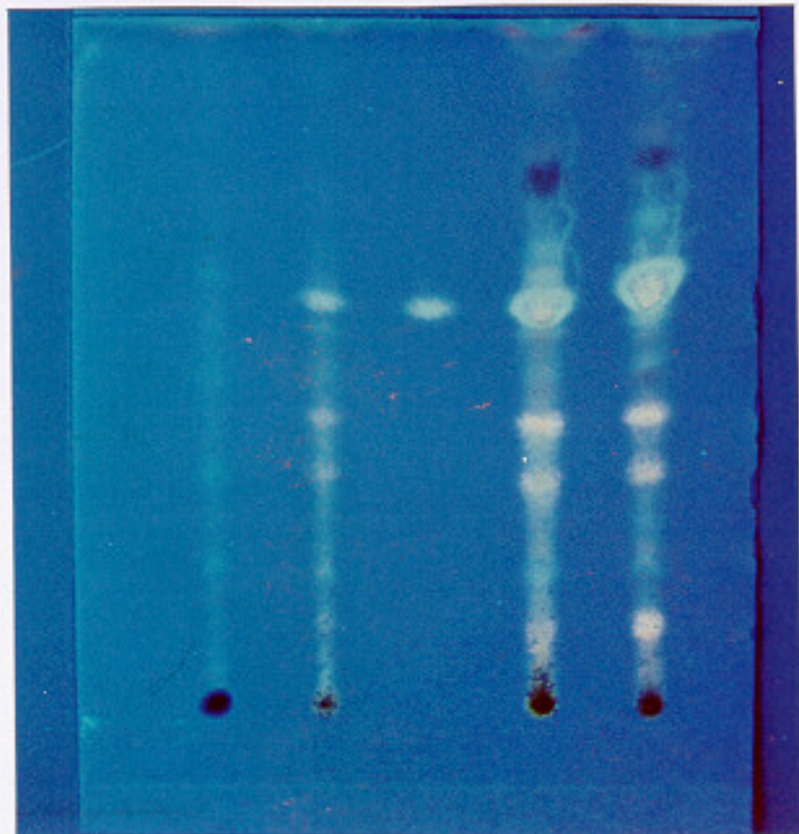


Figura 16 – Placa cromatográfica sob luz U.V. Coluna 1: paternal UT448 ST⁻; coluna 2: paternal UT196 ST⁺; coluna 3: padrão ST [20µg/ml]; colunas 4 e 5: diplóide UT448//UT196 ST⁺. A cor vermelho-tijolo da ST mudou para amarelo-esverdeado por causa do revelador AlCl₃.

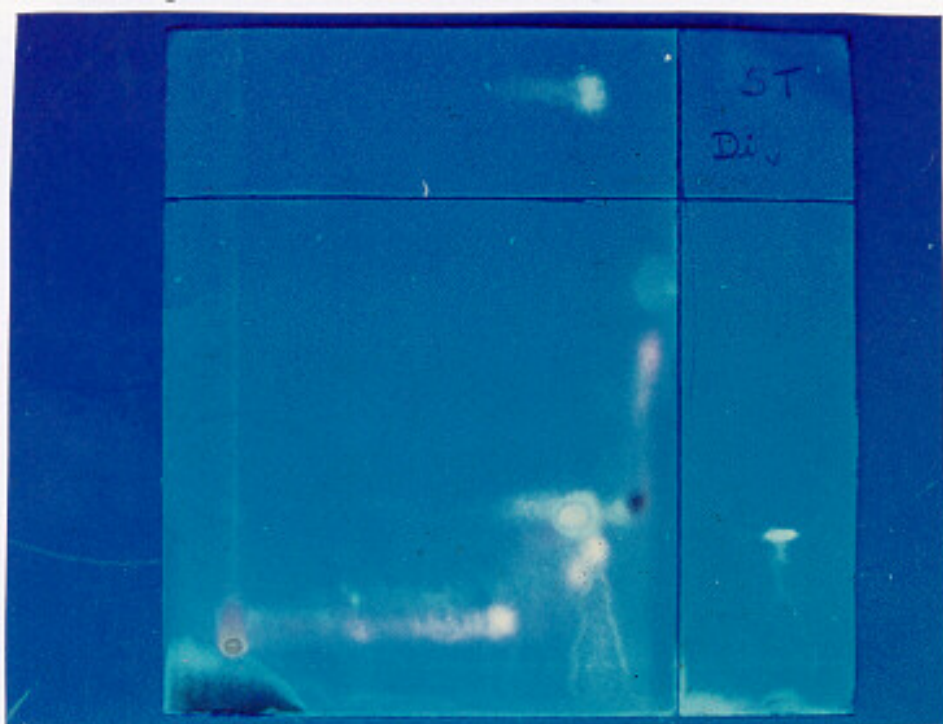
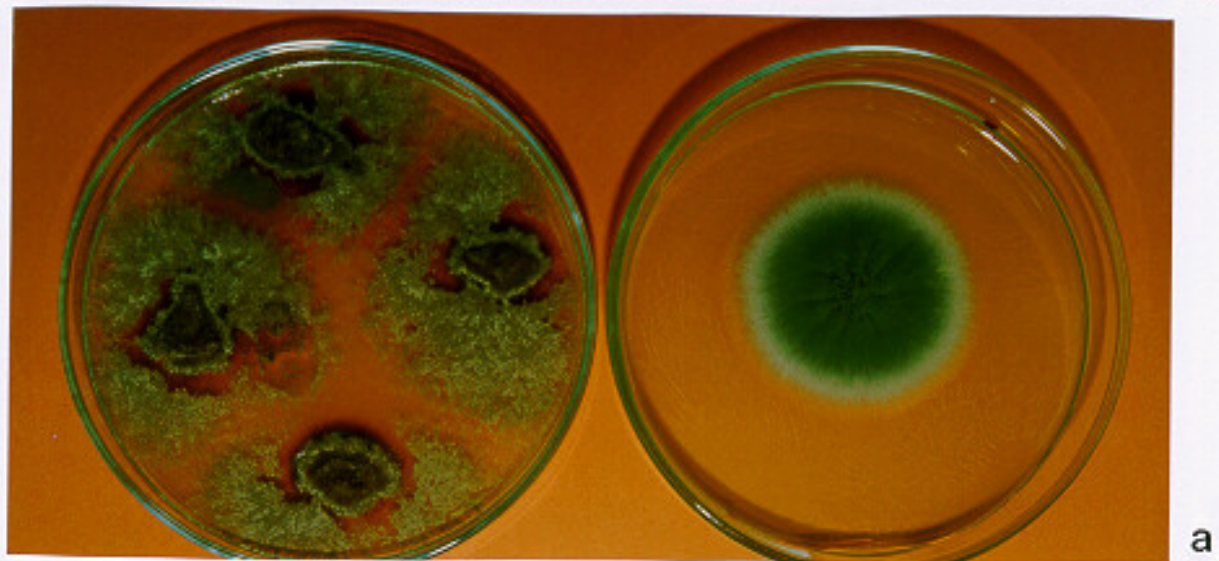


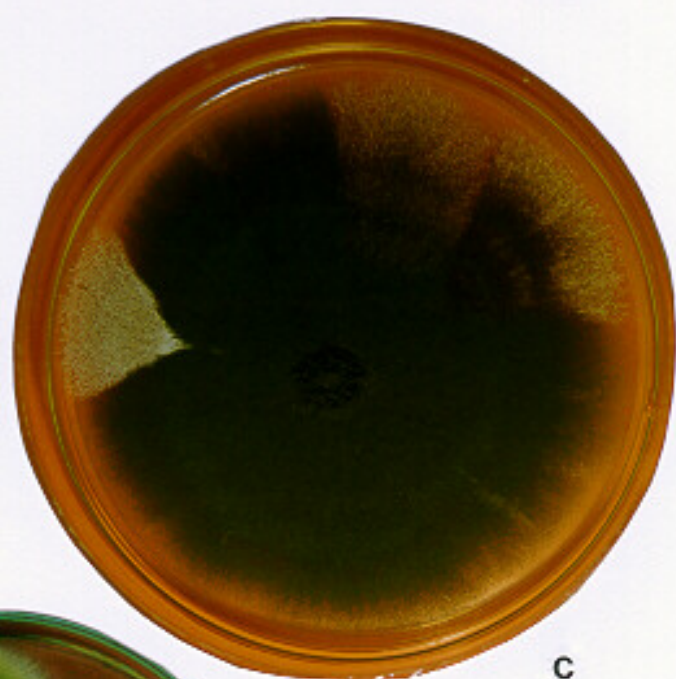
Figura 17 – Placa de cromatografia bidimensional do diplóide UT448//UT196 com revelador.



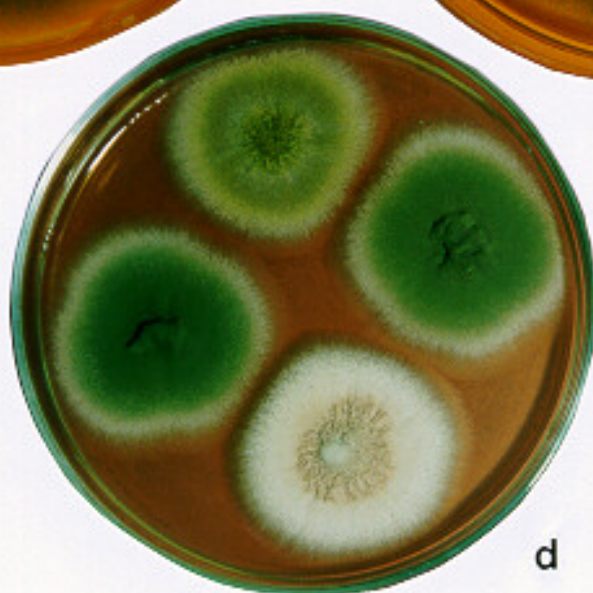
a



b



c



d

Figura 19 – Seqüência do isolamento de segregantes mitóticos haplóides. a) placa com regiões heterocarióticas de UT448 e UT184 em MM (esquerda) e diplóide UT448//UT184 isolado em MC (direita); b) e c) diplóide UT448//UT184 com vários setores coloridos haplóides em MC; d) setores haplóides isolados do diplóide UT448//UT184 e purificados em MC.



Figura 20 – Placa cromatográfica contendo “plugs” de meio de aveia com o fungo.

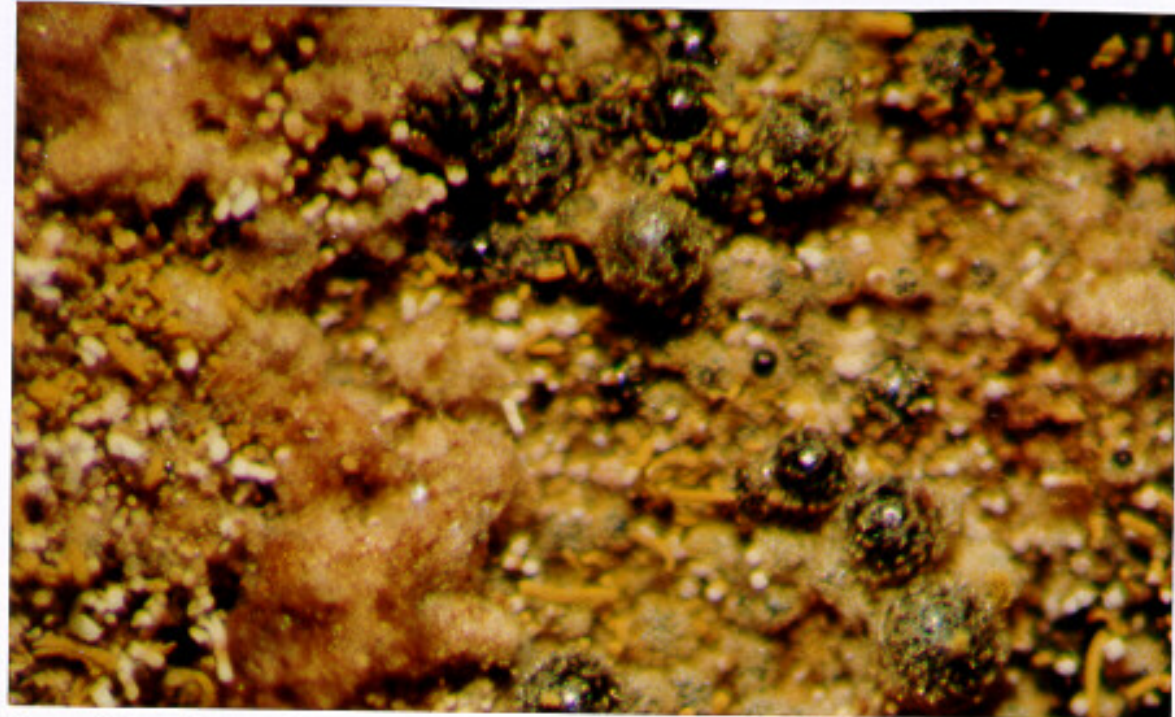


Figura 21 – Fotomicrografia em estereomicroscópio da região heterocariótica formada pelo cruzamento entre UT448 x UT196, evidenciando cleistotécios pretos envolvidos por uma camada de células Hülle, crescidos em placa vedada de MM por 18 dias a 37°C (aumento 35 x).

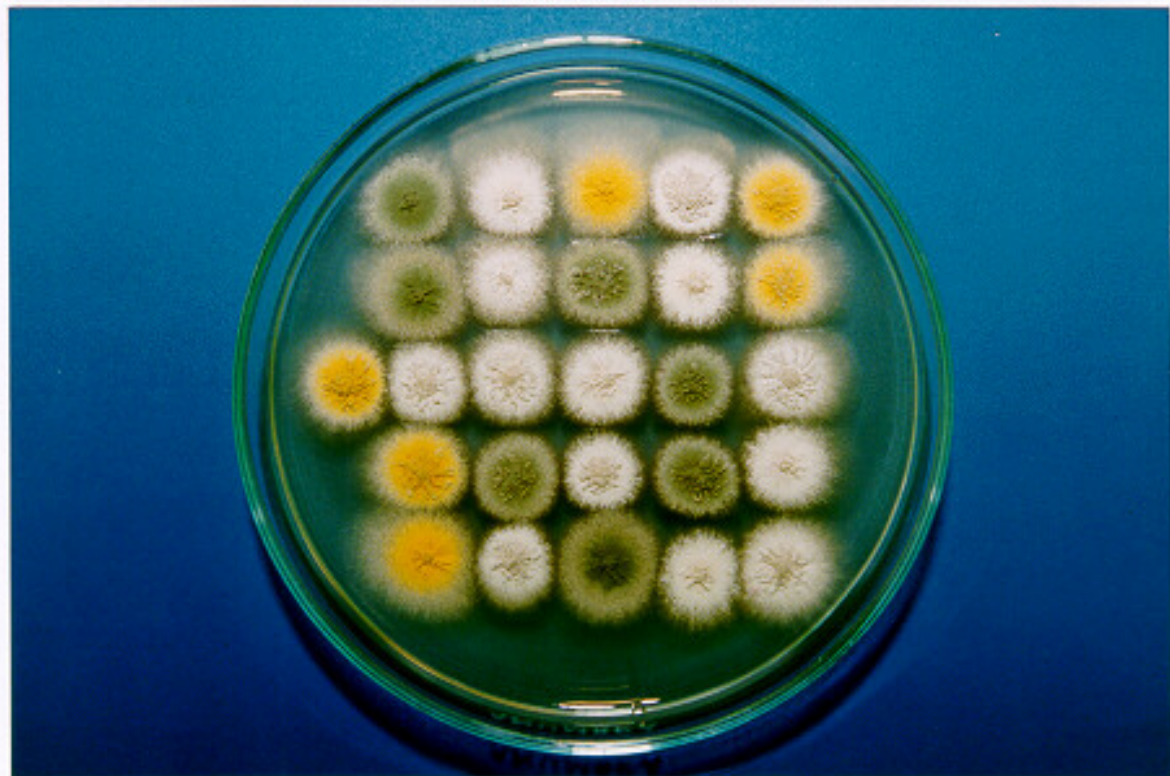


Figura 22 – Placa mestra contendo 25 colônias em posições definidas (padrão 5x5). No lado esquerdo, colônia controle UT196.

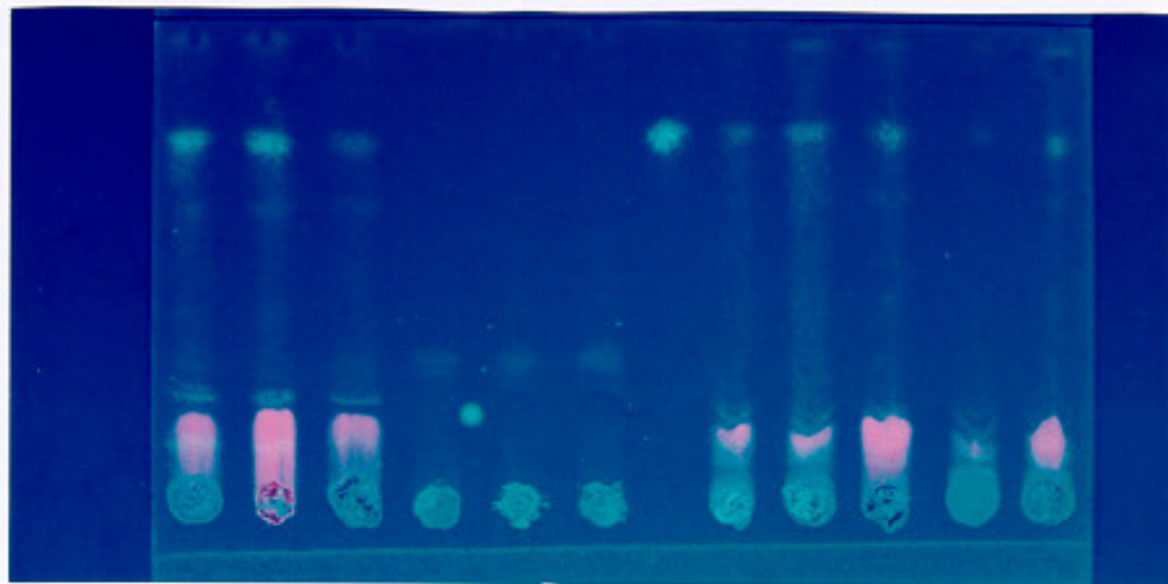


Figura 23 – Placa cromatográfica de alguns segregantes meióticos. Colunas 1 à 3, 9 à 11 e 13: segregantes produtores de ST; colunas 4, 6 e 7: segregantes não produtores de ST; coluna 12: segregante com produção intermediária de ST; coluna 5: padrão de OMST [50 $\mu\text{g/ml}$] $R_f = 0,13$; coluna 8: padrão de ST [20 $\mu\text{g/ml}$] $R_f = 0,7$.

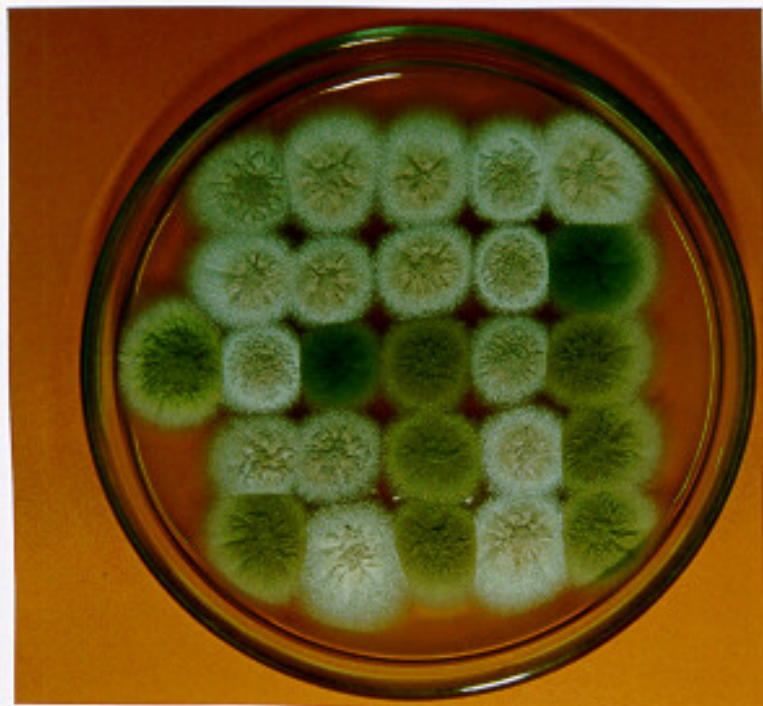


Figura 25 – Placa mestra contendo 25 colônias em posições definidas (padrão 5x5). No lado esquerdo, colônia controle UT184.

