

Mineração genômica de *Penicillium labradorum* INPA-AP10: prospecção de Produtos Naturais em linhagem isolada de sedimentos do rio Amazonas

Silva, José Carlos Ipuchima¹; Neves, Kiandro de Oliveira Gomes²; Queiroz, Claudia Afras de^{3,5}; Yamagishi, Michel Eduardo Beleza⁴; Koolen, Hector Henrique Ferreira⁵; Silva, Gilvan Ferreira⁶

¹Universidade do Estado do Amazonas, ²Universidade Federal do Amazonas, ³Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, ⁴Embrapa Digital, ⁵Universidade do Estado do Amazonas, ⁶Embrapa Amazônia Ocidental
E-mail: gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

A procura por produtos naturais (PN) de origem microbiana vem aumentando nos últimos anos. Nesse sentido, fungos do gênero *Penicillium* ganham destaque pela capacidade de biossintetizar uma ampla diversidade de metabólitos secundários que podem ser aplicados na indústria farmacêutica e na agricultura. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi realizar mineração genômica de agrupamentos gênicos relacionados à biossíntese de PN de *Penicillium labradorum* INPA-AP10, uma linhagem isolada de sedimentos do rio Amazonas. Inicialmente o DNA genômico foi extraído pelo método CTAB 2% e sequenciado na plataforma Illumina[®]. Após a montagem do genoma foi realizada a predição de BGC's (*Biosynthetic Gene Clusters*) com o antiSMASH 7.0, na versão para fungos. Foram identificados 35 BGC's sendo 10 PKS (policetídeo sintase), 5 NRPS (sintase de peptídeo não ribossomal), 5 NRPS-like, 6 terpenos, 2 betalactonas, 4 Fungal-RiPP e 3 BGC's híbridos (NRP-metallophore/ NRPS, betalactone/NRPS, T1PKS/NRPS-like). Quatro clusters preditos (BGC: 3, 8, 10 e 29) exibiram altos níveis de similaridade ($\geq 70\%$) com vias de biossíntese já caracterizadas e disponíveis na base de dados MIBiG (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster*), enquanto 2 (BGC: 13 e 23) exibiram similaridade moderada (30-70%) e 3 (BGC: 1, 2 e 6) mostraram baixa similaridade (1-29%), 26/35 clusters não apresentam nenhuma similaridade com BGC's conhecidos. Apesar de alguns clusters apresentarem alta similaridade, a análise de sintenia revela que esses BGC's não conseguem formar os PN correspondentes às vias já caracterizadas, indicando que a linhagem INPA-AP10 pode produzir novas moléculas ou sintetizar PN com estrutura química semelhante. A partir dos BGC's que apresentaram alta similaridade foi possível prever o potencial para produção do sideróforo dimetil coprogênio e nidulanina A. Este estudo revela o alto potencial de *P. labradorum* INPA-AP10 para produção de novos metabólitos secundários ou para PN não conectados a suas vias de biossíntese. Sendo este o primeiro estudo genômico de *P. labradorum* voltado à prospecção de metabólitos secundários.

Palavras-chave: genômica, BGC, mineração, *Penicillium*.

Introdução

A adaptação dos microrganismos a diversos ambientes, bem como a necessidade de defesa contra outros organismos, resultou no surgimento de compostos bioativos com ampla diversidade química. Essa diversidade de produtos naturais (PN) biossintetizados por microrganismos pode ser utilizada na agricultura e em diferentes segmentos da indústria, como a de cosméticos, farmacêutica, entre outros (Brakhage 2013; Katz et al. 2016).

Dentre os microrganismos capazes de sintetizar PN estão os fungos, que são bastante conhecidos pela capacidade de produzir uma grande variedade de moléculas biologicamente ativas, tais como: antiparasitários, antibacterianos, antifúngicos, antitumorais e imunossupressores (Gaynes 2017).

No reino Fungi, espécies do gênero *Penicillium* são encontradas comumente na vegetação em decomposição, no solo e no ar. Este gênero é conhecido historicamente pela produção de antibióticos, como a penicilina que possui atividade antibacteriana de amplo espectro, como o antitumoral ácido clavárico e a micotoxina ácido penicílico (Houbrake 2016; Perrone 2017).

A biossíntese de produtos naturais em microrganismos, na maioria das vezes, está associada a agrupamentos gênicos responsáveis por sua biossíntese, também conhecidos como *Biosynthetic Gene Clusters* (BGC). A identificação de BGC's associados a moléculas de interesse é um campo crescente, e essa abordagem tem recebido o nome de "mineração genômica", e pode ser realizada com base em ferramentas de bioinformática como o antiSMASH (Madema et al. 2021).

A plataforma antiSMASH é de acesso público e está disponível online desde 2011, utilizada para detectar e caracterizar BGC's em genomas de bactérias, fungos e plantas. A versão 6.0 do software é capaz de identificar 71 tipos diferentes de clusters depositados no MIBiG (Blin et al. 2021). A base de dados MIBiG apresenta 2502 BGC's cujos metabólitos secundários apresentam a via de biossíntese caracterizada com base em experimentos que combinam abordagem química e de genômica funcional (como gene Knockout, expressão heteróloga entre outras) utilizada para predizer a função de cada gene membro do BGC (Terlouw et al. 2023).

Os BGC's são localizados no genoma por meio de ferramentas que identificam a presença de genes que codificam enzimas para as principais

classes de metabólitos secundários, estes genes são chamados de “*gene core*” (Coussement et al. 2020). A identificação das classes de metabólitos secundários com base nos BGC’s e a predição de PN por meio da composição de genes presentes no agrupamento, representa um avanço na bioprospecção de moléculas a partir de genomas completos sequenciados (Abbasi et al. 2020; Albarano et al. 2020; Lin et al. 2020).

A mineração ainda possibilita a identificação dos chamados clusters órfãos, que estão relacionados à biossíntese de moléculas novas, revela BGC’s que estão silenciados, além daqueles que são crípticos. Os BGC’s crípticos apresentam baixa expressão o que dificulta a identificação química das moléculas relacionadas a esse tipo de BGC. (Seyedsayamdost et al. 2020).

Conseqüentemente, o acúmulo de informações genômicas têm mostrado que a capacidade metabólica de muitos microrganismos é amplamente subestimada, visto que em condições de laboratório a maioria dos BGC’s estão silenciados ou são crípticos (Medema et al. 2021). Contudo a mineração genômica combinada com técnicas de cultivo como OSMAC ou ferramentas de edição gênica pode possibilitar o desbloqueio dessas vias de biossíntese e dessa forma explorar o potencial metabólico contido em cada genoma.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi realizar a mineração do genoma de *P. labradorum* INPA-AP10 a fim de explorar seu potencial biotecnológico para a biossíntese de PN.

Material e Métodos

O organismo selecionado para o presente estudo foi uma linhagem de *P. labradorum* isolado de amostras de sedimentos do rio Amazonas pela Embrapa Amazônia Ocidental, e depositado na coleção microbiológica do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, com o código INPA-AP10. Cadastro de Acesso ao patrimônio genético N° AB6B14F.

A espécie fúngica foi cultivada em caldo Batata Dextrose por 7 dias a 28°C e rotação de 150 rpm. Em seguida, a extração do DNA genômico foi realizada com CTAB (*Cetyl trimethyl ammonium bromide*) 2% de acordo com a metodologia de Doyle e Doyle (1987).

O genoma completo do isolado INPA-AP10 foi sequenciado na plataforma Illumina com read length: 2 x 150 (Paired End). A montagem “de novo” foi

realizada utilizando o SPAdes (Prjibelski et al. 2020). O genoma completo de *P. labradorum* INPA-AP10 apresentou um tamanho total de 26.3 Mb, com 205 scaffolds, 52% de conteúdo G/C, N50 de 631.997pb e L50 de 15.

Com base no genoma completo, a mineração genômica do isolado INPA-AP10 foi realizada usando a ferramenta antibiotics and Secondary Metabolites Analysis SHell (antiSMASH), versão 7.0 para fungos (fungiSMASH), com parâmetros de acordo com Blin et al. (2021).

Para os BGC's que apresentaram 100% de similaridade, foi realizada a análise de sintenia, por meio do pipeline Clinker & clustermap.js (Gilchrist & Chooi, 2021), com traduções de aminoácidos de genes em cada cluster extraídas e alinhadas usando o pacote BioPython (versão 3.1), a fim de determinar a identidade entre os genes dos BGC's preditos para a linhagem e os BGC's de referência depositados no MIBiG. Os domínios de PKS e NRPS foram determinados por meio das plataformas PKS/NRPS Analysis Web-site (<http://nrps.igs.umaryland.edu/>) e InterPro (www.ebi.ac.uk/interpro/).

Foram considerados novos clusters aqueles que inicialmente não apresentaram nenhuma similaridade com BGC's disponíveis no banco de dados MIBiG (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster*), e com base em análise manual e sintênica também foram considerados BGC's relacionados a novos PNs aqueles cuja a santeria não indicou correspondência em todos os genes presentes de vias biossintéticas já caracterizadas e com moléculas identificadas quimicamente (Medema et al. 2015; Epstein et al. 2018).

Resultados e Discussão

Foram identificados 35 BGC's, sendo as PKS as mais abundantes com 10 cluster localizados no genoma, destes 9 são PKSs (policetídeo sintase) do Tipo I e uma PKS Tipo 3, seguido por NRPS (peptídeo sintetase não ribossomal), NRPS-like (BGC's semelhante a NRPS), terpenos, betalactonas, e fungal-RiPP (peptídeos sintetizados ribossomalmente e modificados pós-traducionalmente), além dos BGC's híbridos (BGC's que combinam genes pertencente a mais de uma classe ou que apresenta um gene que codifica proteínas com domínios oriundo de diferentes classes) NRP-metallophore/NRPS, PKS T1/NRPS-like e betalactona/NRPS (Figura 1).

Dos 35 BGSs preditos (Tabela 1) 4 exibiram altos níveis de similaridade ($\geq 70\%$) com BGC's depositados no banco de dados MIBiG, dois exibiram similaridade moderada (30-69%) e 3 tiveram baixa similaridade (1-29%) e os 26 restantes não apresentaram similaridade com BGC's conhecidos, indicando que o genoma de *P. labradorum* INPA-AP10 74,2 % dos BGC estão relacionado a biossíntese de novos produtos naturais ou moléculas caracterizadas quimicamente, mas que não possui os genes relacionados a sua biossíntese ainda descritos ou depositados na base de dados MIBiG.

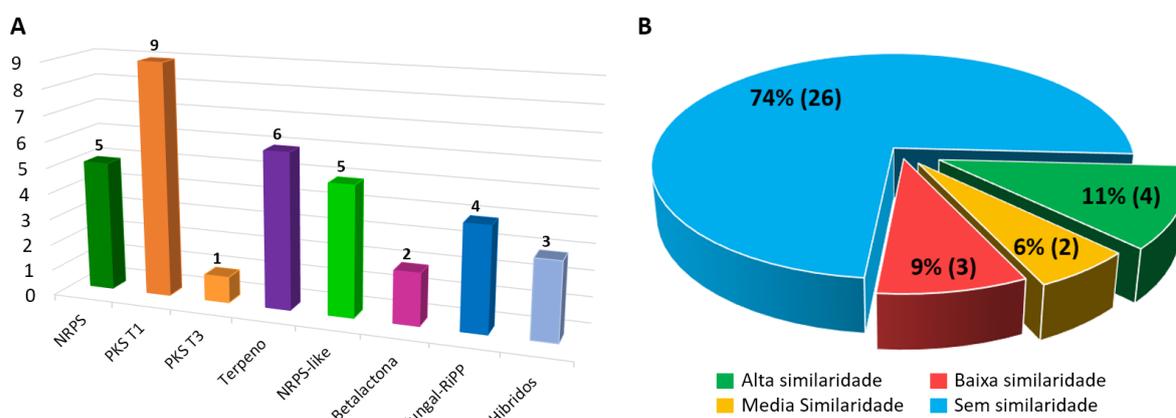


Figura 1 - Mineração genômica de *Penicillium labradorum* INPA-AP10. Em (A) distribuição de 35 BGC's identificados e distribuídos com bases na classe de produtos naturais relacionadas ao gene core: NRPS, PKS T1 e T3, terpeno, NRPS-like, betalactona, Fungal-RiPP e híbridos. Em (B) similaridade mensurada com base no número de genes que apresentam correspondência com vias de biossíntese já caracterizadas e depositadas na base de dados MIBiG que abriga anotações e metadados de BGC's e seus produtos moleculares, foi considerada alta similaridade ($\geq 70\%$), média moderada (30-69%), baixa similaridade (1-29%), sem similaridade (0%).

Policetídeo sintase (PKS) foi o tipo de BGC predominantemente encontrado no genoma de *P. labradorum* INPA-AP10, e representa 28,5% dos BGC's, sendo 9 PKS T1 e uma PKS T3, estes clusters estão envolvidos na biossíntese de policetídeos (PK), uma classe de PN que utilizam actil-CoA e malonil-CoA como blocos construtores. Estes metabólitos possuem ampla importância farmacológica apresentando atividades antimicrobianas (eritromicina), antifúngica (anfotericina), antiparasitária (avermectina), antitumoral (sofaren A), inibidor do crescimento vegetal (resorcilida), entre outros (Paulo, Sigrista e Oliveira 2019).

As PKS são classificadas em altamente redutoras, parcialmente redutoras e em não redutoras, de acordo com o nível de redução que realizam. Estas enzimas também são classificadas em Tipo 1 (PKS T1), Tipo 2 (PKS T2) e Tipo

3 (PKS T3) de acordo com a composição e organização estrutural de seus domínios funcionais (Herbst, Townsend e Maier 2018).

Entre as PKSs identificadas no genoma, o BGC-1 apresentou 18% de similaridade ao cluster responsável pela síntese do policetídeo **1** RES-1214-2. Já o BGC-24 apresentou 66% de similaridade, possuindo 4 dos 6 genes responsáveis pela síntese de **2** trans-resorcilida (Figura 2).

Tabela 1. Clusters gênicos biossintéticos (BGC's) preditos com base no genoma de *P. labradorum* INPA-AP10.

BGC	Tipo	Comprimento pb**	% Similaridade	BGC mais semelhante	MIBiG ID***
1	PKS T1	43,955	18	RES-1214-2	BGC0000121
2	PKS T1	46,645	18	aurofusarina	BGC0002709
3	Terpeno	24,214	100	ácido clavárico	BGC0001248
4	Betalactona	24,241	0	-	-
5	NRPS	52,272	0	-	-
6	Terpeno	21,495	12	azasperpyranone A	BGC0002267
7	Betalactona	31,183	0	-	-
8*	NRP-metallophore, NRPS	96,388	100	dimetil coprogênio	BGC0001249
9	PKS T1	48,148	0	-	-
10	NRPS-like	43,833	100	colina	BGC0002276
11	PKS T1	39,929	0	-	-
12	NRPS	46,436	0	-	-
13	Terpeno	21,538	60	esqualestatina S1	BGC0001839
14	PKS T1	77,412	0	-	-
15	NRPS	46,308	0	-	-
16	NRPS	64,234	0	-	-
17	NRPS-like	43,358	0	-	-
18	NRPS-like	44,38	0	-	-
19	Terpeno	22,17	0	-	-
20	PKS T1	38,87	0	-	-
21	Fungal-RiPP	36,603	0	-	-
22	Terpeno	21,188	0	-	-
23	PKS T1	38,666	66	trans-resorcilida	BGC0001246
24	PKS T1	62,432	0	-	-
25	Terpeno	23,929	0	-	-
26	NRPS-like	43,288	0	-	-
27	PKS T1	36,618	0	-	-
28	NRPS-like	43,293	0	-	-
29	NRPS	58,565	75	nidulanina A	BGC0001699
30	Fungal-RiPP-like	60,901	0	-	-
31	Fungal-RiPP-like	35,452	0	-	-

32*	PKS T1, NRPS-like	50,792	0	-	-
33*	Betalactona, NRPS	26,795	0	-	-
34	PKS T3	10,669	0	-	-
35	Fungal-RiPP-like	6,098	0	-	-

*BGC híbrido; **comprimento em pares de base; ***representa o código do BGC cuja similaridade foi identificada no MIBiG.

Outro cluster com 18% de similaridade (BGC-2) é o responsável pela biossíntese da **3** aurofusarina e foi analisado (Figura 2). Com base na composição de genes observada na sintonia é possível inferir que as moléculas sintetizadas por estes clusters na linhagem INPA-AP10 não serão iguais aos compostos **1**, **2** e **3**, embora possa apresentar o esqueleto principal da molécula estruturalmente similar, isto porque o gene "core" que é o responsável pelo "chassi" da molécula é compartilhado entre os BGC's depositados no MIBiG e os da linhagem aqui estudada.

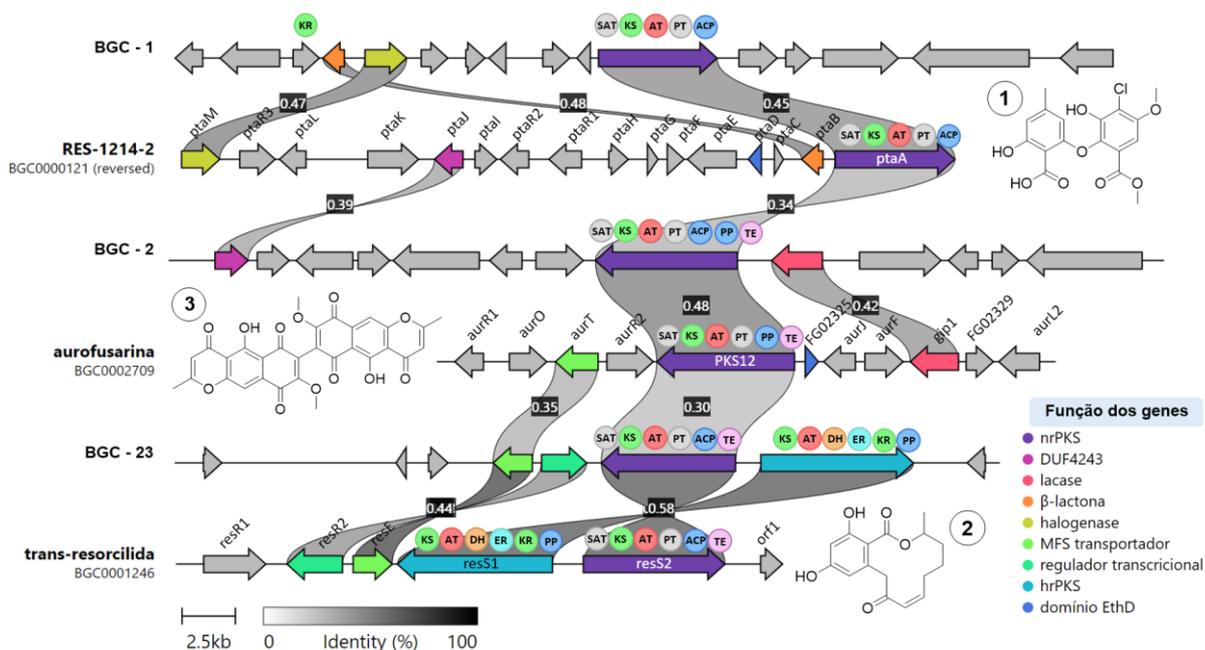


Figura 2 - Análise sintênica de três clusters de policetídeo sintase (PKS) relacionados a síntese de (1) RES-1214-2, (2) trans-resorcilida, (3) aurofusarina, com BGC's de *P. labradorum* INPA-AP10. O percentual de similaridade entre os genes está apresentado nas caixas pretas acima das linhas cinzas, quando mais escura a linha maior é a identidade entre os genes, as cores das setas representam a função proteica predita. Os domínios das PKSs estão apresentados acima do *gene core* de cada BGC: cetoredutase (KR), cetossintase (KS), proteína carreadora de acil (ACP), aciltransferase (AT), desidratase (DH), enoilredutase (ER), aciltransferase da unidade iniciadora (SAT), Product template (PT) que catalisa a ciclização da molécula, tioesterase (TE), Ppant (PP).

O policetídeo RES-1214-2 é um antagonista não peptídico da endotelina 1 (ET1), um potente vasoconstritor de longa duração que foi isolado de caldo de cultivo do fungo *Pestalotiopsis* sp. RE-1214. Foi observado *in vitro* a seletividade de RES-1214-2 sobre a ligação de ET-1 ao receptor de endotelina tipo A (Ogawa et al. 1995).

O BGC de RES-1214-2 de *Pestalotiopsis* sp. está localizado em um locus com 36.243 nucleotídeos (nt) e composto por 16 genes. A análise de sintenia deste cluster identificou correspondência para três genes do BGC-1 de *P. labradorum* INPA-AP10 (Figura 2), sendo um deles o gene *core ptaA* que codifica uma PKS não redutora, o gene *ptaB* uma betalactamase e o gene *ptaM*, codifica uma halogenase que catalisar a cloração na biossíntese de RES-1214-2 (Xu et al. 2014a).

Trans-resorcilida é um inibidor específico da 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase, uma enzima chave no catabolismo das prostaglandinas, isolada de *Acremonium zeae* (*Sarocladium*). Os resorcilídeos são fitotóxicos e inibem o alongamento das raízes das mudas. Esses metabólitos secundários pertencem à subclasse lactona do ácido resorcílico de 12 membros da família benzenodiol lactona (Xu et al. 2014b).

O BGC de trans-resorcilida do fungo endofítico *A. zeae* é composto por seis genes, localizado em um locus de 28.428 pares de bases (pb). O gene *resS1* codifica uma PKS altamente redutora (hrPKS) e o gene *resS2* codifica uma PKS não redutora (nrPKS). Além das PKS interativas (iPKSs) o BGC possui o gene *resE* que codifica uma proteína transportadora de membrana da Superfamília facilitadora principal - MFS (Xu et al. 2014b).

O pigmento aurofusarina é uma naftoquinona homodimérica produzida por fungos do gênero *Fusarium* e frequentemente associada a infecções ocorridas em trigo. Possui propriedades antibióticas contra fungos filamentosos e leveduras. Sua biossíntese depende da presença do gene *PKS12* que codifica uma nrPKS (Westphal et al. 2018).

O BGC de aurofusarina de *Fusarium graminearum* PH-1 possui 11 genes, está situado em um locus de 25.000 pb e apresentou 18% de similaridade com o BGC - 2 predito para *P. labradorum* INPA-AP10. O gene *gip1* de *F. graminearum* codifica uma enzima lacase que é necessária para a biossíntese da aurofusarina (Frandsen et al. 2006).

As sintetases de peptídeos não ribossômicos (NRPS) são mega enzimas multimodulares que incorporam uma ampla gama de substratos (aminoácidos, proteínas, ornitina e hidroxíácidos) para formar peptídeos lineares ou cíclicos sem o envolvimento de ribossomos. As NRPS fúngicas são responsáveis pela biossíntese de peptídeos não ribossomais (NPS) com um amplo espectro de atividades biológicas na medicina e na agricultura (Chen, Lin e Chung 2013).

No genoma de *P. labradorum* INPA-AP10 foram encontrados dois clusters com alta similaridade a BGC's relacionados a NRPs conhecidos: **4** dimetil coprogênio e **5** nidulina A (Figura 3).

A via biossintética de dimetil coprogênio de *Alternaria alternata* possui apenas o gene *NPS6*, composto por 6.120 pb, que codifica uma NRPS, cuja similaridade foi de 100% com o *gene core* do BGC-8, híbrido NRPS/NRPS-like de *P. labradorum* INPA-AP10. A presença de genes adicionais no BGC-8 pode indicar a ocorrência de modificações pós-NRPS na molécula, o que levaria a biossíntese de um metabólito diferente do dimetil coprogênio. Além disso, na análise da composição de domínio de ambas NRPS foram possíveis identificar um domínio de tiolação (T) adicional no gene *NPS6* de *A. alternata*.

Fungos do gênero *Alternaria* são conhecidos por produzirem sideróforos dimetil coprogênio para adquirir ferro extracelular. Os coprogênios contêm um anel dicetopiperazina (ácido dimérico) que é formado pela união de duas unidades N 5 -acil- N 5 -hidroxi-ornitina por meio de uma ligação peptídica. Uma unidade adicional de acil ornitina é ligada ao anel por meio de uma ligação éster (Chen, Lin e Chung 2013).

O BGC-29 produz o tetrapeptídeo cíclico nidulanina A (Figura 3). Este composto é encontrado em todas as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Foi caracterizado originalmente em *A. nidulans* e até o momento não há nenhuma propriedade ou função conhecida para este metabólito secundário. Porém, a nidulanina A, está envolvida na síntese de fungisporina, que por sua vez demonstrou possuir propriedades antibacterianas (Andersen et al. 2013).

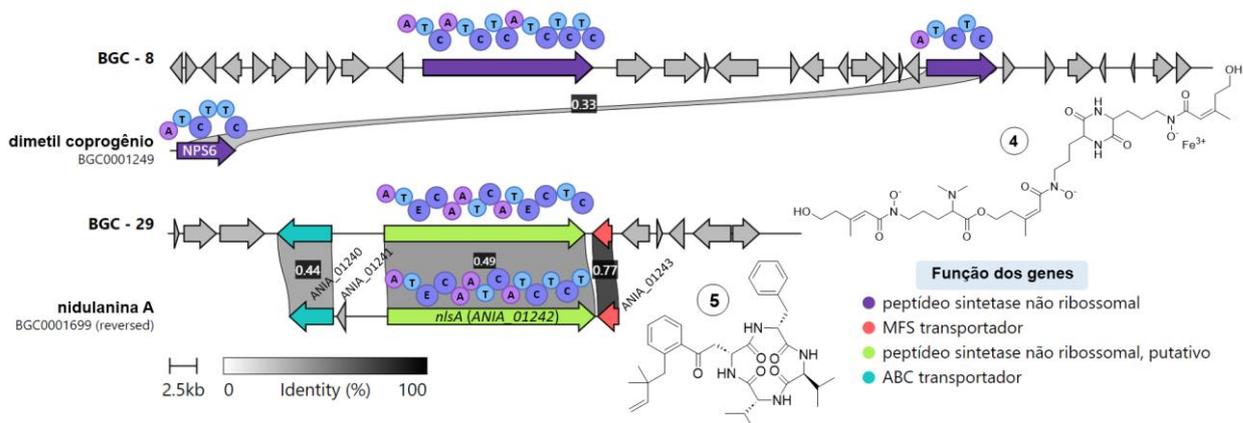


Figura 3 - Análise sintética de dois clusters relacionados a biossíntese dos peptídeos não ribossomais (NRP) (4) dimetil coprogênio, (5) nidulanina A, com clusters de *P. labradorum* INPA-AP10. O percentual de similaridade entre os genes está apresentado nas caixas pretas acima das linhas cinzas, quando mais escura a linha maior é a identidade entre os genes, as cores das setas representam a função proteica predita. Os domínios das NRPSs estão apresentados acima do *gene core* de cada cluster onde: (A) indica o domínio de adenilação, (T) tiolação, (E) epimerização, (C) condensação.

Conclusões

A partir da mineração do genoma de *P. labradorum* INPA-AP10 foi possível identificar 35 clusters gênicos biossintéticos envolvidos na biossíntese de produtos naturais. Com base nos BGC's que apresentaram alta similaridade foi possível prever o potencial para produção do dimetil coprogênio (sideróforo) e nidulanina A. Os resultados também indicam que apesar de alguns clusters apresentarem alta similaridade, as análises de sintenia revelam que a composição gênica diferente das vias de biossíntese do MIBiG indicando que na linhagem INPA-AP10 produz moléculas diferentes, com possível esqueleto principal da molécula estruturalmente similar. Além disso, cerca de 75% dos BGC's não apresentam nenhuma similaridade com as vias de biossíntese disponíveis na base de dados, indicando que esses clusters podem estar relacionados à síntese de novas moléculas ou moléculas embora já descritas e elucidada quimicamente, ainda não se conhece a composição gênica da via de biossíntese impossibilitando a correlação.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento: FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas) CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Este trabalho contou com o

suporte financeiro da FAPEAM Editais: (PROSPAM 08/2021, CT&I ÁREAS PRIORITÁRIAS 010/2021, PRODUTIVIDADE-CT&I-013/2022, Biodiversa N° 007/2021 e pela concessão de bolsa de estudo ao primeiro autor), CAPES editais (Procad AmazonMicro e Amazônia Legal).

Referências

Abbasi, M.N.; Fu, J.; Bian, X.; Wang, H.; Zhang, Y.; Li, A. 2020. Recombineering for Genetic Engineering of Natural Product Biosynthetic Pathways. *Trends in Biotechnology* 38(7): 715-728.

Albarano, L.; Esposito, R.; Ruocco, N.; Costantini, M. 2020. Genome mining as new challenge in natural products discovery. *Marine Drugs* 18(4): 199.

Andersen, M.R.; Nielsen, J.B.; Klitgaard, A.; Petersen, L.M.; Zachariassen, M.; Hansen, T.J.; et al. 2013. Accurate prediction of secondary metabolite gene clusters in filamentous fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2;110(1): E99-107.

Brakhage, A.A. 2013. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology* 11(1): 21-32.

Chen, L.H.; Lin, C.H.; Chung, K.R. 2013. A nonribosomal peptide synthetase mediates siderophore production and virulence in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Molecular Plant Pathology* 14(5): 497-505.

Gilchrist, C.L.M.; Chooi, Y.H. 2021. Clinker & clustermap.js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics* 18:btab007.

Coussement, P.; Bauwens D, Peters G, Maertens J, Mey M (2020). Mapping and refactoring pathway control through metabolic and protein engineering: The hexosamine biosynthesis pathway. *Biotechnology Advances* 40:107512.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.

Frandsen, R.J.N.; Nielsen, N.J.; Maolanon, N.; Sorensen, J.C.; Olsson, S.; Nielsen, J.; Giese, H. 2006. The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones. *Molecular Microbiology* 61: 1069-1080.

Gaynes, R. 2017. The Discovery of *Penicillin* New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerging Infectious Diseases* 23(5): 849-853.

Herbst, D.A.; Townsend, C.A.; Maier, T. 2018. The architectures of iterative type I PKS and FAS. *Natural Product Reports* 35:1046-1069.

Houbraken, J.; Samson, R.A.; Yilmaz, N. 2016. Taxonomy of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* and its significance for biotechnology. In: Vries RP, Gelber IB, Rørdam AM. (eds.) *Aspergillus and Penicillium in the Post-Genomic Era*. Caister Academic Press, Norfolk. p.1-15.

Katz, L.; Baltz, R.H. 2016. Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 43(2–3): 155-176.

Lin, Z.; Nielsen, J.; Liu, Z. 2020. Bioprospecting Through Cloning of Whole Natural Product Biosynthetic Gene Clusters. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8: 526.

Medema, M.H.; Rond, T.; Moore, B.S. 2021. Mining genomes to illuminate the specialized chemistry of life. *Nature Reviews Genetics* 22: 553–571.

Medema, M.H.; Blin, K.; Cimermancic, P.; Jager, V.; Zakrzewski, P.; Fischbach, M.A.; et al. 2011. AntiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research* 39: W339– W346.

Ogawa, T.; Ando, K.; Aotani, Y.; Shinoda, K.; Tanaka, T.; Tsukuda, E.; et al. 1995. RES-1214-1 and -2, novel non-peptidic endothelin type A receptor antagonists produced by *Pestalotiopsis* sp. *The Journal of Antibiotics* 48(12): 1401-6.

Paulo, B.S.; Sigrista, R.; Oliveira, L.G. 2019. Avanços recentes em biossíntese combinatória de policetídeos: perspectivas e desafios. *Química Nova* 42(1): 71-83.

Perrone, G.; Susca, A. 2017. *Penicillium* Species and Their Associated Mycotoxins. In: Moretti A, Susca A. (eds). *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*. Humana New York. p.107-119.

Prjibelski, A.; Antipov, D.; Meleshko, D.; Lapidus, A.; Korobeynikov, A. 2020. Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics* 70: e102.

Seyedsayamdost, M.R.; Xu, F.; Moon, K.; Nazari, B. 2020. Cryptic metabolites and method for activating silent biosynthetic gene clusters in actinomycete bacteria. U.S. Patent Application n. 16/610,330, 12 mar. 2020.

Terlouw, B.R.; Blin, K.; Navarro-Muñoz, J.C.; Avalon, N.E.; Chevrette, M.C.; et al. 2023. MIBiG 3.0: a community-driven effort to annotate experimentally validated biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research* 51(D1): D603–D610.

Westphal, K.R.; Wollenberg, R.D.; Herbst, F.A.; Sørensen, J.L.; Sondergaard, T.E.; Wimmer, R. 2018. Enhancing the Production of the Fungal Pigment Aurofusarin in *Fusarium graminearum*. *Toxins* 10(11): 485.

Xu, X.; Liu, L.; Zhang, F.; Wang, W.; Li, J.; Guo, L.; Che, Y.; Liu, G. 2014a. Identification of the first diphenyl ether gene cluster for pestheic acid biosynthesis in plant endophyte *Pestalotiopsis fici*. *Chembiochem* 24;15(2): 284-92.

Xu, Y.; Zhou, T.; Espinosa-Artiles, P.; Tang, Y.; Zhan, J.; Molnár, I. 2014b. Insights into the biosynthesis of 12-membered resorcylic acid lactones from heterologous production in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Chemical Biology* 16;9(5): 1119-27.