

ADALGISA RIBEIRO TORRES

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA
NITRATO REDUTASE EM *Penicillium expansum***

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Agrícola,
para obtenção do título de “Magister
Scientiae”

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

ADALGISA RIBEIRO TORRES

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA
NITRATO REDUTASE EM *Penicillium expansum***

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de pós-
Graduação em Microbiologia Agrícola,
para obtenção do título de “Magister
Scientiae”

APROVADA: 05 fevereiro de 2001

Prof.^a Elza Fernandes de Araújo
(Conselheira)

Prof. Jorge Luiz C. Coelho

Prof.^a Célia Alencar de Moraes

Prof. Walter Vieira Guimarães

Prof.^a Marisa Vieira de Queiroz
(Orientadora)

A Deus.

Aos meus pais Itúrbides e Regina Dalva.

Aos meus irmãos Luís Henrique, Heloisa Helena e Virgínia,
dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa por todo o apoio oferecido para a realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À professora Marisa Vieira de Queiroz pela orientação segura, apoio constante e pela compreensão.

À professora Elza Fernandes de Araújo por toda a ajuda e incentivo.

Aos professores Célia Alencar, Jorge Coelho e Walter Guimarães pelas correções e sugestões.

À minha família pelo incentivo e apoio constante

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia por todo o apoio oferecido, pelos serviços prestados e pela amizade.

Às secretárias do Departamento de Microbiologia, Aparecida, Laura e Nilcea, pela inestimável ajuda e serviços prestados.

A todos os estudantes da Microbiologia pela amizade e cooperação.

Ao colega Júpiter I. M. Abad pela inestimável ajuda.

Às colegas Andréa B. Ribon e Denise M. Soares pelo apoio, valiosas críticas e sugestões.

Ao João Batista pela amizade, pela ajuda durante todo o curso e pelas sugestões.

Ao Jorge F. Pereira pela grande ajuda e pela amizade.

A todos os colegas de laboratório: Francis, Irene, Jildete, João Júlio, Klédna, Marcos, Patrícia, Maurilio, Rodrigo, Simone Pio e Tania pelo trabalho em equipe e pela agradável convivência.

À Luciana Abreu pela ajuda a qualquer hora e pela amizade.

Aos amigos Fabiana, Hallen, Luciana (Bidu), Márcia, Mirlane e Taís pelo apoio.

A todos os colegas, amigos, funcionários e professores desta instituição que contribuíram para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

BIOGRAFIA

ADALGISA RIBEIRO TORRES, filha de Itúrbides Fabiano Torres e Regina Dalva Ribeiro Torres, nasceu na cidade de Itanhandu, MG, em 02 de julho de 1973.

Ingressou na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, em março de 1993, concluindo a graduação em Ciências Biológicas em outubro de 1998.

Em outubro de 1998, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ÍNDICE

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Microrganismos.....	9
3.2. Plasmídeos.....	9
3.3. Meios de Cultura	10
3.3.1. Meio mínimo (PONTECORVO et al., 1953)	10
3.3.2. Meio completo (PONTECORVO et al., 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973).....	10
3.3.3. Meio LB (Luria -Bertani) (SAMBROOK et al., 1989)	11
3.3.4. Meio SOB (INOUE et al., 1990)	11
3.3.5. Meio SOC (INOUE et al., 1990)	11
3.4. Antibiótico.....	11
3.5. Enzimas	12
3.5.1. Enzimas de restrição.....	12
3.5.2. Protease	12

3.5.3. RNase (Ribonuclease A).....	12
3.5.4. DNase (Desoxirribonuclease I).....	12
3.5.5. Lisozima.....	12
3.6. Soluções e Tampões.....	13
3.6.1. Solução de vitaminas	13
3.6.2. EDTA 0,5 M, pH 8,0	13
3.6.3. Tampão de extração de DNA.....	13
3.6.4. Tampão TE (Tris HCl-EDTA).....	14
3.6.5. Tampão TEB (10 x)	14
3.6.6. Tampão de amostra	14
3.6.7. Tampão de ligação (10 x).....	14
3.6.8. Tampão SM.....	14
3.6.9. Fenol.....	15
3.6.10. Fenol-Clorofórmio	15
3.6.11. Clorofórmio.....	15
3.6.12. SSC 20 x.....	15
3.6.13. Solução de desnaturação.....	15
3.6.14. Solução de neutralização.....	15
3.6.15. Solução de fixação.....	16
3.6.16. Solução de Denhardt (50 x)	16
3.6.17. Solução de pré-hibridização.....	16
3.6.18. Solução de hibridização.....	16
3.6.19. PEG 6.000 20%/NaCl	16
3.6.20. PEG 8000 13%/NaCl.....	16
3.6.21. PEG 6.000 60%	17
3.6.22. Solução de MgCl ₂ / Ácido acético.....	17
3.6.23 Solução de glicose/Tris -HCl/EDTA	17
3.6.24. Solução de lise alcalina	17
3.6.25. Acetato de potássio 5 M.....	17
3.6.26. IPTG (Isopropil- 1-tio-β-D-galactosídeo)	17
3.6.27. X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo)	18
3.6.28. Sorbitol 1 M	18
3.6.29. CaCl ₂ 50 mM.....	18
3.6.30. Tris-HCl 100 mM.....	18

3.6.31. Tampão Fosfato 10 mM	18
3.6.32. KCl 0,6 M, Tampão fosfato 10 mM pH 5,8.....	18
3.6.33. Solução TB.....	19
3.6.34. Solução STE.....	19
3.6.35. Solução de Cloreto de Lítio	19
3.6.36. Solução de Ácido <i>p</i> - aminobenzóico	19
3.7. Manutenção e estoque das culturas e preparo da suspensão de conídios	19
3.8. Banco genômico.....	20
3.9. Preparo de células para infecção por bacteriófagos	20
3.10. Identificação de clones do banco genômico	20
3.10.1. Obtenção da Sonda	20
3.11. Marcação de DNA com d-UTP fluoresceína	21
3.12. Hibridização do DNA em placas de lise.....	21
3.13. Caracterização dos fagos recombinantes.....	22
3.13.1. Extração de DNA de fagos recombinantes	22
3.13.2. Análise por hibridização.....	23
3.13.2.1. Condições de hibridização	23
3.14. Purificação de fragmentos de DNA.....	24
3.15. Subclonagem dos fragmentos de DNA.....	25
3.16. Transformação Bacteriana.....	25
3.17. Extração de DNA plasmidial direto de colônias.....	26
3.18. Extração de DNA plasmidial em grande escala	26
3.19. Construção do mapa de restrição.....	28
3.20. Obtenção de protoplastos	28
3.21. Transformação de protoplastos de <i>P. expansum</i>.....	28
3.22. Análise da frequência de regeneração.....	29
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Isolamento do gene da nitrato redutase de <i>P. expansum</i>.....	30
4.2. Análise dos fagos recombinantes.....	32
4.3. Construção do mapa de restrição do fago recombinante λPENR3.....	34
4.4. Subclonagem e caracterização do fragmento de DNA contendo o gene <i>nia</i> de <i>P. expansum</i>	37

4.5. Transformação do mutante Nia ⁻ de <i>P. expansum</i> utilizando o plasmídeo recombinante pPENR.....	41
5. RESUMO E CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

RESUMO

TORRES, Adalgisa Ribeiro, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2001. **Isolamento e caracterização do gene que codifica nitrato redutase em *Penicillium expansum*.** Professora orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Professores conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e Daison Olzany Silva.

O gene que codifica nitrato redutase em *Penicillium expansum* foi isolado de um banco genômico construído no vetor fago lambda EMBL3. Um fragmento de DNA de 3,17 Kb, contendo parte da região codificadora do gene da nitrato redutase de *Penicillium chrysogenum*, foi utilizado como sonda. Quatro fagos recombinantes foram isolados e denominados λ PENR1, λ PENR3, λ PENR5 e λ PENR6, com fragmentos de DNA clonados de 14,4; 14,4; 12,3 e 12,6 Kb, respectivamente. A análise por hibridização do DNA dos fagos recombinantes, clivado com *Sal* I, identificou fragmentos cujos tamanhos correspondiam a 4,7 Kb (λ PENR1), 6,0 Kb (λ PENR3), 8,4 Kb (λ PENR5) e 7,6 Kb (λ PENR6). Para a construção do mapa físico de restrição do fago recombinante λ PENR3, foram feitas clivagens simples e duplas com enzimas de restrição. A análise de restrição e hibridização dos fragmentos de DNA do fago recombinante λ PENR3 revelou que o gene *nia* estava presente em um fragmento de 6,5 Kb. Este fragmento foi subclonado no plasmídeo pBluescript SK+, e o

plasmídeo recombinante foi denominado pPENR. Para a construção do mapa físico de restrição de pPENR, foram feitas clivagens simples e duplas com enzimas de restrição. O plasmídeo recombinante pPENR foi utilizado na transformação dos mutantes Nia^- de *P. expansum* e *Penicillium griseoroseum*, sendo obtida uma frequência de 16 transformantes por μg de DNA.

ABSTRACT

TORRES, Adalgisa Ribeiro, M.S., Universidade Federal de Viçosa, february, 2001. **Isolation and characterization of nitrate reductase gene of *Penicillium expansum*** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Committee members: Elza Fernandes de Araújo and Daison Olzany Silva

The gene encoding nitrate reductase from *Penicillium expansum* was isolated from a lambda EMBL3 genomic DNA library. A 3.17 Kb DNA fragment containing part of the coding region for nitrate reductase from *Penicillium chrysogenum* was used as a probe. Four recombinant phages were isolated and the recombinant phages were labeled λ PENR1, λ PENR3, λ PENR5 e λ PENR6, containing cloned DNA fragments of 14.4; 14.4; 12.3 and 12.6 Kb, respectively. DNA hybridization analysis of the recombinant phages cleaved with *Sal* I identified DNA fragments whose sizes were 4.7 Kb (λ PENR1), 6.0 Kb (λ PENR3), 8.4 Kb (λ PENR5) and 7.6 Kb (λ PENR6). For the construction of the a physical restriction map of the recombinant phage λ PENR3, single and double digestions with restriction enzymes were performed. Restriction and hybridization analysis of the recombinant phage λ PENR3 DNA fragments showed that the *nia* gene was present in a 6.5 Kb DNA fragment. This fragment was subcloned in the plasmid pBluescript SK+ resulting in plasmid pPENR. For the construction of the a physical restriction map of pPENR, single and double digestions with

restriction enzymes were carried out. The recombinant plasmid pPENR was used for transformation of nitrate non-utilising strains of *P. expansum* and *Penicillium griseoroseum*, and a frequency of 16 transformants per μg of DNA was achieved.

1. INTRODUÇÃO

O fungo filamentosso *Penicillium expansum* é um excelente produtor de pectinases, enzimas de grande potencial na indústria têxtil e de bebidas. Devido a isso, vários estudos têm sido conduzidos, visando a maior compreensão da fisiologia e da genética desse organismo. No entanto, pouco é conhecido sobre a genética de *P. expansum*, tornando necessários estudos sobre a organização gênica, recombinação e regulação de vias metabólicas, que possibilitarão o isolamento de linhagens recombinantes superprodutoras de enzimas.

Mutações no gene *nia*, que codifica nitrato redutase, são excelentes marcadores em experimentos de mapeamento genético e transformação, pois mutantes espontâneos *Nia⁻* podem ser facilmente obtidos pela resistência ao clorato, sem a necessidade de indução por agentes mutagênicos. Para uma análise mais detalhada das mutações e o emprego do gene como marcador em experimentos de transformação, são necessárias a sua clonagem e caracterização.

Os métodos de clonagem de genes por complementação e por hibridização com sonda heteróloga, têm sido usados com maior frequência em fungos filamentosos. Para o emprego da clonagem por complementação, além de um banco genômico, é necessário um eficiente sistema de transformação. A transformação é importante para a introdução de genes modificados *in vitro*, visando o aumento no número de cópias do gene, e para inativar genes por inserção de plasmídeos.

Este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar o gene da nitrato redutase (*nia*) de *P. expansum*. A clonagem do gene *nia*, permitiu estabelecer um

sistema homólogo de transformação para *P. expansum*, além de possibilitar estudos posteriores sobre regulação e determinação da organização gênica. O gene clonado já pode ser utilizado como marcador em experimentos de cotransformação com genes de interesse industrial, que não permitam a seleção direta dos transformantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O fungo filamentosso *Penicillium expansum*, possui grande potencial de utilização na indústria, devido a sua capacidade de produzir enzimas pectinolíticas e baixa atividade celulolítica (SILVA et al., 1993). Estudos visando uma maior compreensão da fisiologia e genética deste organismo, vêm sendo desenvolvidos. Um grande número de mutantes morfológicos, auxotróficos e linhagens recombinantes têm sido isolados em *P. expansum* (LANA, 1999). Estas linhagens permitirão um estudo mais detalhado dos genes envolvidos na produção de pectinases e a obtenção de linhagens hiperprodutoras. Além disso, genes para produção de poligalacturonase (PG) e pectina liase de *P. expansum*, foram clonados e estão sendo analisados (DIAS, 1997, CARDOSO, 2000).

Linhagens de interesse industrial, podem ser isoladas por programas clássicos de melhoramento genético, baseados em tratamento mutagênico e subsequente detecção das linhagens que apresentem aumento na produção. Linhagens recombinantes, com as características desejadas, podem ser isoladas utilizando o ciclo sexual ou o ciclo parassexual. Além disso, o desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante, possibilita a clonagem e manipulação direta de genes (GRIFFIN, 1994).

Segundo CUTLER et al. (1998), um pré-requisito básico para o melhoramento de linhagens de fungos, utilizando a engenharia genética, é o

desenvolvimento de um sistema de transformação eficiente. A transformação é importante para a introdução de genes modificados *in vitro*, para aumentar o número de cópias do gene e para a inativação de genes por inserção de plasmídeos. Para a transformação eficiente de um fungo filamentosos, é necessário o isolamento de um grande número de protoplastos e um sistema eficiente para a seleção das colônias transformadas. Em geral, genes relacionados com a produção de enzimas de interesse biotecnológico, não permitem a seleção direta dos transformantes. E para a seleção inicial, são usados genes que conferem resistência a substâncias tóxicas ou genes que complementam mutações auxotróficas; que pode ser tanto um gene homólogo quanto um gene heterólogo. Em seguida, os transformantes selecionados são analisados quanto à presença do gene de interesse.

Para aumentar o número de cópias do gene da pectina metil esterase (PME) em *Aspergillus niger*, foi feita a cotransformação de protoplastos com o plasmídeo; contendo este gene e o plasmídeo pAN7.1, que contém o gene que confere resistência à higromicina. Foi feita a seleção dos transformantes em meio, com higromicina e as colônias transformadas foram analisadas quanto à produção de PME. Foi encontrada uma correlação entre o número de cópias do gene e a produção de PME (KHANH et al., 1991).

O gene *nia*, que codifica para nitrato redutase, é um dos genes mais utilizados em experimentos de transformação, pois o isolamento de linhagens mutantes para nitrato redutase (*Nia⁻*), é uma técnica prática e econômica, por ser mais rápida. Além disso, como a assimilação do nitrato é uma via totalmente dispensável, sob a maioria das condições de crescimento, mutações na mesma, podem não resultar em alterações que prejudiquem o processo fermentativo. Uma outra vantagem é a alta frequência de transformação (CUTLER et al., 1998).

O isolamento de linhagens mutantes *Nia*, pode ser facilmente alcançado sem tratamento mutagênico, pela resistência ao clorato; diminuindo, assim, a possibilidade de ocorrerem mutações indesejáveis. Os mutantes podem ser caracterizados por uma série de testes fenotípicos simples, como os utilizados para *Aspergillus nidulans* (WHITEHEAD et al., 1990). O gene da nitrato

redutase, vem sendo empregado, com sucesso, como marcador de seleção em *A. oryzae* (UNKLES et al., 1989a), *A. niger* (UNKLES et al., 1989b), *A. nidulans* (JOHNSTONE et al., 1990), *Cephalosporium acremonium* (WHITEHEAD et al., 1990) e *Penicillium chrysogenum* (GRAESSLE et al., 1997).

Em fungos filamentosos fontes de nitrogênio, como amônio, glutamato e glutamina são preferencialmente utilizadas. Na ausência de tais compostos, outras fontes de nitrogênio são utilizadas, como: nitrato, aminas e purinas (CHANG et al. 1996). Na via de assimilação do nitrogênio, o nitrato é reduzido a nitrito, pela ação da enzima nitrato redutase; e o nitrito é, então, reduzido a amônio, pela ação da enzima nitrito redutase. O nitrogênio amoniacal, é incorporado à biomassa celular, pela enzima Glutamato Desidrogenase (GDH) ou pelo sistema Glutamina Sintetase-Glutamato Desidrogenase (GS-GOGAT), quando passa a fazer parte da molécula de glutamina. O clorato é um análogo do nitrato (MAUER et al. 1997), que ao ser incorporado pela célula, é reduzido a clorito pela ação da nitrato redutase, tornando-se tóxico para a célula. Nesta situação, selecionam-se linhagens que apresentem ausência da nitrato redutase.

Em *A. nidulans* (COVE et al., 1979), *Neurospora crassa* (TOMSETT e GARRET, 1980), *Septoria nodorum* (NEWTON e CATEN, 1988) e *Fusarium moliniforme* (KLITTICH e LESLIE, 1988) a enzima nitrato redutase, é codificada por um gene cópia única no genoma e mutantes com mudanças neste gene, são frequentemente reportados. Mutações no gene da nitrato redutase (*nia*), são, também, excelentes marcadores em experimentos de mapeamento genético, e a análise destes mutantes tem contribuído para o estudo da via de assimilação do nitrato.

Dois métodos têm sido usados para a clonagem dos genes *nia* de fungos filamentosos: a clonagem por complementação e a clonagem usando uma sonda heteróloga. Nos dois casos, é necessário a construção de um banco genômico em plasmídeos, cosmídeos ou bacteriófagos. O genoma do organismo deve estar totalmente representado em um banco genômico, ou seja, em muitos clones independentes, contendo segmentos distintos do genoma em estudo (FELIPE et al., 1992). Os plasmídeos e cosmídeos são replicados em *E. coli*, o que leva

obrigatoriamente, ao uso de vetores que apresentem marcadores de seleção em bactérias.

Para o emprego da clonagem por complementação, além de um banco genômico, é necessário um eficiente sistema de transformação. Sistemas de transformação, baseados na complementação de mutantes deficientes na nitrato redutase, foram desenvolvidos em alguns fungos filamentosos, incluindo *A. niger* (UNKLES et al., 1989a), *Fusarium oxysporum* (DIOLEZ et al., 1993) e *Gibberella fujikuroi* (TUDZINSKI, et al., 1996).

Poucas origens de replicação têm sido isoladas em fungos filamentosos, então, a maior parte dos vetores é integrativa, dificultando a clonagem de genes por complementação, pois uma vez que os transformantes tenham sido isolados, o plasmídeo com o gene de interesse precisa ser recuperado em *E. coli*. Isto torna a clonagem de genes por complementação em fungos filamentosos, um método de clonagem mais lento do que a clonagem utilizando sonda heteróloga; onde o gene proveniente de um outro organismo, é usado diretamente como sonda para a hibridização, com um banco genômico do organismo de interesse (GRIFFIN, 1994). A desvantagem desse método, é que a presença de sinais de hibridização positivos, não significa, obrigatoriamente, a presença do gene de interesse. Para confirmar isso, é necessário o seqüenciamento do gene ou a sua complementação, por transformação de uma linhagem mutante.

Foi utilizada a hibridização com sonda heteróloga, para o isolamento do gene da nitrato redutase (*nia*) de *C. acremonium* (WHITEHEAD et al. 1990), *P. chrysogenum* (GOUKA et al. 1991), *Leptosphaeria maculans* (WILLIANS et al. 1994) e *Gibberella fujikuroi* (TUDZYNSKI et al. 1996), utilizando como sonda, o gene *niaD* de *A. nidulans*. O gene *nia* de *Penicillium griseoroseum*, foi clonado por hibridização com o gene *nia* de *P. chrysogenum* (PEREIRA, 1999).

O gene *nia* de *P. chrysogenum* foi clonado por meio de hibridização de um banco genômico do fungo, construído no vetor fago lambda EMBL3, com um fragmento *Xba*I de 2,4 kb contendo o gene *niaD* de *A. nidulans*. Onze clones positivos foram isolados inicialmente, e cinco deles foram escolhidos para experimentos de hibridização. Fragmentos resultantes da clivagem com

diferentes enzimas de restrição, foram subclonados em plasmídeos, e estes foram usados para transformar um mutante Nia^- . A obtenção de colônias transformantes Nia^+ , confirmou a presença do gene nos fragmentos clonados (GOUKA et al. 1991).

Os genes envolvidos na assimilação do nitrato, encontram-se agrupados nos fungos *A. nidulans* (JOHNSTONE et al. 1990), *P. chrysogenum* (GOUKA et al. 1991), *A. niger* (UNKLES et al. 1992), *Ustilago maydis* (BANKS et al. 1993) e na alga *Chlamydomonas reinhardtii* (QUESADA et al. 1994). No entanto, em *Neurospora crassa*, assim como em plantas, tais genes não estão agrupados (CRAWFORD, et al. 1993). Em *N. crassa*, os genes que codificam para nitrato redutase e nitrito redutase, situam-se em cromossomos diferentes (FU e MARZLUF, 1987).

Em *A. nidulans*, as enzimas nitrato redutase e nitrito redutase são codificadas pelos genes *niaD* e *niiA*, respectivamente (COVE e PATEMAN, 1963; PATEMAN, et. al. 1967), e o gene *crnA*, codifica uma proteína permease envolvida no transporte do nitrato para o meio intracelular. Os três genes estão localizados no cromossomo VIII e sua respectiva ordem é: *crnA-niiA-niaD* (TOMSET e COVE, 1979). Os genes *niaD* e *niiA*, são divergentemente transcritos a partir de uma região intergênica de 1.262 pb, enquanto que, o gene *crnA* é transcrito na mesma direção do gene *niiA*. Em *A. niger* o gene *niaD*, também situa-se adjacente ao gene *niiA* (UNKLES, et. al., 1989b). Na levedura *Hansenula polymorpha*, os genes que codificam para permease, nitrato redutase e nitrito redutase *YNT1*, *YNII* e *YNRI*, respectivamente, encontram-se agrupados e são transcritos na mesma direção. Os genes envolvidos na assimilação do nitrato, até então estudados, são induzidos na presença do nitrato e reprimidos por amônio (AMAAR et al. 1998).

Comparações da seqüência de genes da nitrato redutase de várias plantas e fungos filamentosos, e enzimas com domínios funcionais similares, identificaram três regiões conservadas, contendo centros redox que interagem com a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), grupo heme e cofator molibdênio (CAMPBELL e KINGHORN, 1990).

Em *P. chrysogenum*, o gene da nitrato redutase, possui seis introns com, respectivamente, 57, 62, 71, 50, 55 e 53 pb. O gene *nia* de *A. nidulans*, *A. niger* e *A. oryzae* também apresentam seis introns, localizados nas mesmas posições, quando comparados com *P. chrysogenum* (JOHNSTONE et al., 1990; UNKLES, et al., 1992; KITAMOTO, et al., 1995). Em contraste, o gene *nia* de *N. crassa* e *F. oxysporum* contém apenas um intron, localizado na posição correspondente ao intron IV de *P. chrysogenum* (CUTLER et al., 1998). O gene *nia* de *Phytophthora infestans* contém 1 intron e plantas superiores 2 ou 3 introns, porém, as posições não correspondem àquelas encontradas nos fungos citados anteriormente. No gene correspondente *nar1* de *Ustilago maydis*, nenhum intron foi encontrado (BANKS et al. 1993).

A remoção dos introns do gene *nia* de *P. chrysogenum*, revela uma seqüência de leitura aberta de 2.596 pb, que codifica uma proteína de 864 aminoácidos, com uma massa molecular de aproximadamente 96,2 kDa. A maior homologia, é encontrada em *A. niger* e *A. nidulans*, com respectivamente, 78% e 72% de identidade na seqüência de aminoácidos (HAAS et al., 1996).

A clonagem de genes, permite a análise mais aprofundada da estrutura dos genes e manipulação dos mesmos. A partir do gene clonado, é possível fazer análise molecular do mesmo, possibilitando sua caracterização quanto à região promotora; regiões de início e término de transcrição; região codificadora e número de introns. Tais informações, são muito importantes para se compreender a regulação da expressão gênica e possibilitam, também, a manipulação de genes, o que é muito útil para o melhoramento de espécies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Microrganismos

A linhagem mutante *nia/paba/faw* do fungo filamentoso *Penicillium expansum* (LANA, 1999), usada nos experimentos de transformação, foi obtida no laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO-Universidade Federal de Viçosa. Tal linhagem apresenta uma mutação para auxotrofia para a vitamina ácido *p*-aminobenzóico (*pab*), outra para a utilização de nitrato (*nia*) e uma mutação para coloração dos conídios, que são marrons claros (*faw*).

3.2. Plasmídeos

Para a transformação do fungo, foi utilizado o plasmídeo pNH24 (DIOLEZ et al., 1993), contendo o gene *niaD* de *F. oxysporum*. Como sonda, foi utilizado um fragmento de DNA de 3.170 pb, presente no plasmídeo pUES 32 contendo o gene *nia* de *P. chrysogenum* (HAAS et al. 1996). As linhagens

Escherichia coli K12 LE 392 e *E. coli* DH5 α , foram utilizadas para seleção e amplificação dos fagos recombinantes e para a amplificação dos plasmídeos, respectivamente. Os fragmentos de DNA, foram subclonados no plasmídeo pBluescript SK+ (Stratagene).

3.3. Meios de Cultura

Todos os meios descritos a seguir, foram preparados com água destilada e autoclavados a 121⁰C, por 20 minutos. Aos meios sólidos, foram acrescentados 1,5% (p/v) de ágar e aos meios semi-sólidos, 0,75% (p/v) de ágar.

3.3.1. Meio mínimo (PONTECORVO et al., 1953)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Água destilada	1.000 mL
pH	6,8

Para o preparo de meio mínimo adicionado de estabilizador osmótico, foram acrescentados 171 g de sacarose.

3.3.2. Meio completo (PONTECORVO et al., 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973)

Constituído de meio mínimo adicionado de:

Peptona	2,0 g
Caseína	1,5 g
Extrato de levedura	0,5 g

Solução de vitaminas	1,0 mL
Água destilada	1.000 mL
pH	6,8

Para o preparo de meio completo adicionado de estabilizador osmótico, foram acrescentados 171 g de sacarose.

3.3.3. Meio LB (Luria-Bertani) (SAMBROOK et al., 1989)

NaCl	10,0 g
Triptona	10,0 g
Extrato de Levedura	5,0 g
Água destilada	1000 mL
pH	7,0

3.3.4. Meio SOB (INOUE et al., 1990)

NaCl	0,5 g
Triptona	20,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Água destilada	1.000 mL
Depois de autoclavado, foram adicionados;	
KCl 0,25 M	10,0 mL
MgSO ₄ 2 M	5,0 mL
NaOH 5 M	100 µL

3.3.5. Meio SOC (INOUE et al., 1990)

Meio SOB acrescido de 20 mL de glicose 1 M.

3.4. Antibiótico

Foi preparada uma solução estoque de ampicilina, na concentração de 50 mg/mL. Esta solução foi filtrada em membrana Millipore GSWPO2500, com

poros de 0,22 μm , e mantida em frasco protegido contra a luz, a 4^oC. A concentração final usada, foi de 50 $\mu\text{g/mL}$.

3.5. Enzimas

3.5.1. Enzimas de restrição

As enzimas de restrição foram utilizadas de acordo com as recomendações dos fabricantes Amersham, Promega, Sigma e Stratagene.

3.5.2. Protease

Uma solução estoque de protease (P2143, Sigma), foi preparada na concentração de 20 mg/mL . A protease foi dissolvida em água milli-Q e distribuída em alíquotas de 1 mL, que foram armazenadas a -20^oC.

3.5.3. RNase (Ribonuclease A)

Ribonuclease A (R5503-Tipol-AS, Sigma), foi dissolvida em tampão Tris HCl 10 mM, pH 7,5, contendo NaCl 15 mM. Após ser fervida por 15 minutos, a solução estoque (10 mg/mL) foi distribuída em alíquotas e mantida a -20^oC.

3.5.4. DNase (Desoxirribonuclease I)

DNase (DN25, Sigma), foi preparada em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M, na de concentração de 20 mg/mL . A solução foi distribuída em alíquotas e armazenada a -20^oC.

3.5.5. Lisozima

A solução estoque de lisozima (L6876, Sigma), foi preparada na concentração de 20 mg/mL . A enzima foi dissolvida em Tris-HCl 10 mM pH 7,4,

distribuída em alíquotas de 1 mL, e mantida a -20°C .

3.6. Soluções e Tampões

Todas as soluções e tampões, foram preparadas com água Milli-Q e autoclavados a 121°C por 20 minutos- exceto a solução de vitaminas, que foi tinalizada.

3.6.1. Solução de vitaminas

Biotina	0,2 mg
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	10,0 mg
Piridoxina	50,0 mg
Tiamina	50,0 mg
Ácido nicotínico	100,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Água destilada	100,0 mL

A solução foi tinalizada e mantida a 4°C , em frasco âmbar.

3.6.2. EDTA 0,5 M, pH 8,0

Uma solução estoque de EDTA 0,5 M, pH 8,0 foi preparada dissolvendo-se 186,1 g de etilenodiaminotetracetato dissódico $2\text{H}_2\text{O}$ em 800 mL de água Milli-Q. A solução foi agitada vigorosamente com auxílio de agitador magnético e o pH ajustado com, aproximadamente, 20 g de NaOH. O volume foi completado para 1.000 mL.

3.6.3. Tampão de extração de DNA

Tris-HCl, pH 8,0	50,0 mM
SDS	1%
EDTA	20,0 mM

3.6.4. Tampão TE (Tris HCl-EDTA)

Tris-HCl, pH 8,0	10,0 mM
EDTA, pH 8,0	1,0 mM

3.6.5. Tampão TEB (10 x)

Trizma base (Sigma)	0,89 M
Ácido bórico	0,89 M
EDTA, pH 8,0	20,0 mM

A solução armazenada em frasco âmbar.

3.6.6. Tampão de amostra

Azul de bromofenol	0,25%
Glicerol	60%
TEB	1 x

3.6.7. Tampão de ligação (10 x)

Tris-HCl, pH 7,6	0,5 M
MgCl ₂	0,1 M
Ditiotreitol	0,1 M
ATP	10,0 mM

A solução foi distribuída em alíquotas e mantida a -20°C.

3.6.8. Tampão SM

NaCl	0,1 M
MgSO ₄	8,1 mM
Tris-HCl, pH 7,5	50,0 mM
Gelatina	2%

3.6.9. Fenol

Fenol foi destilado e tamponado com Tris-HCl 0,5 M, pH 7,8. Volumes iguais de fenol tamponado e Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8 foram misturados. A solução foi mantida em frascos âmbar, a 4°C.

3.6.10. Fenol-Clorofórmio

Fenol, previamente tamponado com Tris-HCl 0,5 M, pH 7,8, foi misturado com clorofórmio na proporção 1:1. A preparação foi mantida a 4°C, em frasco âmbar.

3.6.11. Clorofórmio

O clorofórmio foi misturado a Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 na proporção 1:1, e armazenado em frasco âmbar, a 4°C.

3.6.12. SSC 20 x

Citrato de sódio	0,3 M
NaCl	3,0 M

3.6.13. Solução de desnaturação

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M

3.6.14. Solução de neutralização

Tris-HCl, pH 7,0	0,5 M
NaCl	1,5 M

3.6.15. Solução de fixação

Tris-HCl, pH 7,5	0,2 M
SSC	2 x

3.6.16. Solução de Denhardt (50 x)

Polivinilpirrolidona	1%
Soro albumina bovina (A 7030, Sigma)	1%

3.6.17. Solução de pré-hibridização

SSC	5 x
SDS	0,5%
Solução de Denhardt	5 x

3.6.18. Solução de hibridização

SSC	5x
SDS	0,5%
Solução de Denhardt	5x
Sonda marcada com d-UTP-Fluoresceína	20 ng/ml

3.6.19. PEG 6.000 20%/NaCl

Polietileno glicol 6.000	20%
NaCl	2,5 M

3.6.20. PEG 8000 13%/NaCl

Polietileno glicol 8.000	13 g
NaCl	1,6 M
Água Milli-Q	100 mL

3.6.21. PEG 6.000 60%

Polietileno glicol 6.000	60 g
Água Milli-Q	100 mL

3.6.22. Solução de MgCl₂ / Ácido acético

MgCl ₂	1 M
Ácido acético	10%

3.6.23 Solução de glicose/Tris-HCl/EDTA

Tris-HCl, pH 8,0	25 mM
EDTA	10 mM
Glicose	50 mM

3.6.24. Solução de lise alcalina

NaOH	0,2 N
SDS	1%

3.6.25. Acetato de potássio 5 M

Acetato de potássio	3 M
Ácido acético	5 M

3.6.26. IPTG (Isopropil-1-tio-β-D-galactosídeo)

Uma solução estoque foi preparada, dissolvendo-se 200 mg de IPTG em 0,8 mL de água Milli-Q e completando o volume para 1 mL. A solução foi filtrada em membrana Millipore GSWPO2500 e armazenada a -20°C, protegida da luz.

3.6.27. X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo)

Uma solução estoque de 20 mg/mL foi preparada, dissolvendo-se X-Gal em dimetilformamida. A solução foi armazenada a -20°C , e protegida da luz.

3.6.28. Sorbitol 1 M

Sorbitol	18,78 g
Tris-HCl, pH 7,5	1 mL
Água Milli-Q	100 mL

3.6.29. CaCl_2 50 mM

CaCl_2	0,55 g
Água Milli-Q	100 mL

3.6.30. Tris-HCl 100 mM

Tris-HCl 1 M, pH 7,5	1 mL
Água Milli-Q	100 mL

3.6.31. Tampão Fosfato 10 mM

KH_2PO_4	1,25 g
Na_2PO_4	0,10 g
Água Milli-Q	1.000 mL

3.6.32. KCl 0,6 M, Tampão fosfato 10 mM pH 5,8

Na_2HPO_4	0,014 g
KH_2PO_4	0,123 g
KCl	4,47 g
Água Milli-Q	100 mL
pH	6,8

3.6.33. Solução TB

Tampão Pipes (Sigma)	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM

O pH foi ajustado para 6,7 com KOH (aproximadamente 300 µL para 100 mL de TB). Então, foi adicionado MnCl₂ numa concentração final de 55 mM. A solução foi filtrada em membrana Millipore GSWPO2500, com poros de 0,22 µm.

3.6.34. Solução STE

NaCl	0,1 M
Tris-HCl (pH 8,0)	10,0 mM
EDTA (pH 8,0)	1,0 mM

3.6.35. Solução de Cloreto de Lítio

Cloreto de Lítio	5,0 M
------------------	-------

3.6.36. Solução de Ácido *p*-aminobenzóico

ácido <i>p</i> -aminobenzóico	0,05 mg
Água Milli-Q	10 mL

3.7. Manutenção e estoque das culturas e preparo da suspensão de conídios

Os fungos foram crescidos a 25⁰C por 5 dias em placas de Petri, contendo meio completo sólido e estocados sob refrigeração por no máximo cinco dias, quando não utilizados imediatamente. Para a preparação da suspensão de conídios, eles foram raspados da superfície da cultura, com auxílio de uma alça de platina, e colocados em uma solução de Tween 80 0,2%.

3.8. Banco genômico

O banco genômico de *P. expansum* (DIAS, 1997), foi construído com fragmentos de DNA total entre 15 e 20 kb, obtidos por clivagem parcial com *Sau3A* e clonados no vetor fago λ EMBL3. O título do banco genômico foi de $8,1 \times 10^5$ UFP/mL e, depois de amplificado, $2,9 \times 10^{10}$ UFP/mL.

3.9. Preparo de células para infecção por bacteriófagos

Uma colônia isolada da linhagem bacteriana *E. coli* 392, foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 3 mL de meio LB, com agitação de 200 rpm, por 16 horas. Em seguida, 0,3 mL do pré-inóculo, foi inoculado em 30 mL de meio LB, suplementado com MgSO_4 10 mM e maltose 0,2%. Esta cultura foi incubada a 37°C , com agitação de 200 rpm, até atingir 0,5 de absorvância, a 600 nm. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 7000 g e ressuspendidas em 5 mL de MgSO_4 10 mM. A suspensão de células, foi armazenada em geladeira por um período máximo de 3 semanas.

3.10. Identificação de clones do banco genômico

3.10.1. Obtenção da Sonda

Para o isolamento do gene da nitrato redutase, a partir da banco genômico de *P. expansum*, utilizou-se como sonda, um fragmento de DNA que contém o gene *nia* de *Penicillium chrysogenum*, e consiste de 3.170 nucleotídeos da região codificadora (HAAS, et al., 1996). Para liberação do fragmento de DNA de 3,17 Kb, o plasmídeo foi clivado com *Eco* RI e *Sal* I, e foi feita a purificação do fragmento de gel de agarose 0,8% com o uso do “Kit GlaxMax Purification” (Cat. #15549-017, GIBCO BRL).

3.11. Marcação de DNA com d-UTP fluoresceína

Para a marcação da sonda foi usado flúor-d-UTP (Prime-it Fluor Fluorescence Labeling Kit, Cat. #300380, Stratagene), segundo instruções do fabricante.

3.12. Hibridização do DNA em placas de lise

Para a seleção do banco genômico, foi utilizada a metodologia de hibridização de DNA em placas de lise, descrita por BENTON e DAVIS (1977).

Alíquotas contendo 10^5 fagos recombinantes, foram retiradas do estoque do banco genômico e utilizadas para infectar 100 μ L da linhagem bacteriana *E. coli* LE 392, previamente preparada (item 3.9). A mistura bactéria/fagos, foi mantida a 37⁰C, por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 3 mL de LB semi-sólido e a mistura foi vertida em placas de Petri, contendo meio LB sólido. Essas placas foram incubadas a 37⁰C, por 16 horas. Depois desse período, as placas foram mantidas, por uma hora, a 4⁰C.

Membranas de náilon, devidamente identificadas a lápis em três pontos assimétricos para posterior identificação de pontos positivos, foram colocadas em contato com a superfície do ágar, para a transferência dos fagos recombinantes contidos nas placas de lise e deixadas por um período de 15 minutos, a 4⁰C. Antes das membranas serem retiradas, as placas de Petri foram marcadas nos mesmos pontos em que a membrana foi marcada, com caneta de retroprojektor.

As membranas foram retiradas e colocadas em bandejas contendo papel-filtro embebido em solução de desnaturação e em solução de fixação, onde o lado da membrana em contato com as placas de lise, ficou sempre voltado para cima, permanecendo em cada solução por um período de 30 segundos. Logo após, estas membranas foram colocadas sobre toalhas de papel para que secassem expostas à luz ultravioleta, por cinco minutos, para a fixação do DNA. As membranas foram tratadas com uma solução de pré-hibridização por 5 horas e, a seguir, foi colocada a solução de hibridização contendo a sonda marcada e deixado por um período de 16 a 18 horas, à temperatura de 60⁰C. Depois desse período, as membranas foram submetidas a lavagens de 20 minutos, na seguinte ordem: SSC

2X, SDS 0,1% (2 vezes), SSC 1X e SDS 0,1% (2 vezes). A detecção dos sinais positivos foi feita utilizando-se o Kit “Iluminator™ Chemiluminescent Detection System”, Cat.#300360, Stratagene. As membranas foram postas em contato com filmes RaioX (Filme KODAK X-OTMATIC K), por 30 minutos, antes da etapa de revelação.

As placas de lise que corresponderam ao sinal positivo observado no filme, foram coletadas com pipetas Pasteur e eluídas em 1 mL de tampão SM. Foi adicionado clorofórmio na concentração final de 0,4% e os tubos, deixados à temperatura ambiente por um período de 2 horas; com agitação manual ocasional, para que as partículas de fagos difundissem do ágar para o tampão. Para a confirmação dos sinais positivos, foram feitas diluições de cada eluição e alíquotas com aproximadamente 200 fagos foram utilizadas para infectar células da linhagem bacteriana *E. coli* LE 392. A placa de lise, que correspondia ao sinal positivo, foi eluída e novamente feita a infecção da bactéria *E coli* LE 392 para se obter lise confluyente, com o objetivo de se fazer o estoque dos fagos recombinantes de interesse. O tampão SM foi adicionado sobre as placas, que foram mantidas a 4⁰C por 12 horas. A suspensão foi coletada, o clorofórmio foi adicionado na concentração final de 0,4% e as alíquotas foram armazenadas a 4⁰C.

3.13. Caracterização dos fagos recombinantes

3.13.1. Extração de DNA de fagos recombinantes

Inicialmente, para a extração do DNA dos fagos recombinantes, 100 µL da suspensão de fagos foram adicionados a 200 µL de células da linhagem bacteriana *E. coli* LE 392, previamente preparada (item 3.9). Depois de 20 minutos, a 37⁰C, a mistura foi inoculada em 30 mL de LB e incubada à mesma temperatura, por 18 horas, com agitação de 150 rpm. Em seguida, foi adicionado 0,6 mL de clorofórmio e a agitação foi aumentada para 250 rpm, durante 10 minutos. O lisado foi transferido para tubos Corex e centrifugado a 7.000 g, por 5

minutos. O sobrenadante foi recolhido e adicionaram-se 10 mL de uma solução de PEG 6.000/NaCl. Os tubos foram mantidos em gelo por 1 hora. Nova centrifugação foi feita a 7.000 g, durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento seco e ressuspenso em 500 µL de tampão SM. As enzimas DNase e RNase, foram adicionadas para a concentração final de 1 µg/mL e a suspensão foi incubada por 30 minutos, a 37^oC. Em seguida, foi adicionado à solução, 1 µL de solução de protease e 21 µL de SDS 10%, e a suspensão foi incubada por 10 minutos, à temperatura ambiente.

Foram feitas desproteínizações com um volume de fenol tamponado, um volume de fenol-clorofórmio e um volume de clorofórmio, nesta mesma seqüência. O DNA foi precipitado na presença de acetato de amônio, na concentração final de 2,5 M e um volume de isopropanol, durante 2 horas, a -20^oC. Logo após, a mistura foi centrifugada a 12.000 g, por 30 minutos. O DNA foi lavado com etanol 70% , seco e ressuspenso em 20 µL de TE. A análise da preparação de DNA foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.13.2. Análise por hibridização

Os fagos recombinantes foram clivados com enzimas de restrição e imobilizados numa membrana, de acordo com metodologia descrita por SOUTHERN (1975). Os fragmentos de DNA, resultantes das clivagens, foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, tratados em soluções de desnaturação e neutralização. Em seguida, foi feita transferência dos fragmentos para membrana de náilon por capilaridade. Foi feita fixação dos fragmentos à membrana, utilizando luz ultra-violeta. A hibridização com a sonda contendo o gene *nia* de *P. chrysogenum*, foi feita segundo metodologias descritas por SAMBROOK et al., (1989).

3.13.2.1. Condições de hibridização

A membrana foi incubada por 5 horas, sob agitação lenta, em 10 mL de solução de pré-hibridização, a 60^oC. Após este período, a solução de pré-hibridização foi descartada e substituída por 10 mL da solução de hibridização,

previamente fervida e resfriada em banho de gelo. A membrana foi incubada por 16 horas, com agitação lenta, a 60⁰C. Seguiram-se 2 lavagens, na mesma temperatura de hibridização: duas vezes com SSC 2X, SDS 0,1%, e duas vezes com SSC 1X, SDS 0,1%, todas por 20 minutos, com agitação lenta. O resultado da hibridização foi detectado por exposição do filme radiográfico (KODAK X-OTMATIC K) à membrana, por 20 minutos. A revelação foi feita em sala escura, deixando-se o filme por 2 minutos em solução de revelação (Cat. # 6492177, KODAK) seguida de lavagem em água, para então ser colocado no fixador (Cat. # 6491724, KODAK), pelo mesmo período de tempo.

3.14. Purificação de fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA do fungo, clonados nos fagos recombinantes e que hibridizaram com o fragmento de 3,17 Kb, foram purificados do gel utilizando o kit “Glass Max” Gibco-BRL. Inicialmente, a banda no gel de agarose foi cortada, resultando num fragmento que foi colocado num Eppendorf com 500 µL de “Binding Solution”. Em seguida, foram adicionados 33,4 µL de tampão TBE. A mistura foi incubada a 50⁰C por 5-7 minutos até que toda a agarose estivesse dissolvida. Em seguida, adicionaram-se 10 µL de “Glass max”. Agitou-se a mistura brandamente por 5 minutos, e esta permaneceu em repouso por 30 minutos. A mistura foi centrifugada a 12.000 g, por 20 segundos e o sedimento foi lavado em 400 µL de tampão “Wash buffer Glass max”, a 4⁰C. A operação foi repetida 3 vezes e, a cada lavagem, foi feita centrifugação a 12.000 g, por 20 segundos, e o sobrenadante foi descartado em seguida. Após a última lavagem, o Eppendorf foi colocado para secar ao ar. Adicionaram-se 10 µL de TE e incubou-se a 50⁰C, por 3 minutos. Novamente, foi feita centrifugação a 12.000 g, por 20 segundos, coletando-se o sobrenadante e colocando-o em Eppendorf novo. Adicionaram-se 10 µL de TE ao sedimento ressuspensionado e incubou-se a 50⁰C por 3 minutos. Foi feita uma centrifugação a 12.000 g, por 20 segundos.

3.15. Subclonagem dos fragmentos de DNA

O plasmídeo pBluescript SK+, foi utilizado como vetor para a subclonagem dos fragmentos do DNA isolados do genoma do fungo e clonados nos fagos recombinantes.

A reação de clivagem do fago com *Kpn* I, foi adicionada a um tubo contendo o vetor pBluescript SK+, previamente clivado com a mesma enzima de restrição. A reação de ligação, totalizando um volume de 10 μ L, consistiu em 1 μ L do plasmídeo pBluescript SK+ (50 ng); 7 μ L da reação de clivagem (1.050 ng de DNA); 1 μ L do tampão de ligação (10x); 0,5 μ L da enzima T4 ligase (0,1 U); 0,5 μ L de água Milli-Q. A mistura foi incubada por 6 horas, a 16^oC. Após este período, a T4 DNA ligase foi inativada a 70^oC, por 10 minutos.

3.16. Transformação Bacteriana

Os experimentos de transformação foram feitos como descrito por INOUE et al. (1990). A linhagem bacteriana utilizada nos experimentos de transformação foi *E. coli* DH5 α . No preparo de células competentes, uma colônia desta bactéria foi inoculada em 100 mL de meio SOB e cultivada sob agitação de 150 rpm, a 37^oC. As células foram mantidas nessa condição até atingirem 0,6 de absorvância, em comprimento de onda de 600 nm. Em seguida, as células foram colocadas no gelo por 10 minutos e centrifugadas a 2.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas, gentilmente, com pipeta Pasteur descartável, em 30 mL de TB gelado, que foram mantidas no gelo por 10 minutos. Foi feita nova centrifugação, desta vez a 900 g e o sedimento foi ressuspensado em 8 mL de TB. Foi adicionado dimetil sulfoxido (DMSO) a uma concentração final de 7%, e a amostra foi deixada no gelo por mais 10 minutos. Em seguida, alíquotas de 200 μ L da amostra foram distribuídas em Eppendorfs e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, para então serem armazenadas a -80^oC. Para a transformação, 200 μ L das células competentes foram misturados a 10 μ L da reação de ligação, sendo deixadas por 30 minutos no gelo. Em seguida, a mistura foi submetida a 42^oC, por 45 segundos. Após este choque

térmico, a mistura foi deixada no gelo por 10 minutos e, em seguida, foi adicionado 0,8 mL de solução SOC pré-aquecida. A mistura foi então mantida a 37^oC sob agitação de 200 rpm, durante 1 hora. Uma alíquota de 200 µL da reação foi espalhada, com auxílio de alça de Drigalski, em placas de Petri com meio LB contendo ampicilina, na concentração de 50 µg/mL e X-Gal 4%. As placas foram incubadas a 37^oC, por 16 horas. As colônias contendo o plasmídeo recombinante, foram repicadas para meio LB com ampicilina/X-Gal para confirmação e, então, utilizadas para a extração de DNA plasmidial.

3.17. Extração de DNA plasmidial direto de colônias

Uma colônia isolada de cada célula recombinante, foi inoculada em Eppendorf com 40 µL de solução de lise, deixado à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 3 µL de HCl 1N mais 5 µL de azul de bromofenol. O Eppendorf foi mantido a -80^oC, por 20 minutos e, em seguida, foi centrifugado a 12.000, por 5 minutos. Todo o sobrenadante foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.18. Extração de DNA plasmidial em grande escala

Foi feita a extração de DNA plasmidial em grande escala, segundo metodologia descrita por SAMBROOK et al., (1989). O pré-inóculo, foi preparado a partir de uma colônia isolada da linhagem bacteriana *E. coli* DH5α, que foi inoculada em 30 mL de meio LB, contendo ampicilina na concentração de 50 µg/mL. O pré-inóculo foi incubado a 37^oC, sob agitação de 150 rpm, por 16 horas. Em seguida, todo o pré-inóculo foi adicionado a um frasco contendo 500 mL de meio LB adicionado de ampicilina, a uma concentração de 50 µg/mL, previamente aquecido. O frasco foi incubado a 37^oC sob agitação de 200 rpm até a saturação do meio. A cultura foi centrifugada a 2.780 g, por 15 minutos, a 4^oC, em tubos GSA. O sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram ressuspensas em 100 mL de solução STE gelada. Foi feita nova centrifugação a 2.780 g por 15 minutos, a 4^oC e o sedimento obtido foi ressuspensado em 18

mL de solução de glicose/Tris-HCl/EDTA. Em seguida, foram adicionados 40 mL de solução de lise alcalina. O tubo foi invertido várias vezes para misturar os componentes da solução e, em seguida, foi deixado por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 20 mL de solução de acetato de potássio 5 M ao tubo, que foi invertido várias vezes. Em seguida, foi feita centrifugação a 2.780 g por 15 minutos, a 4^oC. O sobrenadante foi filtrado em quatro camadas de gaze. Foi adicionado 0,6 volume de isopropanol à amostra, que foi deixada à temperatura ambiente por 10 minutos. Os ácidos nucléicos foram recuperados por centrifugação a 4.344 g, por 15 minutos, à temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e, em seguida, ressuspenso em 3 mL de TE.

O plasmídeo foi purificado pelo método que utiliza polietileno glicol (SAMBROOK et al., 1989). A solução de ácidos nucléicos obtida anteriormente, foi transferida para tubo Corex de 15 mL. Foram adicionados 3 mL de solução de cloreto de lítio 5 M gelada. A amostra foi centrifugada a 12.767 g a 4^oC, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubo Corex de 30 mL, ao qual foi adicionado igual volume de isopropanol. Foi feita novamente centrifugação a 12.767 g por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado com etanol 70%. O tubo foi deixado em posição invertida por poucos minutos para que secasse. O sedimento foi ressuspenso em 500 µL de TE contendo RNase a uma concentração de 20 µg/mL, foi transferido para tubo Eppendorf e deixado à temperatura ambiente por 30 minutos. Foram adicionados 500 µL de uma solução de NaCl 1,6 M contendo 13% (p/v) de polietileno glicol (PEG 8.000). Os plasmídeos foram recuperados por centrifugação a 12.000 g por 5 minutos. Todo o sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspenso em 400 µL de TE. Em seguida, foram feitas desproteinizações com soluções de fenol-clorofórmio e clorofórmio. A fase aquosa foi transferida para tubo novo, ao qual foram adicionados 100 µL de acetato de amônio 10 M. Foi adicionado 1 mL de etanol ao conteúdo, que foi deixado à temperatura ambiente por 10 minutos. Foi feita nova centrifugação a

12.000 g por 5 minutos. Todo o sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspenso em 300 µL de TE.

3.19. Construção do mapa de restrição

O plasmídeo recombinante foi clivado com diferentes enzimas de restrição que apresentam apenas um sítio de restrição no vetor pBluescript SK+. A reação de clivagem foi feita em Eppendorfs contendo o DNA, a enzima de restrição e o tampão de reação equivalente à enzima utilizada. A reação foi colocada em banho-maria, à temperatura ótima de cada enzima, por 4 horas e checada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.20. Obtenção de protoplastos

A obtenção dos protoplastos foi baseada no método de BALLANCE e TURNER (1985). Uma placa de Petri, contendo meio completo e uma folha de papel celofane sobre a superfície do meio, foi inoculada com 200 µL de uma suspensão de 10^7 conídios/mL, e incubada por 24 horas a 25°C. O micélio foi coletado da superfície da placa com auxílio de uma espátula, ressuspenso numa solução de KCl 0,6 M e tampão fosfato 10 mM pH 5,8 contendo 5 mg/mL de Glucanex CH4243 (Novo Nordisk) e incubado a 27°C, sob agitação lenta. Os protoplastos foram separados dos fragmentos de hifas por filtração em seringa com gaze e lavados 3 vezes em Sorbitol 1 M, CaCl₂ 50 mM e Tris-HCl 100 mM (SCT) por centrifugação. O sedimento contendo os protoplastos foi ressuspenso em SCT.

3.21. Transformação de protoplastos de *P. expansum*

A transformação foi baseada no método de YELTON et. al (1984) e BALLANCE e TURNER (1985). Os protoplastos foram misturados com 1 µL de solução de DNA plasmidial (2,5 µg/µL), purificado com polietileno glicol 8.000, e 50 µL de polietilenglicol 6.000 60%. As misturas foram incubadas a 0°C por 20 minutos, seguindo-se a adição de 0,5 mL da mesma solução de polietileno

glicol. Após 20 minutos a 25⁰C, o volume foi completado para 1,5 mL com SCT. Os protoplastos foram recuperados por centrifugação, ressuspensos em 0,5 mL de SCT e em seguida, colocados para regenerar em meio mínimo com estabilizador osmótico, pelo método “pour plate”, e mantidos a 27⁰C por 3 dias.

3.22. Análise da frequência de regeneração

Para a análise da frequência de regeneração, os protoplastos foram tratados com PEG 6.000, CaCl₂, diluídos e plaqueados em meio completo, meio completo cortando sacarose 1 M e em meio mínimo adicionado de ácido *p*-aminobenzóico. Em seguida, foram incubados a 25⁰C por aproximadamente 3 dias. A frequência de regeneração foi calculada com base na fórmula abaixo:

$$Fr = \frac{NCMcSac - NCMc}{N^0 \text{ de protoplastos}} \times 100$$

Fr- frequência de regeneração

NCMcSac- número de colônias crescidas em meio completo com sacarose

NCMc- número de colônias crescidas em meio completo

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento do gene da nitrato redutase de *P. expansum*

O gene que codifica a nitrato redutase foi isolado de um banco genômico de *P. expansum* (DIAS, 1997). Foi utilizado como sonda um fragmento de DNA que consiste de 3.170 nucleotídeos, correspondendo à região codificadora do gene da nitrato redutase (*niaD*) de *P. chrysogenum*.

Considerando que o tamanho do genoma de *P. expansum* está na ordem de 10^7 pares de bases, de acordo com o que foi encontrado em outras espécies de fungos filamentosos (GURR et al., 1987), seriam necessários $3,1 \times 10^3$ clones recombinantes, para que se tivesse a probabilidade de 99% de que um gene cópia única estivesse contido no banco genômico construído. Portanto, podemos considerar que o banco genômico construído por DIAS (1997), contendo $8,1 \times 10^5$ UFP/mL e após a amplificação $2,7 \times 10^{10}$ UFP/mL, é representativo.

A detecção de fagos recombinantes foi feita por meio de hibridização com as placas de lise, tendo sido realizados dois experimentos sucessivos. No primeiro experimento ou primeiro “screening” do banco genômico, foram analisadas 150.000 placas de lise, entre as quais 14 hibridizaram com a sonda. Para confirmar se essas 14 placas de lise correspondiam a clones positivos, foi feito um segundo “screening”, e 6 clones foram confirmados. A Figura 1A mostra um dos clones selecionados no primeiro “screening” e o mesmo clone

após amplificado (Figura 1B). Os fagos recombinantes selecionados receberam a denominação de λ PENR1, λ PENR2, λ PENR3, λ PENR4, λ PENR5 e λ PENR6.

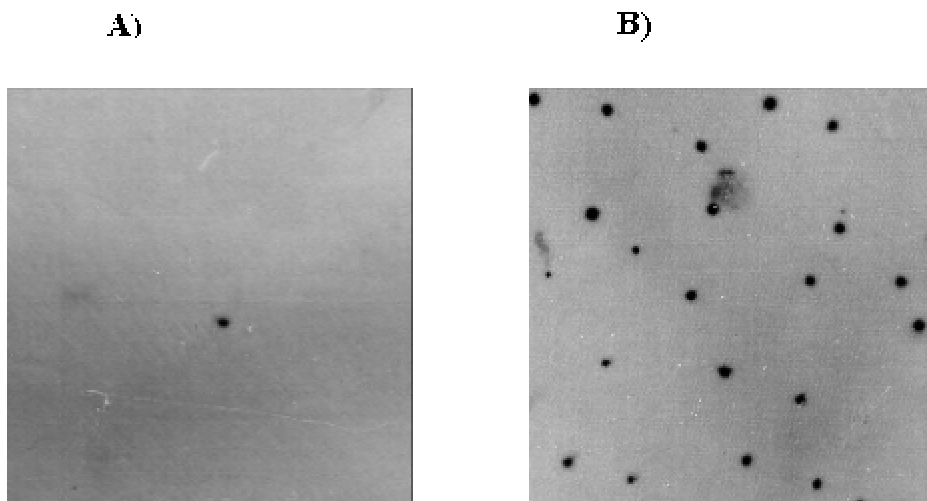


Figura 1 – Hibridização do banco genômico de *P. expansum* com a sonda contendo o gene *nia* de *P. chrysogenum*. **A)** Primeiro “screening”; **B)** Segundo “screening”.

O segundo experimento de hibridização foi realizado para a confirmação dos clones positivos, pois pontos observados no filme de raio-X, devido à presença de impregnações de sujeira na membrana de nylon, podem ser confundidos com sinais positivos. O número de clones positivos encontrados em experimentos de clonagem por hibridização, descritos por diferentes pesquisadores, é extremamente variável e depende do número de cópias do gene presente no banco genômico que foi utilizado. O gene *niaD* de *P. chrysogenum* foi isolado de um banco genômico, utilizando como sonda o gene *niaD* de *A. nidulans*. Na hibridização do banco genômico, construído no vetor λ EMBL3, 11

fagos hibridizaram com a sonda (GOUKA et al., 1991). O isolamento do gene *nia* de *Leptosphaeria maculans*, descrito por WILLIAMS et. al. (1994), utilizou como sonda o gene *nia* de *A. nidulans*. Na hibridização do banco genômico, construído no vetor λ GEM-11, apenas um fago recombinante, contendo um inserto de 10 Kb, foi isolado. AVILA et al. (1995) relatam o isolamento de 17 fagos recombinantes de um banco genômico de *H. polymorpha*, construído no vetor λ EMBL3, utilizando como sonda um fragmento de DNA de 350 pb, sintetizado por PCR. Na verdade, um único clone positivo que apresente o gene completo é suficiente. Como existe somente uma cópia do gene *nia* no genoma dos fungos filamentosos estudados até agora, pode-se inferir que *P. expansum* também possui uma única cópia do mesmo gene. No entanto, é preferível fazer o isolamento de vários clones diferentes, para que se tenha uma garantia maior de que pelo menos um deles vá apresentar o gene completo.

4.2. Análise dos fagos recombinantes

O DNA dos seis fagos recombinantes foi extraído, e a liberação do fragmento de DNA genômico clonado foi feita pela clivagem com a enzima de restrição *Sal* I, que libera os braços do vetor fago λ EMBL3 (Figura 2A). Por meio de hibridização, foi possível inferir que os fagos λ PENR2 e λ PENR4, até então tidos como clones positivos, não possuíam o gene *nia* de *P. expansum* clonado, uma vez que nenhum fragmento resultante da clivagem com *Sal* I hibridizou com gene *nia* de *P. chrysogenum*. Os outros quatro fagos selecionados apresentaram fragmentos de DNA que hibridizaram com a sonda (Figura 2B).

O DNA do fago λ PENR1 apresentou um padrão de 8 bandas, sendo duas correspondentes aos braços direito e esquerdo do fago λ EMBL3, e outras 6 correspondentes ao fragmento inserido entre os braços, totalizando 14,4 Kb de inserto. O DNA do fago λ PENR3 apresentou um padrão de 7 bandas, 2 correspondentes aos braços do vetor e outras 5 totalizando 12,0 Kb de inserto. O DNA do fago λ PENR5 apresentou um padrão de 5 bandas, sendo duas correspondentes aos braços do vetor, e outras 3 totalizando 12,3 Kb de inserto.

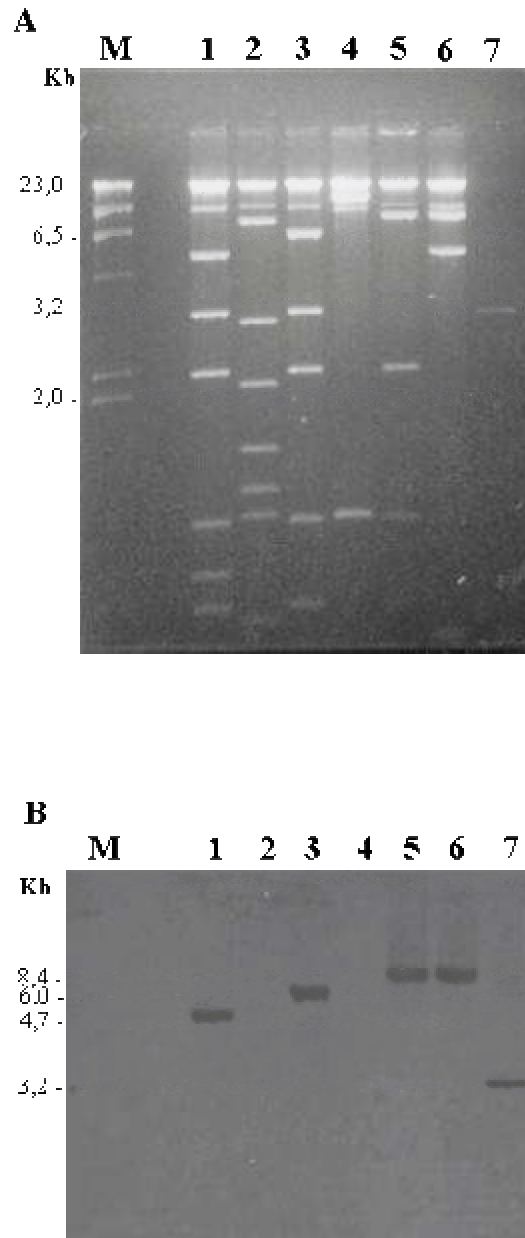


Figura 2 – **A.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA dos fagos recombinantes, clivado com a enzima de restrição *Sal* I. **B.** Autoradiografia da hibridização com o gene *nia* de *P. chrysogenum*. λ PENR1 (1), λ PENR2 (2), λ PENR3 (3), λ PENR4 (4), λ PENR5 (5) e λ PENR6 (6). Gene *nia* de *P. chrysogenum* (7). M: DNA de fago λ clivado com *Hind* III.

O DNA do fago λ PENR6, também digerido com *Sal* I, apresentou um padrão de 4 bandas, 2 correspondentes aos braços do vetor e outras 2 totalizando 12,6 Kb de inserto. Os fragmentos de DNA que hibridizaram com o gene *nia* de *P. chrysogenum* foram os de 4,7, 6,0, 8,4 e 7,6 Kb, dos clones λ PENR1,

λ PENR3, λ PENR5 e λ PENR6, respectivamente. O menor fragmento de DNA a hibridizar com a sonda pertence ao clone λ PENR1, com 4,7 Kb. O maior fragmento que hibridizou com a mesma sonda foi o do clone λ PENR5, com 8,4 Kb (Figura 2A).

4.3. Construção do mapa de restrição do fago recombinante λ PENR3

O fago recombinante λ PENR3 foi escolhido aleatoriamente para uma análise mais detalhada. Visando a construção de um mapa de restrição do fago λ PENR3, foram feitas clivagens simples e duplas com enzimas de restrição que possuem sítio de clivagem também nos braços do vetor λ EMBL3. A Figura 3 mostra o padrão de restrição do DNA do fago λ PENR3 em gel de agarose 0,8% e a hibridização com o gene *nia* de *P. chrysogenum*. O padrão de migração das bandas no gel de agarose e os resultados da hibridização permitiram o estabelecimento do mapa físico de restrição (Figura 4). Foi possível localizar no fragmento clonado, sítios para *Kpn* I e para *Pvu* I.

Pela análise do mapa físico de restrição do DNA do fago λ PENR3, foi observado que o gene da nitrato redutase de *P. expansum* não está ligado a nenhum dos braços do vetor. Isso indica que, provavelmente, o gene da nitrato redutase de *P. expansum* deve estar completo.

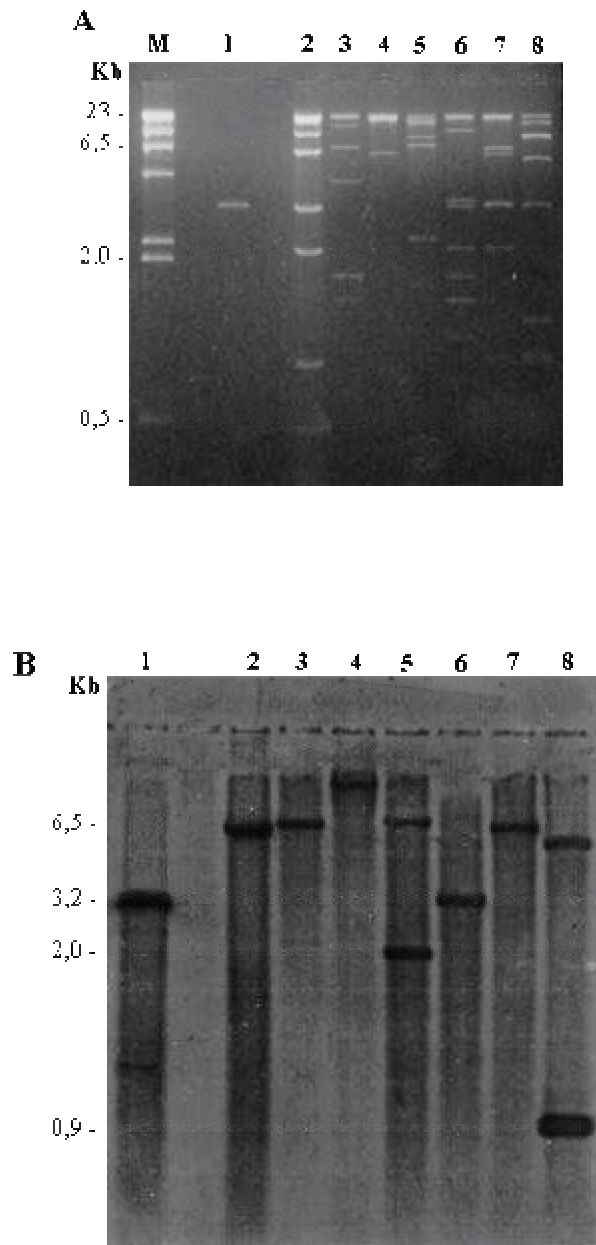


Figura 3 – **A.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA do fago recombinante λ PENR3, clivado com enzimas de restrição. (1) Fragmento de 3,17 Kb de *P. chrysogenum*; (2) O DNA de λ PENR3, clivado com *Sal* I, (3) *Kpn* I, (4) *Sma* I, (5) *Pvu* I, (6) *Sal* I/*Kpn* I, (7) *Sal* I/*Sma* I, (8) *Sal* I/*Pvu* I. **B.** Auto-radiografia da hibridização com o gene *nia* de *P. chrysogenum*. M: DNA de fago λ clivado com *Hind* III.

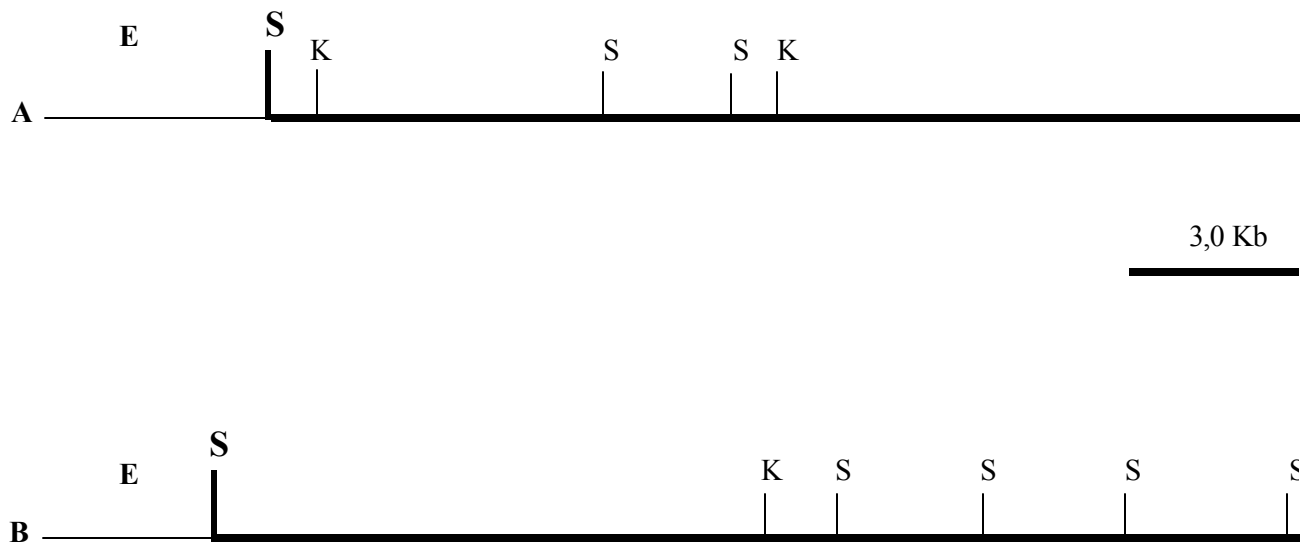


FIGURA 4. Mapa físico de restrição do DNA dos fagos recombinantes λ PEPG3 (A) e λ PEPG4 (B). E: braço esquerdo do vetor λ EMBL3, D: braço direito do vetor λ EMBL3

4.4. Subclonagem e caracterização do fragmento de DNA contendo o gene *nia* de *P. expansum*

Na Figura 3 pode ser observado que na clivagem do DNA do fago λ PENR3 com a enzima *Kpn* I, há um fragmento de DNA de aproximadamente 6,5 Kb que hibridizou com a sonda de 3,17 Kb de *P. chrysogenum*. A escolha desta banda para a subclonagem baseou-se em comparações entre genes *nia* de outras espécies de *Penicillium*. O gene *nia* de *P. chrysogenum* e *P. griseoroseum* possuem aproximadamente 3,0 Kb. Dessa forma, supõe-se que o fragmento de 6,5 Kb/*Kpn* I, que hibridizou com o fragmento de 3,17 Kb de *P. chrysogenum*, possui o gene *nia* de *P. expansum* completo, constituindo um fragmento interno do inserto, ou seja, não está ligado aos braços do vetor λ EMBL3. A enzima *Sal* I não foi usada para a subclonagem do gene porque o gene *nia* de *P. chrysogenum* e de *P. griseoroseum* apresenta um sítio de clivagem para *Sal* I (HAAS et al., 1996; PEREIRA, comunicação pessoal).

O fragmento de DNA de 6,5 Kb/*Kpn* I foi purificado do gel de agarose para ser ligado ao plasmídeo pBluescript SK+, linearizado com *Kpn* I. Foram feitas várias tentativas para inserir o fragmento *Kpn* I no vetor porém, sem sucesso. Foi utilizada então uma outra estratégia, onde foi usado o DNA total do fago λ PENR3 clivado com *Kpn* I na reação de ligação com o vetor pBluescript SK+, clivado com a mesma enzima. O único inconveniente desta estratégia é que o DNA do fago λ PENR3 digerido por *Kpn* I, resultou em 7 fragmentos de tamanhos diferentes e, teoricamente, todos eles poderiam ser ligados ao vetor pela enzima T4 DNA ligase.

Foi observada uma alta eficiência de transformação, sendo isolada uma média de 137 colônias com plasmídeos recombinantes por placa de Petri. Foram selecionadas 38 destas colônias e, após confirmação da resistência à ampicilina das bactérias transformadas, o DNA plasmidial foi extraído diretamente de colônias. Todo o volume resultante da extração foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% e foram selecionados 10 plasmídeos. O DNA desses plasmídeos foi extraído e clivado com *Kpn* I, para liberar o fragmento clonado. Por meio de análise eletroforética em gel de agarose 0,8%, foi confirmada a

presença apenas do fragmento de DNA *Kpn* I, de 6,5 Kb, em 7 plasmídeos recombinantes, entre os 10 selecionados. A análise por hibridização utilizando a sonda de 3,17 Kb, mostrou que os 7 plasmídeos selecionados apresentaram fragmentos de DNA que hibridizaram com o gene *nia* de *P. chrysogenum*. Esses resultados comprovam a ligação dos fragmentos contendo o gene da nitrato redutase de *P. expansum* ao plasmídeo pBluescript SK+. Tanto a análise por hibridização, quanto a análise do tamanho dos fragmentos em gel de agarose confirmaram tal ligação (dados não mostrados).

Foi escolhido um dos plasmídeos recombinantes, que foi designado pPENR, para se fazer o mapa de restrição e, posteriormente, a transformação do mutante para a nitrato redutase de *P. expansum*. O DNA do plasmídeo recombinante pPENR, gerado pela clonagem do fragmento de 6,5 Kb/*Kpn* I, foi clivado com diferentes enzimas de restrição, foi feita a migração dos fragmentos de DNA em gel de agarose e a hibridização com o gene *nia* de *P. chrysogenum* (Figura 5). As clivagens simples e duplas permitiram o estabelecimento do mapa físico de restrição (Figura 6). O fragmento de DNA clonado tem sítio para *Eco* RI, *Eco* RV, *Sal* I, porém não foi encontrado sítio de restrição para *Hind* III. No gene *niaD* de *P. chrysogenum* foram encontrados dois sítios para a enzima *Eco* RV e um sítio para *Pvu* I, *Xho* I, *Sal* I e *Hind* III (HAAS e MARZLUF 1995; GOUKA et al. 1991).

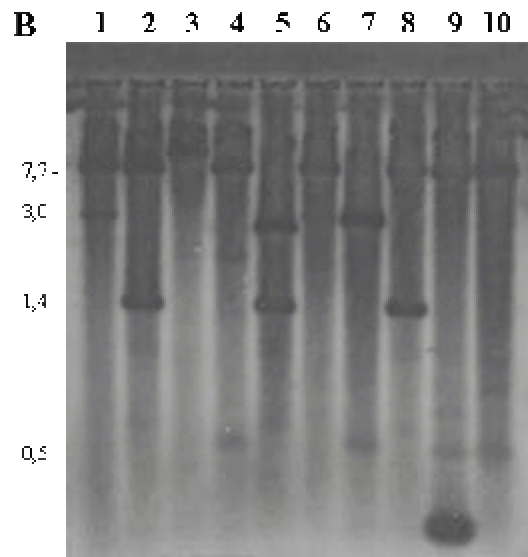
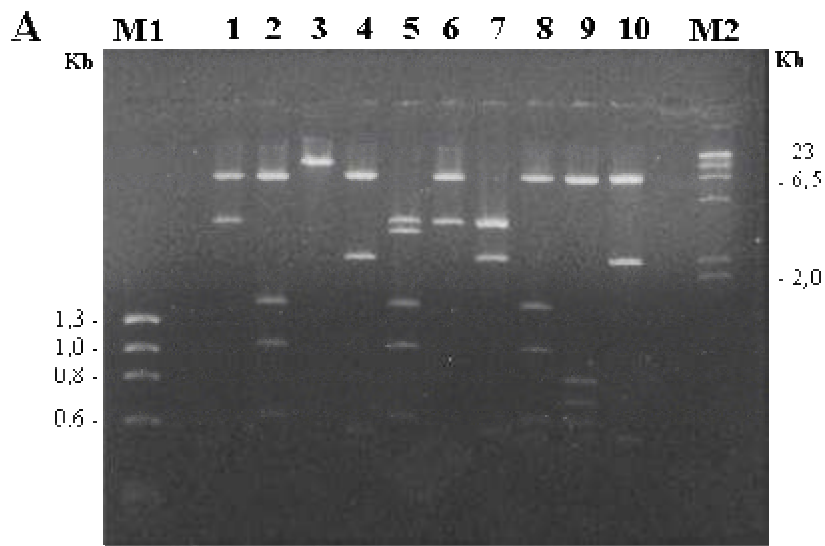


Figura 5 – **A.** Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA do plasmídeo recombinante pPENR, clivado com as enzimas de restrição. *Eco* RI (1), *Eco* RV (2), *Hind* III (3), *Sal* I (4), *Eco* RI/ *Eco* RV (5), *Eco* RI/*Hind* III (6), *Eco* RI/*Sal* I (7), *Eco* RV/*Hind* III (8), *Eco* RV/*Sal* I (9), *Hind* III/*Sal* I (10). M1: DNA de fago ϕ X174 clivado com *Hae* III. M2: DNA de fago λ clivado com *Hind* III. **B.** Auto-radiografia da hibridização com o fragmento de 3,17 Kb de *P. chrysogenum*.

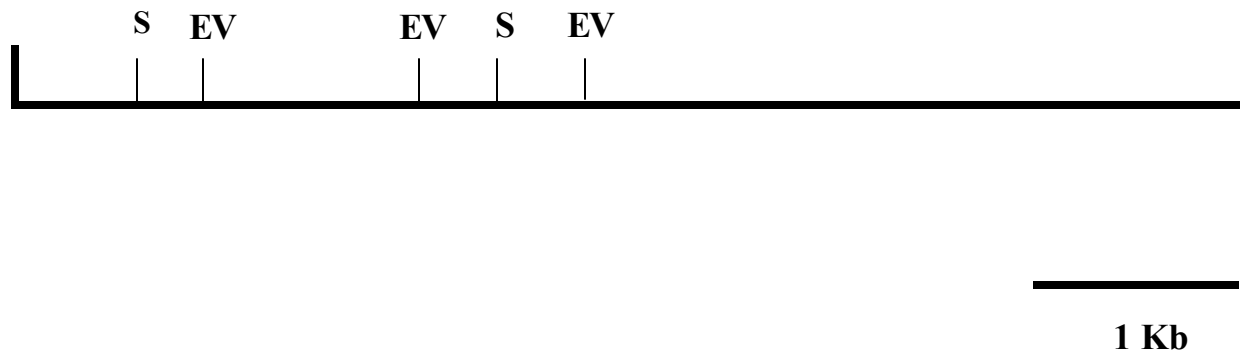


Figura 6- Mapa físico de restrição do fragmento de 6,5 Kb/*Kpn* I, do plasmídeo recombinante pPENR. EI (*Eco* RI), EV (*Eco* RV), K (*Kpn* I) e S (*Sal* I).

4.5. Transformação do mutante Nia^- de *P. expansum* utilizando o plasmídeo recombinante pPENR.

Para verificar se o plasmídeo pPENR continha o gene *nia* de *P. expansum*, foi feito um experimento de transformação, utilizando mutante Nia^- de *P. expansum*. Após três dias de incubação a 37°C, foram observadas colônias Nia^+ , mostrando que o plasmídeo pPENR foi capaz de transformar o mutante Nia^- . A frequência de transformação foi de 16 transformantes por μg de DNA, o que nos permite afirmar que o fragmento clonado apresenta realmente o gene que codifica a nitrato redutase de *P. expansum*. Dessa forma, ficou estabelecido um sistema homólogo de transformação para *P. expansum*. Este sistema foi superior ao sistema estabelecido por RIBEIRO et al. (1998), que utilizaram o gene *nia* de *F. oxysporum* e obtiveram uma frequência de 8 transformantes por μg de DNA. Segundo GOUKA et al. (1991), transformações utilizando genes homólogos geralmente resultam em altas frequências de transformação, quando comparadas com transformações utilizando genes heterólogos.

O vetor pPENR também foi utilizado para transformar mutantes Nia^- de *P. griseoroseum*, e foi obtida uma frequência de 16 transformantes por μg de DNA, igual ao resultado obtido com *P. expansum* (Tabela 1). Este resultado foi diferente daqueles obtidos com outras espécies, onde as frequências de transformação com o gene da nitrato redutase foram bastante variáveis. Os fungos *Stagnospora nodorum* (CUTLER e COOLEY, 1998) e *Cephalosporium acremonium* (WHITEHEAD et al. 1990) foram transformados com genes homólogos da nitrato redutase e a frequência de transformação variou de 7,8 a 40 transformantes por μg de DNA, respectivamente. TUDZYNSKI et al. (1996) transformaram *Gibberella fujikuroi* com o gene homólogo da nitrato redutase e obtiveram 200 transformantes por μg de DNA. Um resultado interessante foi o obtido para *P. chrysogenum*, um fungo que possui sistemas de transformação homólogo e heterólogo baseados no gene *nia*. Foi obtida uma frequência de 40 transformantes por μg de DNA para o sistema homólogo e uma frequência similar foi obtida para o sistema heterólogo, utilizando o gene *nia* de *A. oryzae* (GOUKA et al. 1991).

Tabela 1 – Frequências de transformação obtidas para *P. expansum* e *P. griseoroseum*, utilizando os plasmídeos pPENR e pNH24.

Microrganismo	Vetor	Frequência de transformação ^c
<i>P. expansum</i>	pPENR ^a	16
<i>P. expansum</i>	pNH24 ^b	8
<i>P. griseoroseum</i>	pPENR	16

a- plasmídeo pPENR: construído a partir de um fragmento de 6,5 Kb/*Kpn* I, contendo o gene *nia* de *P. expansum*, subclonado em pBluescript SK+.

b- plasmídeo pNH24: construído a partir de um fragmento de 4 Kb *Hind* III, contendo o gene *nia* de *F. oxysporum* subclonado em pUC19.

c- número de transformantes por µg de DNA.

A viabilidade dos protoplastos após tratamento com PEG foi de 51%, portanto superior à definida para *P. expansum* por DIAS (1997), que obteve 46% de regeneração para *P. expansum* e 57% para *P. griseoroseum*. Em *P. chrysogenum*, a regeneração dos protoplastos foi superior a 40% (WHITEHEAD, et al. 1989). Provavelmente a alta viabilidade dos protoplastos tenha aumentado a frequência de transformação em *P. expansum*. É possível que a frequência de transformação possa ser aumentada ao se otimizar vários parâmetros no protocolo. A otimização aumentou dez vezes a frequência de transformação com gene *nia* em *A. niger* (CAMPBELL et al. 1989) e *Fusarium oxysporum* (LANGIN et al. 1990). Uma outra alternativa que poderia ser testada para aumentar a frequência de transformação é a utilização de DNA linearizado, pois tal estratégia aumentou a frequência com o gene da nitrato redutase em outras espécies (UNKLES et al. 1989 a,b; DIOLEZ et al. 1993).

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Foi feita a hibridização do banco genômico de *P. expansum* com um fragmento de DNA de 3,17 Kb, que corresponde à parte do gene que codifica a nitrato redutase em *P. chrysogenum*. Na análise de 150.000 fagos recombinantes, seis fagos foram isolados, dos quais quatro foram positivos e denominados λ PENR1, λ PENR3, λ PENR5 e λ PENR6. O DNA dos fagos recombinantes foi submetido à clivagem com a enzima *Sal* I, evidenciando-se fragmentos de DNA clonados de 14,4; 14,4; 12,3 e 12,6 Kb, dos fagos λ PENR1, λ PENR3, λ PENR5 e λ PENR6, respectivamente. Os fragmentos de DNA que hibridizaram com a sonda de 3,2 Kb de *P. chrysogenum* apresentaram 4,7 Kb (λ PENR1), 6,0 Kb (λ PENR3), 8,4 Kb (λ PENR5) e 7,6 Kb (λ PENR6).

Para a construção do mapa físico de restrição do DNA do fago recombinante λ PENR3, foram feitas clivagens simples e duplas com enzimas de restrição. A análise de restrição e hibridização dos fragmentos de DNA do fago recombinante λ PENR3, revelou que o gene *nia* estava presente em um fragmento de 6,5 Kb (*Kpn* I). O fragmento foi subclonado no plasmídeo pBluescript SK+, e o plasmídeo recombinante foi denominado pPENR. Foi feita a construção do mapa físico de restrição de pPENR e este foi utilizado na transformação dos

mutantes Nia^- de *P. expansum* e *P. griseoroseum*, sendo obtida uma frequência de 16 transformantes por μg de DNA.

A clonagem do gene *nia* de *P. expansum* permitiu o estabelecimento de um sistema homólogo de transformação para o mesmo fungo. O gene clonado já pode ser usado como marcador de seleção em experimentos de transformação, visando o aumento do número de cópias dos genes que codificam pectinases ou a introdução de genes modificados. Além disso, poderá ser feito o seqüenciamento, a análise da organização e o estudo da regulação do gene *nia*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAAR, Y.G., MOORE, M.M., Mapping of the nitrate-assimilation gene cluster (*crnA-niiA-niaD*) and characterization of the nitrite reductase gene (*niiA*) in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Current Genetics**, v. 33, p. 206-215, 1998.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. **Currents Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons, New York, p. 4-10, 1987.
- AVILA, J., PÉREZ, M.D., BRITO, N., GONZÁLEZ, C., SILVERIO, J.M. Cloning and disruption of the *YNRI* gene encoding the nitrate reductase apoenzyme of the yeast *Hansenula polymorpha*. **FEBS Letters**, v. 366, p. 137-142, 1995.
- BALLANCE D.J., TURNER., G. Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 36, p. 321-331, 1985.
- BANKS, G.R., SHELTON, P.A., KANUGA, N., HOLDEN, D.W.; SPANOS, S. The *Ustilago maydis nar 1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. **Gene**, v. 131, p. 69-78, 1993.
- BENTON, W.D., DAVIS, R.W. Screening of Xgt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. **Science**. v. 196, p. 180-183, 1977.
- CABOCHE, M., ROUZÉ, P. Nitrate reductase: a target for molecular and cellular studies in higher plants. **Trends Genetics**, v. 6, p. 187-192, 1990

- CAMPBELL, W.H. Higher plant nitrate reductase: arriving at a molecular view. **Curr. Top. Plant. Biochem. Physiol.**, v. 7, p. 1-15, 1988.
- CAMPBELL, W.H., KINGHORN, J.R. Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. **Trends Biochem Sci**, v. 15, p. 315-319, 1990.
- CARDOSO, P.G., Isolamento e caracterização parcial de gene que codifica pectina liase em *Penicillium expansum*, Viçosa, MG: UFV, 2000. 63 p. (Tese de Mestrado).
- CHANG, P-K., EHRLICH, K.C., LINZ, J.E., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T.E., BENNETT, J.W. Characterization of the *Aspergillus parasiticus* *niaD* and *niaA* gene cluster. **Current Genetics**, v. 30, p. 68-75, 1996.
- CHESSON, A. Maceration in relation to the post-harvest handling and processing of plant material. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 48, p. 1-45, 1980.
- COVE, D.J., PATEMAN, J.A. Independently segregating loci concerned with nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. **Nature**, v. 168, p. 262-263, 1963.
- COVE, D.J. Genetical studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. **Biol. Rev.**, v. 54, p. 291-303, 1979
- CRAWFORD, N.M.; ARS, JR., H.N. The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. **Annu: Rev. Genet.**, v. 27, p. 115-146, 1993.
- CRAWFORD, N., CAMPBELL, W.; DAVIS, R.W. Nitrate reductase from squash; cDNA cloning and nitrate regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 83, p. 8073-8076, 1986.
- CUTLER, S.B., COOLEY, R.N., CATEN, C.E Cloning of the nitrate reductase gene of *Stagnospora (Septoria) nodorum* and its use as a selectable marker for targeted transformation. **Current Genetics**, v. 34, p. 128-137, 1998.
- DANIEL-VEDELE, F., DORBE, M.F., CABOCHE, M., ROUZÉ, P. Cloning and analysis of the tomato nitrate reductase-encoding gene: protein domain structure and amino acid homologies in higher plants. **Gene**, v. 85, p. 371-380, 1989.
- DIAS, E.S. Clonagem e caracterização parcial de um gene que codifica a enzima poligalacturonase em *Penicillium expansum*, Viçosa, MG: UFV, 1997. 72 p. (Tese de doutorado).

- DIOLEZ, A.; LANGIN, T.; GERLINGER, C.; BRYGOO, Y.; DABOUSSI, M.J. The *nia* gene of *Fusarium oxysporum*: isolation, sequence and development of a homologous transformation system. **Gene**, v. 131, p. 61–67, 1993.
- FU, Y.-H., MARZLUF, G.A. Molecular cloning and analyses of the regulation of *nit-3*, the structural gene for nitrate reductase in *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** V. 84, p. 8243-8247, 1987.
- GOUKA, R.J.; HARTINGSVELDT, W.V.; BOVENBERG, R.A.L. HONDEL, C.A.M.J.J. and GORCOM, R.F.M. Cloning of nitrate-nitrite reductase gene cluster of *Penicillium chrysogenum* and use of the *niaD* gene as a homologous selection marker. **Journal of Biotechnology**, v. 20, p. 189-200, 1991.
- GRAESSLE, S., HAAS, H., FRIEDLIN, E., KÜRNSTEINER, H., STÖFFLER, G., REDL, B. Regulated system for heterologous gene expression in *Penicillium chrysogenum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 753-756, 1997.
- GRIFFIN, D.H. Fungal Physiology. John Wiley & Sons, New York, second edition, 458 p., 1994.
- GRUBER, H., GOETINCK, S.D., KIRK, D.L.; SCHIMITT, R. The nitrate reductase-encoding gene of *Volvox carteri*: map location, sequence and induction kinetics. **Gene**, v. 120, p. 75-83, 1992.
- GURR, S.J., UNKLES, S.E., KINGHORN, J.R. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In: KINGHORN, J.R. (Ed.) **Gene Structure in Eukaryotic Microbes**. Oxford: IRL Press, p. 93-139, 1987.
- HAAS, H., MARZLUF, G.A. NRE, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum*, binds specifically to elements in the intergenic promoter regions of nitrate assimilation and penicillin biosynthetic gene clusters. **Current Genetics**, v. 28, p. 177-183, 1995.
- HAAS, H., MARX, F., GRAESSLE, S., STÖFFLER, G. Sequence analysis and expression of the *Penicillium chrysogenum* nitrate reductase encoding gene (*niaD*). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1309, p. 81–84, 1996.
- INOUE, H., NOJIMA, J., OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, p. 23-28, 1990.
- JOHNSTONE, I.L., McCABE, GREAVES, P.C., COLE, G.E., BROW, M.A.D., UNKLES, S.E., CLUTTERBUCK, A.J., KINGHORN, J.R.; INNIS, M.A. Isolation and characterization of the *crnA-niiA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 90, p. 181-192, 1990.

- KHANH, N.Q., RUTTKOWSKI, E., LEIDINGER, K., ALBRECHT, H., GOTTSCHALK, M. Characterization and expression of a genomic pectin methyl esterase-encoding gene in *Aspergillus niger*. **Gene**, v. 106, p. 71-77, 1991.
- KITAMOTO, N., KIMURA, T., KITO, Y., OHMIYA, K. e TSUKAGOSHI, N. The nitrate reductase gene from a Shoyu Koji Mold, *Aspergillus oryzae* KBN616. **Bioscience, Biothecnology, and Biochemistry**, v. 59, p. 1795-1799, 1995.
- LANA, T.G. Seleção e caracterização de mutantes auxotróficos de *Penicillium expansum* para produção de pectinases, Viçosa, MG: UFV, 1997. 32 p. (Monografia).
- LANGIN, T., DABOUSSI, M.J., GERLINGER, C. BRYGOO, Y. Influence of biological parameters and gene-transfer technique on transformation of *Fusarium oxysporum*. **Current Genetics**, v. 17, p. 313-319, 1990.
- MAUER, P., RÉJASSE, A., CAPY, P., LANGIN, T., RIBA, G. Isolation of the transposable element *hupfer* from entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by insertion mutagenesis of the nitrate reductase structural gene. **Molecular General Genetics**, v. 227, p. 213-223, 1991.
- MORRISON, D.A. Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. **Journal of Bacteriology**, v. 132, p. 349-351, 1977.
- NEWTON, A.C., CATEN, C.E. Auxotrophic mutants of *Septoria nodorum* isolated by direct screening and by selection for resistance to chlorate. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 90, p. 199-207, 1988.
- OKAMOTO, P.M., FU, Y.H., MARZLUF, G.A. *Nit-3*, the structural gene of nitrate reductase in *Neurospora crassa*: nucleotide sequence and regulation of mRNA synthesis and turnover. **Molecular General Genetics**, v. 227, p. 213-223, 1991.
- PEREIRA, J.F. Isolamento e caracterização do gene da nitrato redutase de *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, MG: UFV, 1999. 37 p. (Monografia).
- PONTECORVO, G., ROPER, J. A., HEMMONS, L. M., MACDONALD, K. D. e BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-238, 1953.
- QUESADA, A., GALVAN, A., FERNANDEZ, E. Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Journal**, v. 5, p. 407-419, 1994.

- REXOVÁ-BENKOVÁ, L., MARKOVIC, O. Pectic enzymes. In: TIPSON, R.S., HORTON, D. (Eds.). **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. New York: Academic, 1976. v. 33, p. 323-385.
- RIBEIRO, J.B., QUEIROZ, M.V., ARAÚJO, E.F. Transformação de *Penicillium expansum* com os genes que codificam a nitrato redutase de *Fusarium oxysporum* e poligalacturonase de *Penicillium griseoroseum*. VIII Simpósio de Iniciação Científica da UFV. 01 a 04 de dezembro de 1998.
- ROMBOUTS, F.M., PILNIK, W. Pectinases and other cell-wall degrading enzymes of industrial importance. **Symbiosis**, v. 2, p. 79-90, 1986.
- SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERE, J., VANDAME, E.J. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. - Molecular cloning. A laboratory manual. 2 ed. **Cold spring harbor**, New York. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. S. np.
- SILVA, D.O., ATTWOOD, M.M., TEMPEST, D.W. Partial purification and properties of pectin lyase from *Penicillium expansum*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 574-578, 1993.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, p. 503-517, 1975.
- TOMSETT, A.B., COVE, D.J. Deletion mapping of the *niiA-niaD* gene region of *Aspergillus nidulans*. **Genet. Res.**, v. 34, p. 19-32, 1979.
- TOMSETT, A.B., GARRET, R.H. The isolation and characterization of mutants defective in nitrate assimilation in *Neurospora crassa*. **Genetics**, v. 95, p. 649-660, 1980.
- TUDZYNSKI, B., MENDE, K., WELTRING, K.-M., KINGHORN, J.R., UNKLES, S.E. The *Gibberella fujikuroi niaD* gene encoding nitrate reductase: isolation, sequence, homologous transformations and electrophoretic karyotype location. **Microbiology**, v. 142, p. 533-539, 1996.
- UNKLES, S.E. Fungal biotechnology and the nitrate assimilation pathway. In: WRAY, J.L., KINGHORN, J.R. (Eds.) Molecular and genetics aspects of nitrate assimilation. Oxford University Press, Oxford. p. 341-363, 1989 (a).

- UNKLES, S.E., CAMPBELL, E.I., CARREZ, D., GRIEVE, C., CONTRERAS, R., FIERS, W., VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J., KINGHORN, J.R. Transformation of *Aspergillus niger* with the homologous nitrate reductase gene. **Gene**, v. 78, p. 157-166, 1989 (b).
- UNKLES, S.E., CAMPBELL, E.I., PUNT, P.J., HAWKER, K.L., CONTERAS, R., HAWKINS, A.R., VAN DER HONDEL, C.A.M.J.J.; KINGHORN, J.R. The *Aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase: upstream nucleotide and amino acid sequence comparisons. **Gene**, v. 111, p. 149-155, 1992.
- WHITEHEAD, M.P.; UNKLES, S.E.; RAMSDEN, M.; CAMPBELL, E.I.; GURR, S.J.; SPENCE, D.; HONDEL, C. van den; CONTRERAS, R.; KINGHORN, J.R. Transformation of a nitrate reductase deficient mutant of *Penicillium chrysogenum* with the corresponding *Aspergillus niger* and *A.nidulans niaD* genes. **Molecular General Genetics**, v. 216, p. 408-411, 1989.
- WHITEHEAD, M.P., GURR, S.J., GRIEVE, C., UNKLES, S.E., SPENCE, D., RAMSDEN, M., KINGHORN, R. Homologous transformation of *Cephalosporium acremonium* with the nitrate reductase-encoding gene (*niaD*). **Gene**, v. 90, p. 193-198, 1990
- WILLIAMS, R.S.B., DAVIS, M.A., HOWLETT, B.J. Nitrate reductase of the ascomycetous fungus, *Leptosphaeria maculans*: gene sequence and chromosomal location. **Molecular General Genetics**, v. 244, p. 1-8, 1994.
- WRAY, J.L., KINGHORN, J.R.. Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation. Oxford University Press, Oxford, 1989.