

VIVIANE ALINE OLIVEIRA SILVA

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E REGULAÇÃO DO GENE
QUE CODIFICA NITRATO REDUTASE EM *Crinipellis perniciosa*.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

RESUMO

SILVA, Viviane Aline Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2005.
Isolamento, caracterização e regulação do gene que codifica nitrato redutase em *Crinipellis pernicioso*. Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz.
Conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e Maurício Dutra Costa.

Neste trabalho foram realizadas a clonagem e a caracterização parcial de um fragmento de 7,1Kb contendo o gene que codifica a nitrato redutase no fungo basidiomiceto *Crinipellis pernicioso*. A análise da seqüência parcial desse fragmento revelou a organização em *cluster* do gene *nia* com o gene que codifica a nitrito redutase e permitiu uma comparação filogenética com seqüências homólogas em outros fungos filamentosos. Foi realizada, também, a análise parcial comparativa das seqüências putativas das proteínas homólogas ao regulador geral positivo AREA, ao regulador específico NIRA e ao transportador de nitrato CRNA, depositadas no banco de dados do projeto genoma de *C. pernicioso*. O alinhamento das seqüências revelou maior proximidade genética de *C. pernicioso* ao fungo basidiomiceto *Hebeloma cylindrosporum*. A caracterização do gene *nia* em dez isolados de *C. pernicioso* de distintos biótipos e regiões geográficas por PCR-RFLP e hibridização revelou polimorfismo para os isolados do biótipo-S e biótipo-L. Não foi possível agrupar os isolados por hospedeiro ou região geográfica a partir da comparação das seqüências do gene que codifica a nitrato redutase, porém, os dados evidenciaram variabilidade genômica intraespecífica nessa espécie. A transformação da linhagem mutante *niaD-* de *Penicillium griseoroseum*, PG63, com o plasmídeo contendo o

fragmento de 7,1 Kb resultou no isolamento de poucos transformantes. A complementação da mutação em *P. griseoroseum*, com o gene heterólogo do basidiomiceto *C. perniciosus* demonstrou que o gene *niaCP* é expresso e funcional, sugerindo estar sujeito a um controle de regulação similar ao do gene *niaD* desse organismo. A análise da regulação do gene *nia* de *C. perniciosus* por RT-PCR foi feita a partir de RNA total extraído de micélio cultivado em diferentes fontes de nitrogênio. O transcrito detectado na presença de nitrato como indutor e ausência de fontes de nitrogênio prontamente metabolizáveis sugere uma via de regulação específica e geral. A transcrição do gene *niaCP* foi ativada também no micélio cultivado no meio acrescido do fruto de cacau liofilizado e moído. Estes resultados sugerem uma provável importância da enzima nitrato redutase para *C. perniciosus* durante o seu desenvolvimento no hospedeiro.

ABSTRACT

SILVA, Viviane Aline Oliveira, M. S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2005.
Isolation, characterization and regulation of the gene encoding nitrate reductase in *Crinipellis pernicioso*. Advisor: Marisa Vieira de Queiroz.
Committee Members: Elza Fernandes de Araújo and Maurício Dutra Costa.

In this study cloning and partial characterization of a 7.1Kb fragment containing the gene that encodes nitrate reductase in the basidiomycete fungus *Crinipellis pernicioso* were performed. The analysis of the partial sequence of this fragment revealed a cluster organization of *nia* gene with the gene encoding nitrite reductase and allowed a phylogenetic comparison among homologous sequences of other filamentous fungi. A partial comparative analysis was done for putative sequences of proteins homologous to the positive general regulator AREA, the specific regulator NIRA and the nitrate transporter CRNA deposited in the data bank of the genome project of *C. pernicioso*. Sequences alignment revealed a closer genetic proximity of *C. pernicioso* to *Hebeloma cylindrosporum*. The characterization of *nia* gene in ten isolates of *C. pernicioso* from different biotypes and geographic regions of *C. pernicioso* by PCR-RFLP and hybridization revealed a polymorphism for isolates of the biotype S and biotype L. It was not possible to group the isolates by host or geographic region through nitrate reductase gene sequences, but these data evidenced an intraspecific genomic variability in this species. The transformation of *niaD*- mutant of *Penicillium griseoroseum*, PG63, with the plasmid containing the

7.1Kb fragment resulted in the isolation of few transformants. The complementation of the mutation in *P. griseoroseum* with the heterologous gene of the basidiomycete *C. pernicioso* showed that *niaCP* gene is expressed and functional, which suggests that it is under a regulation control similar to the one of *niaD* gene of this organism. The analysis of the regulation of *nia* gene in *C. pernicioso* by RT-PCR was performed from total RNA extracted from cultivated mycelium in different nitrogen sources. The transcript detected in the presence of nitrate as inductor and in the absence of nitrogen sources readily metabolized suggests a specific and general regulation pathway. The transcription of *niaCP* gene was also activated in the mycelium cultivated in the medium added with lyophilized and triturated cacao fruit. These results suggest a probable importance of the nitrate reductase enzyme for *C. pernicioso* during its development in the host.