

RONNEY ADRIANO RIBEIRO

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A
NITRATO REDUTASE EM *Colletotrichum lindemuthianum*, PATÓGENO DO
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*)

Dissertação 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
2006

RONNEY ADRIANO RIBEIRO

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A
NITRATO REDUTASE EM *Colletotrichum lindemuthianum*, PATÓGENO DO
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*)

Dissertação 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: 28 de agosto de 2006

Prof^a Elza Fernandes de Araújo
(Co-Orientadora)

Prof^a Célia Alencar de Moraes
(Co-orientadora)

Prof^a Denise Mara Soares Bazzoli

Prof^a Andéa de Oliveira Barros Ribon

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz
(Orientadora)

***Aos meus queridos pais, José e Joana,
pelo amor incondicional,
Dedico***

AGRADECIMENTOS

Para mim, talvez, esta seja a parte mais importante da tese. Não consigo imaginar a realização deste trabalho sem o alicerce que tive durante toda minha graduação e pós-graduação, onde a família, os professores e amigos foram peças fundamentais.

Por isso agradeço:

Antes de qualquer coisa, a Deus, por não somente ter me dado habilidades vitoriosas, mas também pela oportunidade de conhecer todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a crescer e pular obstáculos.

Aos meus pais que sempre estavam presentes, mesmo que não de corpo presente, nos momentos difíceis dessa história, sempre me apoiando e confortando.

À Universidade Federal de Viçosa por ter me proporcionado os melhores anos de minha vida.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À professora Marisa que mais do que orientadora, foi parte da minha família durante os cinco anos e meio de convivência.

À professora Elza pelo apoio, confiança, exemplo de trabalho e competência.

À professora Célia principalmente pelo incentivo, amizade e confiança.

Às professoras Denise (a nossa eterna Dedê) e Andréa pela participação na banca de defesa.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia, que contribuíram para minha formação profissional.

Aos meus amigos funcionários do Bioagro Evandro, Danilo, Toninho, Raimundo, Paulo e José Reinaldo pelos serviços prestados.

Aos “GRANDES” amigos do Laboratório de Genética, de hoje e para a vida toda: João Batista, Jildete, Klédna, Rodrigo Barros, Gilvan, Ximena, Marcos, Ireninha, Vivi, Mariana, Janaína, Leonardo, Daniel, Júnio, Michelle, Leandro, Swiany, Maycon, Rodrigo BQI, Rafael, Guilherme, Lara, Tati loira e Darlene, além de todos aqueles que já passaram por aqui.

Aos Amigos dos Laboratórios de Fisiologia, Micorrizas, Petróleo, Micro industrial, Micro de Alimentos, Anaeróbio e agora Ecologia Microbiana.

Ao grande amigo Gilvan, que ajudou a trilhar meu caminho com ensinamentos me apoiando a todo instante e não me deixando desistir nunca.

À minha chefinha de laboratório mais querida e amável com a qual tenho o maior carinho do mundo, Ireninha.

Ao João Batista por ter agido como “pai” nas horas de necessidade.

Ao casal do laboratório Maycon e Swiany pela verdadeira amizade e total confiança.

À Lara pela grande amizade.

Ao amigo Daniel pelas companhias nas festas, choradeiras, bebedeiras e por guardar segredos que somente ele sabe (os seus estão guardados comigo).

À todos os demais “doenças” da bioquímica: Marcão, Sávio, Guilherme e Rodrigo BQI.

Ao amigo Zé Carlos pelas palavras de incentivo nas horas de indecisão.

E por fim a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se concretizasse, amenizando as dificuldades encontradas no caminho.

BIOGRAFIA

Ronney Adriano Ribeiro, Filho de José Ribeiro neto e Joana D'arc Dias Ribeiro, nasceu no dia 13 de novembro de 1981 em Ubá, Estado de Minas Gerais.

Em fevereiro de 2000 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se como Bacharel em julho de 2004.

Iniciou os estudos em nível de Mestrado, no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola também pela Universidade Federal de Viçosa, em agosto de 2004, defendendo a dissertação em agosto de 2005.

CONTEÚDO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1- Introdução	01
2- Revisão da Literatura	03
3. Material e Métodos	11
3.1. Microrganismos.....	11
3.2- Isolamento do DNA total dos fungos.....	11
3.3- Seleção de fagos recombinantes contendo o gene <i>nit1</i> do isolado LV49 de <i>Colletotrichum. lindemuthianum</i>	12
3.4- Clonagem, sequenciamento e análise das seqüências do gene <i>nit1</i> de <i>C. lindemuthianum</i>	12
3.5. Análise filogenética da proteína NIT1 de <i>C. lindemuthianum</i>	13
3.6- Avaliação da regulação do gene <i>nit1</i> de <i>C.lindemuthianum</i>	13
3.6.1- Condições de cultivo.....	13
3.6.1. Extração de RNA total e análise por RT-PCR.....	14
4-Resultados e Discussão	16
4.1- Isolamento do gene <i>nit1</i> de <i>C. lindemuthianum</i>	16
4.2- Caracterização do gene <i>nit1</i> de <i>C. lindemuthianum</i>	19
4.3- Análise filogenética da proteína nitrato redutase em <i>C.</i> <i>lindemuthianum</i>	30

4.4- Estudo da regulação do gene <i>nit1</i> em <i>C. lindemuthianum</i>	32
5. Conclusões	36
6. Referências bibliográficas	38

RESUMO

RIBEIRO, Ronney Adriano. M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2006. **Clonagem e caracterização do gene que codifica a nitrato redutase em *Colletotrichum lindemuthianum*, patógeno do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*)**. Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Co-Orientadoras: Elza Fernandes de Araújo e Célia Alencar de Moraes.

O gene que codifica para a nitrato redutase de *Colletotrichum lindemuthianum*, *nit1*, foi isolado e caracterizado. Sua seqüência e regulação em resposta a diferentes fontes de nitrogênio foram analisadas. A análise da seqüência do gene *nit1* indicou que ele possui 2.787 pb com um único íntron de 69 pb iniciando no nucleotídeo 1.808. Este íntron está localizado numa região conservada de íntrons presentes no gene da nitrato redutase em outros fungos. No entanto, a identidade entre eles se restringe às regiões consenso responsáveis pela excisão. A região reguladora do gene *nit1*, além das seqüências consenso gerais, apresenta quatro seqüências TATC responsáveis pela ligação da proteína reguladora geral positiva NIT2. Um possível sítio da ligação da proteína reguladora da via específica, NIT4, também foi localizado nessa região, na posição -340. Além disso, na região 3' não traduzida foi encontrado um possível sítio para poliadenilação do mRNA localizado na posição 2.826. A proteína deduzida do gene *nit1* gerou uma seqüência de 905 aminoácidos com massa molecular de 101,1 kDa e apresentou alta identidade com as proteínas correspondentes em *Metarhizium anisopliae* (62,43%), *Magnaporthe grisea* (62,27%), *Verticillium fungicola* (60,15%), *Botryotinia fuckeliana* (58,30%) e *Aspergillus fumigatus* (51,93%). A expressão do gene *nit1* em *C. lindemuthianum* foi avaliada em

micélios cultivados em diferentes fontes de nitrogênio, em condições de ativação e repressão. O gene foi expresso na presença de nitrato a partir de 15 minutos após entrar em contato com esta fonte de nitrogênio, tendo atingido a expressão máxima com 360 minutos. A transcrição foi reprimida em micélios cultivados em amônio, uréia e glutamina. Em glutamina, após 60 minutos de repressão, não foi possível detectar a presença de transcritos desse gene.

ABSTRACT

RIBEIRO, Ronney Adriano, M.S., Universidade Federal de Viçosa, August, 2006.
Cloning and characterization of the gene encoding nitrate reductase in *Colletotrichum lindemuthianum*, a bean (*Phaseolus vulgaris*) pathogen.
Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-Advisers: Elza Fernandes de Araújo and Célia Alencar de Moraes.

The gene encoding nitrate reductase in *Colletotrichum lindemuthianum*, nit1, was isolated and characterized. Its nucleotide sequence and regulation in response to different nitrogen sources were analyzed. The gene nit1 has 2,787 base pairs (bp) bearing a single 696 bp intron starting at nucleotide 1,808. This intron is localized in a conserved region when compared to introns present in nitrate reductase genes of other fungi. However, its similarity with them is restricted to the consensus splicing regions. Four TATC sequences, possibly related to binding of the general positive regulatory protein NIT2, were found in the upstream regulatory region of nit1, as well as other consensus sequences such as TATA and GC boxes. A putative binding site for NIT4, a specific regulatory protein, was also found in the – 340 position. There is a putative mRNA polyadenylation site at the downstream 2,826 position. The protein translated from nit1 comprises 905 amino acid residues with a molecular mass of 101,1 kDa and presents high degree of identity with the cognate proteins in *Metarhizium anisopliae* (62,43 %), *Magnaporthe grisea* (62,27%), *Verticillium fungicola* (60,15%), *Botryotinia fuckchiana* (58,30%), and *Aspergillus fumigatus* (51,93%). In mycelia cultivated in the presence of nitrate, nit1 was expressed after 15 min. Transcription was

repressed in mycelia grown in medium containing either ammonium, urea, or glutamine. On glutamine, the level of transcription was apparently basal.

1. Introdução

Colletotrichum é um gênero de fungo pertencente ao filo Ascomycota que contém muitas espécies causadoras antracnose ou ferrugem em uma grande variedade de importantes culturas e plantas ornamentais (Bailey e Jeger, 1992). Dentre as doenças provocadas por esse gênero de fungo, a antracnose no feijoeiro, que tem como agente etiológico *Colletotrichum lindemuthianum*, constitui uma das enfermidades mais graves dessa cultura e que em determinadas condições, pode levar até 100% de perdas no campo.

Devido à sua importância, estudos genéticos sobre esse fungo são imprescindíveis para o entendimento do seu modo de vida e de sua relação com o hospedeiro. Um dos pré-requisitos para esses estudos é o desenvolvimento de sistemas de transformação eficientes e de baixo custo. O sistema de transformação baseado no gene *nit1* é simples e rápido, permite uma seleção positiva dos transformantes sem o emprego de agentes mutagênicos, reduzindo assim a possibilidade de mutações secundárias. Além disso, esse gene tem sido utilizado também como alvo para o isolamento de elementos transponíveis, cujos estudos apresentam grande importância para o entendimento da variabilidade genética não somente de fungos, mas de organismos de forma geral. O gene *nit1* também pode ser utilizado como marcador genético em cruzamentos para a designação de grupos de compatibilidade vegetativa, no estudo do ciclo parasexual e no caso de fungos que apresentem algum interesse industrial no melhoramento genético.

Portanto, devido à importância e ao grande potencial de utilização do gene *nit1* como ferramenta genética, este trabalho reporta o seu isolamento e caracterização, o que abrirá caminho para novos estudos em *C. lindemuthianum*, permitindo, assim, o desenvolvimento de estratégias eficazes no combate à antracnose.

2. Revisão da Literatura

O crescimento celular é um fenômeno que só ocorre quando há disponibilidade de nutrientes no meio que proporcionem todos os elementos que compõem a célula, como carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo, entre outros. Dentre tais elementos, o nitrogênio é um dos mais importantes, podendo ser encontrado em muitos compostos simples e em quase todos os complexos formados por macromoléculas presentes em células vivas. Especialmente proteínas e ácidos nucleicos, duas das mais importantes classes de macromoléculas, são ricas em nitrogênio, o que faz que ocorra alto investimento celular, em termos energéticos, para o funcionamento da maquinaria metabólica que compreende as vias assimilatórias e dissimilatórias do nitrogênio, mantendo, dessa forma, um fluxo constante (Marzluf, 1981).

A assimilação do nitrogênio em fungos filamentosos pode ocorrer de duas formas distintas, dependendo se fontes de nitrogênio prontamente disponíveis, como amônia e glutamina, estão ou não presentes. Isso ocorre porque, como no metabolismo de açúcares, existe um mecanismo de repressão catabólica para a utilização do nitrogênio. Quando fontes primárias deste estão presentes no meio, a assimilação é feita pela enzima NADP-GDH (glutamato desidrogenase dependente de NADP), que tem um papel na formação de glutamato por meio da aminação redutiva do α -cetoglutarato (Marzluf, 1981; Brun et al.,1992). Além da

assimilação por meio da enzima NADP-GDH, o nitrogênio amoniacal também pode ser assimilado por meio da ação conjunta das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamina oxoglutarato aminotransferase ou glutamato sintase (GOGAT) (Marzluf, 1981). Na presença de fontes secundárias de nitrogênio como nitrato, nitrito, purinas ou aminoácidos e ausência de fontes primárias, a assimilação é feita por uma série de enzimas geralmente sintetizadas “de novo”, como nitrato e nitrito redutases, várias enzimas catabólicas de purinas, L-aminoácidos oxidases, aminoácidos permeases e uma protease extracelular envolvida no uso de proteínas (Fu e Marzluf, 1987).

Em vários fungos filamentosos, como em *Aspergillus nidulans* (Cove e Paterman, 1969), *Neurospora crassa* (Fu et al., 1989), *Penicillium chrysogenum* (Haas e Marzluf, 1995), *Aspergillus oryzae* (Christensen et al., 1998) e *Aspergillus niger* (Lenavel et al., 2001), entre outros, o metabolismo do nitrogênio é um processo altamente regulado de maneiras positiva e negativa, existindo um sistema de controle global e um específico. Os genes *nit-2* de *N. crassa*, *areA* de *Aspergillus* sp. e *nre* de *P. chrysogenum* são reguladores globais positivos capazes de sofrer influência do meio externo em relação à presença de fontes preferenciais de nitrogênio. As proteínas NIT2, AREA e NRE se ligam a seqüências específicas de uma grande rede de genes estruturais. Dentre esses, vários genes relacionados com o metabolismo do nitrogênio, promovendo a desrepressão deles (Fu e Marzluf, 1987; Haas e Marzluf, 1995; Christensen et al., 1998). Apesar destes reguladores globais apresentarem identidade de aproximadamente 30% entre si, quando é considerado apenas o domínio de ligação ao DNA, essa identidade entre eles chega a 98% (Haas e Marzluf, 1995).

A regulação negativa do metabolismo do nitrogênio ocorre por intermédio da proteína NMR (para regulação metabólica do nitrogênio) que apresenta massa molecular de 54,8 Kda e não possui domínio de ligação ao DNA, mas é capaz de se ligar a uma pequena região do domínio de ligação ao DNA e à região carboxi-terminal da proteína NIT-2 e possivelmente de AREA, tendo a glutamina como o possível sinal para essa ligação, o que impede que NIT-2 realize sua função. Supõe-se que a região de ligação da proteína NMR se localize próxima a um sinal

de localização nuclear da proteína NIT-2, prevenindo a entrada desta no núcleo em condições de repressão pela fonte de nitrogênio, o que garantiria a repressão metabólica (Xiao et al., 1995). Além da regulação por intermédio da proteína NMR, pelo menos para AREA existem dois outros níveis de regulação, que são a regulação da transcrição do gene *areA* pela própria proteína AREA e a baixa estabilidade dos mRNA de *areA* em células que crescem em fontes de nitrogênio preferenciais (Platt et al., 1996).

O nitrato (NO_3^-), que é considerado excelente fonte secundária de nitrogênio, pode ser incorporado quando reduzido a amônio (NH_4^+) no interior celular. Para que essa conversão ocorra, o íon NO_3^- deve entrar na célula, por meio de uma nitrato permease, em que é convertido em nitrito (NO_2^-) pela ação redutiva da nitrato redutase e dois elétrons são consumidos. O NO_2^- , então, rapidamente sofre a ação da nitrito redutase, com o consumo de mais seis elétrons, que o convertem em NH_4^+ , que é posteriormente incorporado a moléculas orgânicas (Pereira et al., 2003).

A nitrato redutase de fungos é um grande complexo multi-redox que possui duas subunidades idênticas, cada uma composta de três grupos prostéticos em domínios separados. Na extremidade C-terminal, localiza-se o domínio FAD, no centro da proteína, o domínio heme e, na extremidade N-terminal, o domínio molibdênio. A reação catalítica envolve a transferência de um par de elétrons do NADH ou NADPH para os domínios FAD, heme, molibdênio e, então, para o nitrato (Pereira et al., 2003). Esses domínios se apresentam conservados e essenciais em diversos organismos filogeneticamente distintos.

Dependendo do organismo, a nitrato redutase pode variar de localização no interior celular. Em *N. crassa*, a nitrato redutase encontra-se localizada na membrana plasmática, na parede celular e na membrana do tonoplasto, porém na alga verde *Monoraphidium braunii* esta situa-se na região pirenoidal do cloroplasto, região geralmente associada com a síntese do amido. Em decorrência dessa variação quanto à localização intracelular, a nitrato redutase em diferentes espécies pode apresentar diferentes isoformas (Campbell et al., 1988).

Além da regulação existente em nível global para a utilização do nitrogênio, a via específica para a utilização do nitrato também sofre uma regulação positiva que depende de um indutor, que no caso é o próprio nitrato (Cove e Pateman, 1969). Essa regulação é feita em *A. nidulans* e *N. crassa*, respectivamente, pelos produtos dos genes *nirA* e *nit-4*. Em *N. crassa*, uma interação específica entre as proteínas NIT-2 e NIT-4 é requerida para o reconhecimento de cis-elementos e expressão do gene da nitrato redutase (Caddick et al., 1994; Marzluf, 1997). Dessa forma, parece existir a necessidade da interação entre o regulador geral e o específico para desencadear a expressão dos genes relacionados à utilização do nitrato (Feng e Marzluf, 1998). Até a presente data, apenas um relato foi encontrado na literatura, segundo o qual o basidiomiceto *Hebeloma cylindrosporum* possivelmente não apresente regulação específica para os genes da nitrato e nitrito redutases e da nitrato permease, pois os genes que codificam essas proteínas são transcritos em presença de diferentes fontes de nitrogênio. Entretanto, a repressão por amônio parece ser característica geral entre fungos, indicando a presença de um sistema de regulação geral (Jargeat et al., 2000).

Em relação à análise de seqüências, o gene *nit* de diversos fungos filamentosos revela variação quanto à presença ou não de íntrons e o tamanho destes, apesar de no geral eles serem pequenos, variando de 46 pb a 98 pb. Quanto à posição dos íntrons, existe uma tendência de conservação de suas posições dentro de um mesmo reino, o que não acontece entre reinos diferentes (Zhou e Kleinhofs, 1996). Suas seqüências, por não interferirem em regiões importantes do gene *nit*, apresentam baixa identidade entre si, com exceção das regiões 5' GTPu e 3' AG e das regiões internas como TAAG e CAAT, que estão envolvidas no processamento dos íntrons (Gurr et al., 1987). Alguns fungos não apresentam íntrons no gene *nit*, como é o caso de *Ustilago maydis* (Banks et al., 1993) e *Botryotinia fuckeliana* (Levis et al., 1997), já para *Hebeloma cylindrosporum* (Jargeat et al., 2000) foi relatada a presença de 12 íntrons, que é o máximo de íntrons presentes nesse gene em fungos. Em fungos *A. nidulans*, *A. niger*, *A. orizae*, *Aspergillus parasiticus*, *P. chrysogenum* e *Penicillium griseoroseum* ocorre a presença de seis íntrons que, embora possuam tamanhos

diferentes, estão localizados nas mesmas posições (Johnstone et al., 1990; Unkles et al., 1992; Kitamoto et al., 1995; Chang et al., 1996; Haas et al., 1996; Amaar e Moore, 1998; Pereira et al., 2004). Em *Leptosphaeria maculans* e *Stagonospora nodorum*, esse gene é interrompido por quatro íntrons que correspondem aos íntrons II, III, IV e VI de *Aspergillus* e *Penicillium* (Williams et al., 1994; Cutler et al., 1998), enquanto em *Beauveria bassiana*, *F. oxysporum*, *Gibberella fujikuroi*, *Metarhizium anisopliae* e *N. crassa* apenas um íntron está presente na mesma posição do íntron VI de *Aspergillus* e *Penicillium* (Pereira et al., 2003). Nesses fungos, a organização dos genes que codificam nitrato e nitrito redutases e nitrato permease pode variar dentro dos genomas. Por isso, as diferentes organizações foram separadas em quatro grupos denominados A a D. Dentro do grupo A estão aqueles fungos como *A. nidulans*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus* e *P. chrysogenum*, que apresentam os três genes ligados, sendo os genes da nitrato e nitrito redutase transcritos em direções opostas e o gene da nitrato permease transcrito na mesma direção do gene da nitrito redutase. O tamanho da região intergênica é de 1.262 pb em *A. nidulans*, 1.668 em *A. niger*, 1670 em *A. parasiticus*, 1.229 em *A. fumigatus* e 661 em *P. chrysogenum* (Johnstone et al., 1990; Unkles et al., 1992; Haas e Marzluf, 1995, Chang et al., 1996; Amaar e Moore, 1998). No grupo B, os três genes também estão ligados, mas o gene da nitrato permease está entre os da nitrato e nitrito redutase, sendo transcritos na mesma direção que os genes do grupo A. Essa organização é encontrada em *H. cylindrosporium* (Jargeat et al., 2003). No grupo C, os genes da nitrato e nitrito redutase estão ligados, são transcritos na mesma direção, mas o gene da nitrato permease se encontra em outra região do genoma, como é observado nos fungos *Leptosphaeria maculans* e *Stagonospora nodorum*, sendo os tamanhos das regiões intergênicas de 1.438 pb em *L. maculans* e 829 pb em *S. nodorum* (Williams et al., 1994; Cutler e Caten, 1999). No Grupo D, os genes não estão ligados, como ocorre em *N. crassa* e *Gibberella fujikuroi* (Exley et al., 1993; Tudzynski et al., 1996).

O gene da nitrato redutase, apesar de exibir regiões comprovadamente funcionais e por isso conservadas, apresenta algumas entre os domínios em que

mudanças não causam alterações em sua função. Essa característica é interessante para o estudo de filogenia e para análise de agrupamento entre indivíduos de mesmo gênero. Zhou e Kleinhofs (1996) identificaram uma região N-terminal e duas regiões curtas, uma localizada entre os domínios molibdênio e heme e a outra entre os domínios heme e FAD, que apresentaram menor identidade entre 17 proteínas nitrato redutases de plantas, algas e fungos.

Estudar a regulação e a organização do gene *nit* tem uma importância especial, pois diversas técnicas de transformação baseadas na complementação de mutantes *nif* foram descritas. Tais protocolos são fundamentais para a introdução de genes de interesse em determinado organismo, adição ou supressão de rotas metabólicas, estudo da função gênica, obtenção de linhagens superprodutoras de enzimas e isolamento de genes de patogenicidade, entre outras (Fincham, 1989). Utilizar um sistema de transformação baseado no gene *nit* apresenta vantagens, como a fácil obtenção de mutantes espontâneos *nif* por seleção positiva via resistência ao clorato, o que extingue a possibilidade de mutações secundárias em genes importantes devido ao tratamento com agentes mutagênicos; além da obtenção de mutantes com fenótipo único, não utilizar nitrato como única fonte de nitrogênio, sendo esse fenótipo dispensável, não alterando o crescimento ou fluxos metabólicos relevantes (Pereira, 2003).

Além disso, já foi demonstrado que o gene *nit* pode ser de grande importância para a patogênese, já que doenças causadas por *Pythium*, *Phymatotrichum*, *Pseudomonas* e *Colletotrichum* são favorecidas pela presença de nitrato (Huber e Watson, 1974). Outra informação interessante é a de que os patógenos necrotróficos são capazes de utilizar maior espectro de fontes de nitrogênio do que patógenos biotróficos, os quais obtêm nutrientes de tecidos vivos e somente têm acesso a fontes de nitrogênio disponíveis no apoplasto e, ou na matriz do haustório (Snoeiijers et al., 2000).

Colletotrichum é um gênero de fungos da classe Ascomycetos contendo muitas espécies que causam antracnose ou ferrugem em grande variedade de importantes culturas e plantas ornamentais (Bailey e Jeger, 1992). Esse fungo

apresenta ciclo de vida com duas fases, uma biotrófica e outra necrotrófica, sendo por isso classificado como hemibiotrófico (Perfect et al., 1999).

O início da colonização por esse fungo se dá com a germinação do conídio que lança um tubo germinativo cerca de 18 h após a sua deposição sobre a folha do hospedeiro. Um apressório, de cor escura por causa de sua melanização, é formado na ponta do tubo (Bailey et al., 1992). A partir dessa estrutura, diferencia-se o peg de penetração que atravessa a parede celular da primeira célula vegetal. Enzimas hidrolíticas devem estar envolvidas nesse processo, uma vez que ocorrem modificações químicas nas regiões da parede celular próximas ao peg. O fungo deve ter forte controle na secreção de tais enzimas, pois a atuação destas é localizada (O'Connell et al, 1985). Uma estrutura globosa, chamada de vesícula de infecção, é diferenciada entre a parede celular e a membrana plasmática da célula epidermal. A formação dessa vesícula não ocasiona a morte da célula infectada. Sua função exata ainda não foi elucidada, mas pode estar envolvida com a manutenção da célula vegetal infectada e, ou, suprimindo as respostas de defesa do hospedeiro compatível (O'Connell et al., 1985).

A partir da vesícula de infecção, diferencia-se uma hifa que tem seu crescimento entre a parede celular vegetal e a membrana plasmática das células epidermais e corticais, que permanecem vivas apesar de sofrerem modificações estruturais no citoplasma. Cerca de 48 h após a infecção observam-se rupturas no tonoplasto e plasmalema, culminando com a completa desorganização do citoplasma dentro de 60 h, restando apenas debris de membranas (O'Connell et al., 1985).

Esse padrão de colonização das células do hospedeiro, no qual a célula vegetal é mantida inicialmente viva (fase biotrófica) seguida de degeneração celular, repete-se à medida que as hifas primárias vão crescendo e invadindo as demais células vegetais (O'Connell et al., 1985).

A antracnose, causada pelo fungo *C. lindemuthianum*, tem-se constituído na doença mais importante do feijoeiro, pela sua ocorrência nas três épocas de cultivo (1º, 2º e 3º safras), causando redução na produção e qualidade do feijão (Pompeu, 1982.). Trabalhos têm demonstrado que as perdas devidas a esse

agente chegaram, em determinadas condições, até 100% (Chaves, 1980). Pelo fato de os brasileiros serem os maiores consumidores mundiais de feijão, o Brasil se destaca na sua produção, que em 2005 totalizou 3.021.495 t, um incremento de 1,8% em relação ao ano anterior. Isso foi consequência do aumento no rendimento médio, de 745 kg/ha em 2004 para 806 kg/ha em 2005, uma vez que a área colhida, de 3.748.407 ha, foi inferior à do ano anterior (3.978.660 ha). Em 2005, Minas Gerais (559.570 t) suplantou o Paraná (557.019 t), até então o maior produtor nacional de feijão. Este produto é cultivado em todos os estados, sendo que cinco deles (MG, PR, BA, GO e SP) foram responsáveis por cerca de 69% da safra total (dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE).

Com isso, e em razão da importância desse patógeno para o Brasil, e especialmente para Minas Gerais, é que se faz necessário seu estudo genético, seja por meio de genes importantes para o metabolismo, seja por meio do desenvolvimento de ferramentas que propiciem sua manipulação genética ou, ainda, pela determinação de fatores de patogenicidade.

3. Material e Métodos

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa Minas Gerais.

3.1. Microrganismos

Foram utilizados neste trabalho os isolados LV49 (raça 81) e LF (raça 89) do fungo *C. lindemuthianum*. O isolado LV49 pertence à Micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças do Departamento de Biologia da Universidade Federal Lavras e o isolado LF, à coleção do Laboratório de Genética Molecular de Plantas do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

3.2. Isolamento do DNA total dos fungos

A extração de DNA total dos isolados de *Colletotrichum* foi feita seguindo-se o protocolo estabelecido para fungos do gênero *Aspergillus* (Prebble e Anderson, 1998).

3.3. Seleção de fagos recombinantes contendo o gene *nit1* do isolado LV49 de *C. lindemuthianum*

Esta seleção foi feita a partir de um banco genômico construído por Marcos Antônio Soares a partir do isolado LV49 construído no vetor Lambda EMBL3 e que pertencente ao Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa. Como sonda foi utilizado o plasmídeo pNIT2.1, gentilmente cedido pelo pesquisador Thierry Langin do “Institut de Biotechnologie des Plantes, Université Paris, France”, e que contém um inserto genômico com parte do gene *nit1* de *C. lindemuthianum*. Para essa seleção foi utilizada a metodologia descrita por Benton e Davis (1977). As hibridizações foram feitas a 65 °C, utilizando-se o “Gene Images™ Random primer Labeling Module” e CDP-Star Detection Module” (Amersham), de acordo com instruções do fabricante. As placas de lise contendo os fagos positivos foram coletadas individualmente e eluídas. Para confirmação dos sinais positivos, diluições de cada eluição foram feitas, e mais duas etapas de hibridização nas mesmas condições foram realizadas. O DNA dos fagos positivos foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Felipe et al. (1992). A clivagem do DNA do fago foi feita com diferentes enzimas de restrição, conforme as instruções dos fabricantes.

3.4. Clonagem, seqüenciamento e análise das seqüências do gene *nit1* de *C. lindemuthianum*

Fragmentos originados das clivagens do DNA do fago foram clonados no vetor pZero (Invitrogen®). O seqüenciamento do DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia por didesoxirribonucleotídeos (Sanger et al., 1977) utilizando o seqüenciador MegaBace 500 (Amersham Pharmacia Biotech). As seqüências de DNA resultantes foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank, usando-se o programa Blast (Basic Local Alignment Search Tool), na página do National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

3.5. Análise filogenética da proteína NIT1 de *C. lindemuthianum*

A seqüência de aminoácidos da proteína nitrato redutase de diversos fungos e plantas foi obtida a partir do GenBank. Os números de acesso são: *Phytophthora infestans* (AAA86681), *Hebeloma cylindrosporum* (CAB60010.1), *Ustilago maydis* (71019527), *Tuber borchii* (AAN64993.1), *Botryotinia fuckeliana* (AAC02633.1), *Magnaporthe grisea* (XP_369402.1), *Metarhizium anisopliae* (CAA04554.1), *Verticillium fungicola* (AAO63560.1), *Aspergillus fumigatus* (AAL85636.1), *Aspergillus oryzae* (BAA08551.1), *Penicillium griseoroseum* (AAP12556.1), *Arabidopsis thaliana* (NP_177899.1) e *Nicotiana tabacum* (CAA32217.1). O alinhamento, feito por meio do programa CLUSTAL W, foi utilizado para análises filogenéticas pelo método de *neighbor-joining* no programa PAUP* versão 4.0, com valores de *bootstrap* utilizando 5.000 replicatas.

3.6. Avaliação da regulação do gene *nit1* de *C. lindemuthianum*

3.6.1. Condições de cultivo

A metodologia empregada para estudar a regulação deste gene foi baseada nos trabalhos realizados por Haas et al. (1996) e Pereira et al. (2004). Nos experimentos de ativação do gene *nit1*, esporos do fungo foram cultivados em caldo BD (batata-dextrose), e, após o crescimento do micélio, este foi transferido para o meio mínimo (Pontecorvo et al., 1953) sem nitrato contendo glutamina (25 mM) como única fonte de nitrogênio, sob agitação de 150 RPM, a 24 °C, por 36 h. Esse micélio foi novamente transferido para Erlenmeyers contendo meio mínimo com nitrato (25 mM) como única fonte de nitrogênio e coletado nos tempos 0, 5, 15, 60 e 360 minutos.

Nos experimentos de repressão do gene *nit1*, uma ordem inversa foi seguida. Micélios do fungo cultivados em caldo BD foram transferidos para o meio

mínimo contendo nitrato (25 mM) como única fonte de nitrogênio sob agitação de 150 RPM a 24 °C, por 36 h. Em cada Erlenmeyer onde os micélios estavam acondicionados foi adicionada uma solução de glutamina a uma concentração final de 25 mM, para que as coletas fossem realizadas nos tempos de 0, 5, 15, 60 e 360 minutos. Além dessas condições, o fungo cultivado em caldo BD também foi transferido para o meio mínimo contendo amônio ou uréia como únicas fontes de nitrogênio para verificar a repressão do gene *nit1* nessas condições.

3.6.2. Extração de RNA total e análise por RT-PCR

A metodologia de extração de RNA total foi baseada na extração por fenol utilizada para batata com modificações, em que 1,6 g de micélio triturado com nitrogênio líquido foi utilizado. Nesse micélio foram adicionados 4 mL de tampão de extração e 4 mL de fenol pH 4,3 (Sigma, Cat. # P 4682), aquecido a 60 °C. Essa mistura foi agitada e deixada no banho a 60 °C, por 20 minutos, até a etapa de centrifugação, quando a mistura foi centrifugada por 10 minutos, a 9.000 RPM. Ao sobrenadante recolhido, adicionaram-se 4 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, Sigma, Cat # C 0549), cuja mistura foi fortemente agitada e centrifugada novamente nas mesmas condições descritas anteriormente, para transferência do sobrenadante. Este foi tratado com mais 4 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, Sigma, Cat # P 2069), foi fortemente agitado por 30 segundos e centrifugado. O material recolhido dessa fase foi tratado com mais 4 mL de clorofórmio:álcool isoamílico e novamente centrifugado. Após essa etapa, o RNA foi precipitado a partir do sobrenadante com 1 volume de LiCl 4 M durante aproximadamente 8 h a 4 °C. O protocolo original dessa técnica pode ser encontrado no site: <www.tigr.org/tdb/potato/microarray_SOPs.shtml>. Nas reações de transcrição reversa, 10 µg do RNA total foram tratados com DNase RQI RNase-free (Promega) e quantificados a 260 nm. Para gerar a primeira fita de cDNA, utilizaram-se misturas de reação contendo 5 µg de RNA, tampão RT 1x (Promega), 0,5 mM de cada desoxinucleosídeo trifosfatado, 500 ng de oligo (dT) oligonucleotídeo (Promega), 20 U de inibidor de ribonuclease RNasin® (Promega)

e 10 U de “AMV reverse transcriptase” (Promega). O volume da reação foi ajustado para 20 μ L e incubado a 25 °C por 5 minutos e, então, a 42 °C por 60 minutos. Reações de PCR foram feitas para detectar os ciclos correspondentes à fase logarítmica de amplificação e determinar quantos ciclos seriam utilizados nos experimentos subsequentes. Os oligonucleotídeos EF1 e EF2 (que amplificam uma região de um fator de alongamento ribossomal de *Colletotrichum*) foram utilizados como controle interno neste experimento, enquanto os oligonucleotídeos CLPCR1 e Niacol2 (Tabela1) foram utilizados para avaliar a expressão do gene. O programa empregado foi 23 ciclos de: 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 57 °C e 1 minuto a 72 °C, com extensão final de 7 minutos a 57 °C.

4. Resultados e Discussão

4.1. Isolamento do gene *nit1* de *C. lindemuthianum*

O gene que *nit1* *C. lindemuthianum* foi isolado a partir do banco genômico construído no vetor λ EMBL3, utilizando-se como sonda o pNIT2.1, que contém um inserto genômico de 3,1 Kb, com parte do gene da nitrato redutase de *C. lindemuthianum*.

Um fago recombinante contendo o gene *nit1* foi isolado e denominado λ NIT 2.1.1. O DNA desse fago foi extraído e clivado com cinco diferentes enzimas de restrição, *Apa* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Eco* RV e *Pst* I, e hibridizado com o pNIT2.1, com o objetivo de verificar o padrão de restrição do fragmento de DNA genômico clonado no fago. A escolha das enzimas de restrição para a análise do fago recombinante foi feita de acordo com a presença de sítios para essas enzimas na região de policlonagem do vetor pZero (Invitogen), objetivando-se a posterior clonagem e o sequenciamento das bandas correspondentes ao gene *nit1*. O resultado da hibridização evidenciou que essas enzimas apresentam pelo menos um sítio de restrição dentro do gene *nit1*, uma vez que não houve o aparecimento de banda única em nenhuma das cinco reações referentes à clivagem do fago com essas enzimas (Figura 1B).

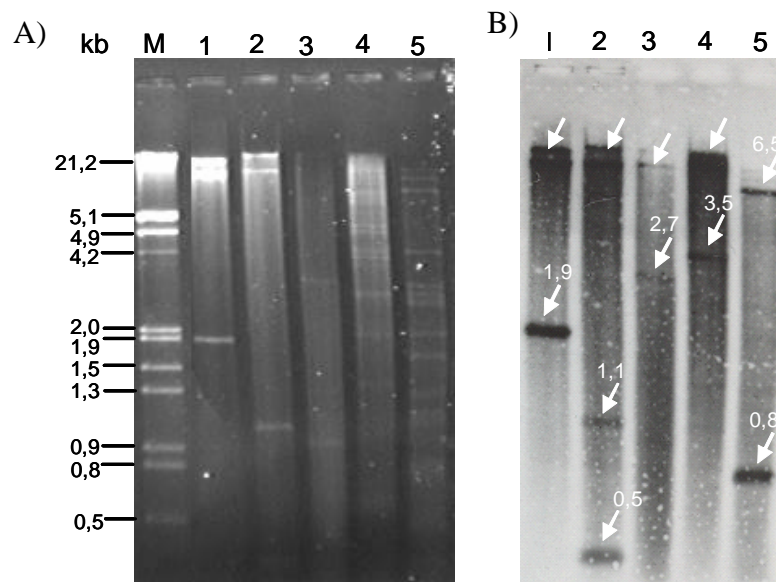


Figura 1 – Análise do padrão de restrição do fago λ NIT 2.1.1. A) DNA do fago recombinante λ NIT 2.1.1 clivado com as enzimas de restrição *Apa* I (1), *Bam* HI (2), *Eco* RI (3), *Eco* RV (4) e *Pst* I (5). B) Hibridização do DNA do fago com o pNIT2.1. As setas indicam algumas bandas que hibridizaram com pNIT2.1, e os números representam o tamanho aproximado de cada banda. M – DNA do fago λ clivado com *Eco* RI e *Hind* III.

O tamanho de alguns fragmentos de DNA foi estimado e estão representados na Figura 1B. Os fragmentos escolhidos para serem clonados no vetor pZero foram os obtidos com a enzima *Pst* I, pois estes, juntos, apresentaram um tamanho que comportava todo o gene da nitrato redutase. Além disso, bandas maiores que apareceram na hibridização, quando o DNA do fago foi clivado com as outras enzimas são mais difíceis de serem clonadas e podem carregar fragmentos contendo parte do vetor EMBL3.

Na Figura 2, mostra-se o resultado da hibridização, em que o DNA do fago λ NIT 2.1.1 e de dois plasmídeos contendo os fragmentos de 6,5 Kb e 0,8 Kb oriundos do fago λ NIT 2.1.1 foram clivados com *Pst* I e hibridizados com o pNIT2.1. Tais plasmídeos foram denominados, respectivamente, pNIT11 e pNIT20 e utilizados no seqüenciamento do gene.

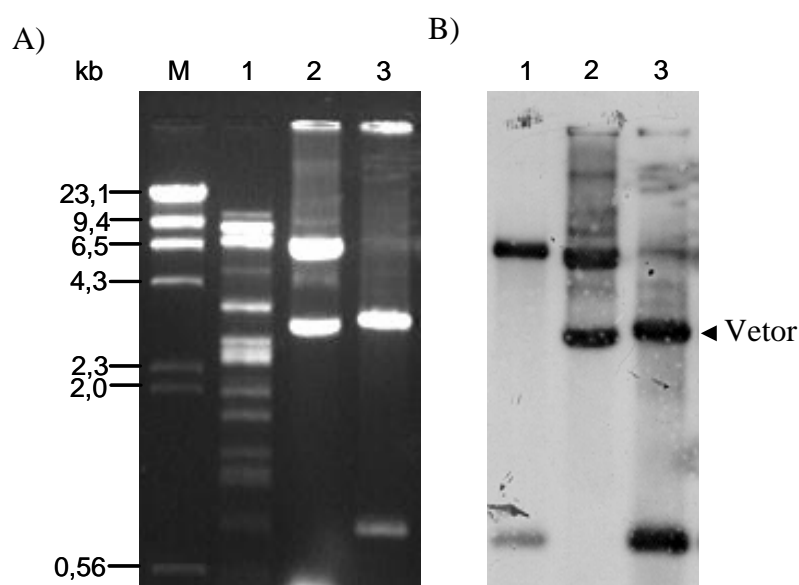


Figura 2 – Análise dos plasmídeos recombinantes. A) DNA do fago recombinante λ NIT 2.1.1 (1), do plasmídeo pNIT11 (2) e do plasmídeo pNIT20 (3) clivados com *Pst* I. B) Hibridização dos DNAs com o pNIT2.1. M – DNA do fago λ clivado com *Hind* III.

4.2. Caracterização do gene *nit1* de *C. lindemuthianum*

Os plasmídeos pNIT11 e pNIT20 contendo os fragmentos *Pst* I oriundos do fago λ NIT 2.1.1 e que hibridizam com o pNIT2.1 foram seqüenciados dentro da região que corresponde ao gene da nitrato redutase de *C. lindemuthianum*. A Figura 3 ilustra a estratégia de seqüenciamento dos fragmentos de DNA de 6,5 e 0,8 kb.

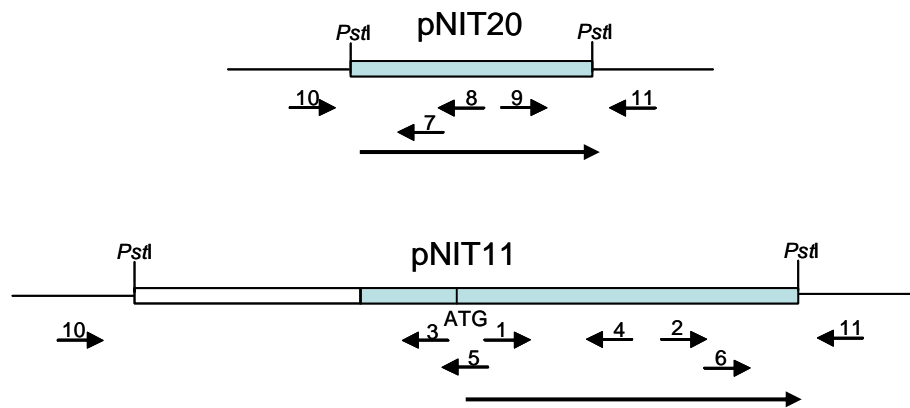


Figura 3 – Estratégia de seqüenciamento do gene *nit1* de *C. lindemuthianum* subclonado do fago λ NIT 2.1.1 nos plasmídeos pNIT20 e pNIT11. As barras hachuradas representam as regiões estrutural e promotora do gene *nit1*. As setas menores indicam os oligonucleotídeos utilizados no seqüenciamento descrito na Tabela 1, e as setas maiores apontam o sentido da transcrição do gene *nit1*.

Tabela 1 – Descrição dos oligonucleotídeos utilizados no seqüenciamento e estudo da regulação do gene *nit1*

	Primer	Seqüência
1	Niac1	GGTTATTATGGGAAACGAGC
2	Niac2	GCAATTTGGGGTTATCTGG
3	Niac3	CTATAAGACTGACCTTCCCTC
4	Niac4	CGCAGAAGCCAAGTTTCT
5	Niac3b	CCGTTAGTCGTATTAGTCTGG
6	Niacol2	GTCAGTGAAGAGGGGTTTCAGG
7	Niacol1	GGTACTCGGGCATCATCGGC
8	Clpcr1	AAGATTTTGGTGTCGGAGGA
9	Clpcr2	CGTCTTGGACAGGTCTCAAG
10	T7 For	TAATACGACTCACTATAGGG
11	M13 Rer	GGATAACAATTTACACAGG
12	EF1	GAAGACTCACATCAACGTCG
13	EF2	TTGAAGGAACCCTTGCCGAG

O seqüenciamento da região correspondente ao gene *nit1* presente nos plasmídeos pNIT11 e pNIT20 não foi suficiente para completar toda a seqüência do gene, uma vez que o pNIT20, que contém a região final do gene, estava truncado e não continha os últimos nucleotídeos. O resto da seqüência do gene e uma pequena região 3' não traduzida foram obtidos por meio do seqüenciamento direto do fragmento do DNA genômico presente no fago λ NIT 2.1.1. Com isso todo o gene da nitrato redutase de *C. lindemuthianum* foi seqüenciado (Figura 4). A região estrutural desse gene foi determinada e apresenta 2.787 pb. Além disso, foram seqüenciados 640 pb da região promotora do gene (Figura 5) e 263 pb da região 3' não traduzida contendo o sinal para poliadenilação.

O alinhamento do gene *nit1* com seqüências depositadas no “GenBank” utilizando o programa Blast evidenciou as seqüências que correspondem aos três domínios característicos de todas as nitrato redutases. Com esse alinhamento, também foi possível deduzir a presença de um possível intron que apresenta as seqüências conservadas 5' GT e 3' AG envolvidas no processo de excisão (Ballance 1986). Além disso, um consenso interno mais próximo à região 3', CTGAC, está presente nesse íntron (Unkles, 1992).

1 **ATG**TGCTTGC ACCTCCCGTC CCCTTCCCCT CGAGGGATGC CATGTGCAAG ACGGAGTTGT
61 CTTTTCTCCTC TAGCCCAGCC ACAACTGTGG GGAAGGTCA GTCTTATAGC GTCAAACGGC
121 GGATCCGATT CCTCGCTGGT CGCGGGCCTC CTTGACGAGC CGGGCGCCGA GGGACCTCGC
181 ACATATGCCC TGCCGCCAAA CTCGAAAGCC AACAGAGTTC TCCCAGAAGA CCTAAGAACA
241 CCAGACAGCC ACGTACCCCG GGATTCCAGA CTAATACGAC TAACGGGAGT TCACCCTTTC
301 AACGTCGAGG CCCCCTTGGAG CGAGCTGTAC AACGAGGGCT TCATCACCAC CAGAGACTTG
361 CACTATGTCC GAAACCACGG CGCCGTGCC AAATGCGACG ATGATGACAT GTTCGACTGG
421 CAGTTCACCG TCGAGGGCGA GGTCGAGAAC CCCATCACCA TGAACCTCAG AGACCTCATC
481 TCCGATTACG AACAGGTCAC TTACCCAGTC ACGCTTGTGT GCGCTGGCAA CCGCCGAAA
541 GAGCAGAACG TCGTCCGCAA GACCAAAGGC TTCTTCTTGG GCCCCACAG CTTTGTGCGA
601 CCGCCCCTGT GGACCGGTTG TGCCCATCGG ATCCCTCGCT TGGCCCGGCC ATGCCCAAAA
661 CGGGGAGCAC GCTACGTCTG CTTGGAAGGC GCCGACAAAC TGCCCAATGG TTATTATGGA
721 ACGAGCATCA AGCTCAACTG GTGTATGGAT CGTGACCGGG GGGTCACCGT ATGTTACCGC
781 ATGAAACGGCG AGTTGCTCCC TCCGGACCAT GGAAGCCCG TTCGCATCAT CATCCAGGA
841 CAAATCGGCG GAAGAAGTGT CAAGTGGTTA AAGAAAATCA TTGTGACAAA GGAGCCAAGC
901 TCCAACCTGGT ACCACATTTA CGACAACCGA GTCCTACCCA CCATGGTCTC TCCCAGGCC
961 AGCGCGGACC TGCCAGACAC ATGGAAGGAT GAGCGCTACG CTATCTACGA CTTGAACACG
1021 AATAGCGTCA CCGCATTCCC TGCCCATGAC GAGGTGCTTT CTTTGGTTCGA CGGCCCAAG
1081 TCCTACAGAA TCCGCGGTTA CGCCTACGGC GCGGCGGCA GACGCATCAC GCGGGTCGAG
1141 CTGACGCTGG ATCGCGGAAA GACGTGGGTG CTCGCCAATG TCAACTATCC CGAAGACGAA
1201 TATCGGTTTCG CGCCCGAGGG CGAGACCCTA TACGGTGGGA GAGTCGACAT GGATTGGAGA
1261 GAAACTTGGC TTCTGCGTGG TGCTTCTGGG ACCTTGACGT GCCAGGTCGC ACAACTCGCC
1321 GACGCAGCCG ATGTCATGGT CCGCGCCATG GACGAGGGCA TGATGGTGCA ACCTAGAGAT
1381 ATGTAAGTGA GCGTCTGGG CATGATGAAC AACCCGTGGG TCAGAGTCAT CATCCACAGG
1441 GAGGGTCACA GTCTCCGCTT TGAACACCCT ACCCAGCCA TGCTGGGCGG TGGCGGTTGG
1501 ATGGAGAGGG TGA AAAAAGC TGGCGGCAAT CTCACCAACG GCTTCTGGGG AGAGAAGATC
1561 GAAGGAGAGA GCGAAAACAC CGTCAGTGAA GAGCCGTTCA GGGAGATTTG GATGACGAGG
1621 GAAAGCGTCA AGCGAGTCAT TGCCATGGAC GAGCTTCGCC AGCACGGCGG TGAGACGAGT
1681 CCCTGGTTTCG TCATCAACGG CGAGGTATAC GACGGCACCC CTTTCTTGGG AGGCCACCCA
1741 GGCGGCGCAG CCTCCATCTT CGGGGCCGCT GGCCAGGACG TATCTGAGGA GTTTGTGACT
1801 ATCCGTAA**gt** tctccccatg aagcgcagtg ttgcctggag gccacataga **ctgac**caacc
1861 ttcggctgtg cagac**ag**TGA AAACGCCAAG GCGATGATGC CCGAGTACCA TATCGGCAGC
1921 ATGGACGAGG CCGGCAACAA AACACTTGCG TTGGGGGTTG TCGTCGAGGA CGACCCGGAG
1981 AAGCGCCGC GGCCAGTATT CCTGCAGTCC AAGGCGTGGA CCAAGGGCAT TCTGAACGCG
2041 AGGCGGATGA TATCCTCCGA CACCAAAATC TTCACCTTCA GTCTCCAACA TCCGGAGCAA
2101 AGCATTGGCT TGCTGTTCGG ACAGCATCTG ATGATGCGGC TTCGCGACCC GGTACCCCGC
2161 GAAGCCATCA TCCGCGCGTA CACGCCATT TCGGAAGGGT CCGACAAGGG CAAGCTACAT
2221 GTTCTGGTCA AGATATATTA CGACACTCCA GAACGCAAGG GCGGCAGGAT GACCCAGGCT
2281 CTTGACTCGA TACCTTTAGG TCACTGGGTA GACTTCAAAG GTCCGGTTCGG CAAGTTTGGAG
2341 TATCTTGGCG GCGGTCTTTG CTGATTGCG GGTAAGCAAC GGCGCGTGAA GCGGTTTCGTC
2401 ATGATTTGCG CCGGCTCCGG CATCACACCC ATCTTTCAAG TCCTCCGGGC CGTATTGAAG
2461 AACGTCCAAG ACCCGACGCG GTGCCTGGTG CTCGACGGCA ACCGTGTGGA GGAGGACATA
2521 CTCTGCCGCG AGGACTTGGA CGACATGGCC AGCGCCAACC CGGACAGGTG CAGACTACTG
2581 CACACCCTGA GCAAGCCGGC ATCGTCTTGG ACAGGTCTCA AGGGGCGAAT CGACGCCGCC
2641 TTCTTGGAGA CCGAGGTTGG CGCTCGGCGC AGCGATAGCG ACGGCGAAGA ATTGGTGTCTG
2701 GTGTGCGGCC CGGAACCGCT GGAGAAAAGT GTCCGAAGCA CGCTGCTCGA TCTAGGCTGG
2761 AAGGGGGATG ACTTGCTGTT CTT**CTG**AGCG CGTAGTCACC CGGCTTCATC CAAGCCCGGA
2821 TTTAC**AAAAAT** **AT**TTTTGGAC GCTGTCACAA CGCCGTCCCG CGAACGGGGT CGCCGACCTC
2881 GGGTCTCGGC AAAGCAGAGT CGCTACCCCG TCTCGGGCCG TCGTGGCGCC CAACTGCCAG
2941 CGAATTCTCC CGCTCGTGCT CAAAGTGACG CCGATTGAGA CAATAGGACC AGAGAGAGAT
3001 GACACGCGAG GTTTTGGTGT ACATTTGAAA GTGGGGGGG GGTGGCGGG

Figura 4 – Sequência de nucleotídeos do gene *nit1* de *C. lindemuthianum* e suas regiões flaqueadoras. O possível códon de início do gene, o códon de parada e o sinal para poliadenilação estão em negrito. O único íntron do gene está em letras minúsculas, com as seqüências consensos 5'gt e 3'ag e a seqüência consenso interna ctgac em negrito.

Em fungos filamentosos, a análise de seqüências do gene da nitrato redutase revela variação quanto à presença de íntrons e ao tamanho destes, embora eles sejam pequenos (Pereira et al., 2003). Já em relação à posição desses íntrons dentro do gene, eles tendem a se localizarem em regiões conservadas dentro de um mesmo reino, mas divergem entre os reinos Fungi e Plantae (Zhou e Kleinhofs, 1996). Nos fungos *Ustilago maydis* (Banks et al., 1993) e *Botryotinia fuckeliana* (Levis et al., 1997) não houve relato da presença de íntrons dentro do gene da nitrato redutase, enquanto no fungo *Hebeloma cylindrosporum* (Jargeat et al., 2000) foram registrados 12 íntrons. Em fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foi mencionada a presença de seis íntrons que, embora apresentassem tamanhos diferentes, estavam localizados em regiões conservadas.

O íntron putativo do gene *nit1* de *C. lindemuthianum* inicia no nucleotídeo 1808 (em relação ao ATG) e possui 69 pb de tamanho, sendo similar aos relatados em outras espécies de fungos filamentosos, como *Aspergillus nidulans* com íntrons variando de 48 a 67 pb (Johnstone et al., 1990) e *Penicillium griseoroseum* com variação de 51 a 72 pb (Pereira et al., 2004). Outros fungos filamentosos como *Crinipellis perniciososa* (Silva, 2005), *A. oryzae* (Kitamoto et al., 1995) e *Hebeloma cylindrosporum* (Jargeat et al., 2000) possuem íntrons maiores, que chegam a 98, 98 e 92 pb, respectivamente.

Em relação ao número de íntrons, foi verificada a presença de um único íntron no gene que codifica a nitrato redutase para os fungos *C. lindemuthianum*, *Beauveria bassiana*, *Fusarium oxysporum*, *Gibberella fujikuroi*, *Metarhizium anisopliae* e *Verticillium fungicola*, sendo que a localização desse íntron nessas espécies é a mesma e corresponde à localização do íntron VI presente em *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. A localização desse íntron, dentro do domínio heme da proteína nitrato redutase, é relatada de forma geral para todos os fungos filamentosos, com exceção daqueles que não possuem íntrons e, dessa forma, parece ser uma característica ancestral desse grupo de indivíduos. Apesar disso, nenhuma similaridade, além dos consensos relacionados à excisão do íntron, foi encontrada entre o íntron da nitrato redutase de *C. lindemuthianum* e dos demais

fungos filamentosos. Nos fungos filamentosos é observado que a maioria dos íntrons está localizada na região que corresponde ao domínio de ligação do cofator molibdênio e que esses íntrons estão em regiões conservadas. Com exceção de *H. cylindrosporium* (Jargeat et al., 2000) e *C. perniciososa* (Silva, 2005) não existem relatos sobre a presença de íntrons dentro da região que corresponde ao domínio FAD para qualquer outro fungo filamentoso.

Em plantas como *Lycopersicum esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *Oryzae sativa* e *Phaseolus vulgaris*, os três íntrons presentes nessas espécies ocupam a mesma posição. Em geral, esses íntrons tendem a ocupar regiões dentro e não entre os domínios funcionais. Os genes da nitrato redutase de algas como *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reihardtii* e *Volvox carteri* apresentam mais íntrons em relação aos dos demais eucariotos, de 10 a 15. As posições de 8 dos 10 íntrons de *Volvox* são idênticas às de *Chlamydomonas* (Zhou e Kleinhofs, 1996).

Na região promotora do gene *nit1* de *C. lindemuthianum* (Figura 5) foi possível identificar regiões que podem funcionar como cis-elementos para a expressão do gene. Esses cis-elementos incluem três possíveis regiões TATA Box localizadas a -105, -271 e -477 pb em relação ao ATG proposto e duas possíveis regiões GC Box localizadas a -366 e -452 pb. Nessa região puderam ainda ser identificadas quatro seqüências TATC localizadas a -184, -189, -220 e a -319 pb. Esses cis-elementos são sítios de ligação do regulador geral positivo AREA em *A. nidulans*, NIT-2 em *N. crassa* e NRE em *P. chrysogenum* (Caddick et al., 1994; Marzluf, 1997; Haas e Marzluf, 1995). Elementos com pelo menos duas cópias de seqüências GATA, que podem estar na mesma direção, ou opostas, e com espaço de aproximadamente 30 pb, são considerados fortes sítios de ligação para NIT-2 (Chiang e Marzluf, 1994). Em *P. chrysogenum*, sítios fortes de ligação de NRE foram descritos por Haas e Marzluf (1995) como regiões com pelo menos duas seqüências GATA com espaçamento entre 5 e 27 pb, configuradas na mesma direção ou em direções opostas. Elementos GATA separados por 74 ou 96 pb não constituíram fortes sítios de ligação NRE (Haas e Marzluf, 1995). Em *C. lindemuthianum*, duas regiões TATC localizadas a -184 e -220 são separadas por

32 nucleotídeos e podem constituir uma forte região de ligação da proteína reguladora geral para assimilação do nitrogênio. Outra possibilidade de ligação para essa proteína seria entre os cis-elementos localizados nas posições -189 e -220, que estão separados por 23 nucleotídeos. A forte ligação de NRE de *P. chrysogenum* a dois elementos GATA talvez esteja relacionada a um funcionamento da proteína em forma dimérica, também sugerido para NIT-2 em *N. crassa* (Feng et al., 1993; Haas e Marzluf, 1995).

```

-640   TCGTGGAAG  TATGTTCCAG  ATTATGCCCG  AGTCTCTTTG  TCGTGAGCCT  GCTACCCGCC
-580   GGCTCTATTC  CATCTTCTGC  TCTTTTGATG  GAGGGAAGTG  GCTGGCTTAG  TCTACGACTC
-520   TAGTGCCGTG  CGGGTTCTGC  GATGGAGATG  CCGCATGGTA  ATAGTGTGCT  TTCCATCTCA
-460   TCCCGCCCCA  TCCCGTCCCA  TCCTGTCCCC  ATGCCGGTCG  GCACGTCTCC  CTTCCACGTC
-400   CTTTGCCCCC  GTTCGGTGCG  CTTGCGTTCC  GCCCACACCA  CAGACGTGAC  AACTCCGTGT
-340   CTAGGAAGTG  CAGTTTCAT  CACGAGCAG  GCCTTACTTA  TTCGATTGTC  ACCCCCAGCG
-280   TTTCGTATAG  GATCCTTCTC  TTTCTCTCTG  ACTCTTCTGT  CAAGCCTTCA  TCCCACATATC
-220   GTTCTGTTCA  TACGTCGAAC  GGTATCAGC  CTATCAGGTT  CCACTGATTC  GTCAACGCTC
-160   GTGTTTTGGA  CTCACAAGTG  ACGTCGTGGG  CACTCACTGC  CAGACAACCT  CTATACGGCA
-100   CAAGCCATCA  TCCAACCCAC  CCACCCACCT  GCTTCAGAAC  TAGAACATTT  GGCTTCGCAT
-40    AGCACATTCT  GGAATTCGAC  ACTGCTGCGC  GACGTGATGG  ATG

```

Figura 5 – Seqüência de nucleotídeos do promotor do gene *nit1* obtida por meio do seqüenciamento do fragmento subclonado no plasmídeo pNIT11. O possível códon de início do gene está em negrito, os possíveis cis-elementos (TATA Box e CG Box) estão sublinhados e os possíveis sítios de ligação das proteínas reguladoras geral (TATC) e específica (CTCCGTGT) estão delimitadas por retângulos.

No promotor do gene *nit1* de *C. lindemuthianum* nenhum cis-elemento para a ligação da proteína reguladora específica da via de assimilação do nitrato (NIT4), similar àquele encontrada por Fu et al. (1995) em *N. crassa* (TCCGCGGA), pôde ser identificado. Entretanto, foi encontrada uma seqüência localizada a -340 pb (CTCCGTGT), que pode ser uma possível região de ligação para NIT4, uma

vez que ela só difere em sua última base do consenso CTCCGHGG descrito por Punt et al. (1995), que mostraram ser esse o sítio de ligação de NirA na região intergênica dos genes *niaD-niiA* de *A. nidulans*. Além disso, seqüências palindrômicas parciais similares ao fraco sítio de ligação da proteína NIT-4 TCCGTGGC (Fu et al., 1995) tais como CCGCCGGC ou CTTCCGTGT, foram encontradas.

Essa região reguladora de *C. lindemuthianum* não apresentou identidade a nenhuma outra região correspondente em outros fungos. É esperado que espécies relacionadas apresentem alta identidade na região estrutural dos genes, mas pouca ou nenhuma na região reguladora. Entretanto, há alguns casos na literatura em que ocorre alta identidade entre tais seqüências, como a região intergênica dos genes para a nitrato e nitrito redutase de *A. fumigatus*, que apresenta 42% de identidade com a mesma região de *A. nidulans*, 37% com a de *A. parasiticus* e com a região promotora do gene *nit-3* de *N. crassa* (Amaar e Moore, 1998). Valores altos são relatados nas regiões correspondentes de *A. parasiticus* e *A. oryzae*, com identidade de 95% (Chang et al., 1996), e em *G. fujikuroi* e *F. oxysporum*, com identidade de 91,2% (Tudzynski et al., 1996).

Na região 3' não traduzida do gene foi identificado um possível sinal para a poliadenilação (AAAATA) que é bem semelhante àquele encontrado por Pereira et al. (2004), ao descreverem a seqüência do gene *niaD* de *P. griseoroseum* (AAAAATA).

Com a remoção do íntron putativo do gene *nit1* de *C. lindemuthianum* foi possível deduzir a seqüência de aminoácidos (aa) da proteína NIT1 e compará-la com nitrato redutase de outros fungos. A seqüência da proteína deduzida apresenta 905 aa com uma massa molecular estimada de 101,1 KDa. Este é o tamanho aproximado das proteínas deduzidas para *M. anisopliae* com 892 aa e massa molecular de 99,5 KDa, *M. grisea* com 911 aa e massa molecular de 101,7 KDa, *V. fungicola* com 893 aa e massa molecular de 99,1 KDa e *B. fuckeliana* com 907 aa e massa molecular de 101,7 KDa. Com relação à identidade da nitrato redutase de *C. lindemuthianum* com a de outros fungos, este possui 62,43% de identidade com *M. anisopliae*, 62,27% com *M. grisea*, 60,15% com *V. fungicola*,

58,30% com *B. fuckeliana* e 51,93% com *A. fumigatus*. Valores mais altos de identidade são encontrados em fungos do mesmo gênero a exemplo de *P. chrysogenum* e *P. griseoroseum*, que compartilham 92% de identidade entre suas proteínas. Além disso, tem sido relatado na literatura que, por causa da conservação dos domínios da proteína nitrato redutase, grande identidade pode ser observada entre proteínas de fungos e de plantas e com proteínas funcionalmente relacionadas, como sulfito oxidase, citocromo b5 e NADH-citocromo b5 redutase de mamíferos (Campbell e Kinghorn, 1990).

A Figura 6 ilustra onde iniciam e terminam os domínios de ligação do cofator molibdênio, de Heme e de FAD. O domínio de ligação do co-fator molibdênio se localiza próximo à extremidade N-terminal da proteína e inicia no resíduo de aa Asp⁷⁷, estendendo-se até o resíduo Val⁴⁵⁰. Dentro desse domínio, é encontrado o resíduo de Cys¹⁷⁴, que corresponde ao resíduo Cys¹⁵⁰ de *A. nidulans*, demonstrado por Garde et al. (1995) em experimentos de mutagênese sítio direcionada ser essencial para a ligação do co-fator molibdênio. O domínio de ligação a Heme se inicia no resíduo Arg⁵¹⁶ e termina no resíduo Asn⁵⁹³. Nesse domínio está presente o único íntron da proteína NIT1, de *C. lindemuthianum* (indicado por uma seta na Figura 6), e também o resíduo His⁵⁷⁹ correspondente ao resíduo His⁵⁴⁷ de *A. nidulans*, que também foi demonstrado por Garde et al. (1995) ser essencial para o funcionamento da proteína nitrato redutase. Entretanto, essa mesma substituição feita em *N. crassa* por Okamoto e Marzluf (1993) não diminuiu grandemente a atividade da nitrato redutase desse fungo. O domínio de FAD que se estende do resíduo Glu⁶³⁸ até o final da proteína estão localizados dois outros aminoácidos importantes para o funcionamento da proteína, o Trp⁶⁵¹ e a His⁶⁸⁷. A substituição do aa Trp⁶¹⁸ da proteína nitrato redutase de *A. nidulans*, que é correspondente ao Trp⁶⁵¹ de *C. lindemuthianum*, por um resíduo Lys, fez com que transformantes contendo essa modificação crescessem a 30 °C, mas não a 37 °C, quando a única fonte de nitrogênio foi o nitrato. Já o aminoácido His⁶⁵⁴ da proteína NIAD de *A. nidulans*, que corresponde a His⁶⁸⁷ de *C. lindemuthianum*, demonstrou ser importante para o funcionamento da proteína, mas não essencial (Garde et al.; 1995).

C1	. .MCLHLSPSPRGMPCRR.RSC.LFLLAQPLWGKVS	35
MaMPQSESNSEPGFQQ.KTV.VFPPSPSTVGRSRR	32
Mg	MGTIVGLPPIPTTEAPPSYTTVKKLDIFPPSPDPT.AKESR	39
VfMVVRAGT.ATR.NNC.TLPPSPRTVGNRSRA	28
Bf	MASAQFMNEHSSEADA.EMS.KMIPQLPQTPPDS..NEN.	35
AfMATITQV	7
C1	IASN.GGSDSSLVAGLLDEPG.A..EGPR..TYALPP..N	67
Ma	CSAD.GNSND.ITFPV..SPTIA..NNDAL.IYPLPP.TN	64
Mg	QHSR.RSSIS.VGTGLVEDVDCAVVNDASRPYPLPP..P	75
Vf	GSDDEGGTFD..NSPP..TPPVEKITNLLK.PYALPP.QN	62
Bf	SSDE.LGSL..SYSS..STS.L..SLQR...YTLPPPTN	64
Af	QTQETHTVLPKSLTVVPGQITVKEISNLDLDPDIPLPP.PS	46
C1	SKANRVLPEDLRTPDSHVPRDSRLIRLTGVHPPFNVEAPLS	107
Ma	SQKS.VRPEDLKTPDSHVERDARLIRLTGTHPFNCEPPLR	103
Mg	TRQNNVLPQDLKTPDSHVERDPRRLIRLTGIHPFNTEAPLS	115
Vf	TPTQ.VLPEDLKTPDSHVPRDPRRLIRLTGVHPPFNVEPPLT	101
Bf	PPTI.LKEDLKTPDNQVPRDPRRLIRLTGIHPFNVEPPLS	103
Af	TNPTEILAQDKGTPDNHVPRDPRRLIRLTGVHPPFNVEPPLT	86
C1	ELYNEGFIITRDLHYVRNHGAVPKCDDDDMFD.WQFTVEG	146
Ma	DLYDEGFLTSEDLHYVRNHGVPVQCDDGDM.DHWTFTVDG	142
Mg	DLFDEGFINSKDLHYVRNHGAVPRVEDADMMD.WEFTVEG	154
Vf	DLYDEGFLTSENHLYVRNHGVPVPECSDESLS.WTFAVDG	140
Bf	ALYDEGFLTSPELFYVRNHGAVPHVEDSSIPD.WEFSVEG	142
Af	ALFNEGFLTSPELFYVRNHGVPVPLVRDEDIPN.WEISIEG	125
C1	EVENPITMNLRLDISDYEQVITYPVTTLVCAGNRRKEQNVVR	186
Ma	LVENPFTLSVRELIASYEQVITYPITLVCAGNRRKEQNVVR	182
Mg	MVESPMKLTLRITLMKDFATYPTVTLVCAGNRRKEQNVVR	194
Vf	LVEKPFITITVRDLIETHDQLTYPVTTLVCAGNRRKEQNIVR	180
Bf	LVKKPFITLTKDLLREYEQITVPIITLVCAGNRRKEQNVVR	182
Af	LVERPVVLNFRQILQKFNQITAPITLVCAGNRRKEQNTVR	165
C1	KTGFFLGHRLVGPPLWTGCAHRIPRLARPCPKRGARYV	226
Ma	KSKGFSWGSAGL.STALWTGVALG.DLIAKAKPRRGARYV	220
Mg	KTGFSWGAAGL.STALWTGVPLG.DLLARAMPKRGARYV	232
Vf	KSKGFSWGAAGL.STALWTGVPIG.ALLRIKPKRGARYV	218
Bf	KSKGFSWGAAGV.STALWTGVPMY.ELIRKAMPMRGAKYV	220
Af	KSKGFSWGPAGL.STALFTGPLMA.DVLRVYAKPLRQAKYV	203
C1	CLEGADKLPNGYYGTSIKLNWCMDRDRGVTVCYRMNGELL	266
Ma	CFEGADKLPNGYYGTSVKNWCLDPNRGIMVAHKMNGCVL	260
Mg	YFEGADKLPNGYYGTSIKLNWVDPNRGIMVAHRMNGEAL	272
Vf	CFEGADKLPNGYYGTSVKNWCLDENRGIMVAHKMNGQSL	258
Bf	CMEGADKLPNGYYGTSKLNWVMDPNRGIMVAHKMNGEML	260
Af	CMEGADKLPNGYYGTSVKNWAMDPNKLIMLAHKMNGEPL	243

Figura 6 – Alinhamento da proteína nitrato redutase de *C. lindemuthianum* com proteínas de outros fungos filamentosos. Aminoácidos destacados em cinza são conservados. Os três domínios da proteína MoCo, Heme e FAD estão sublinhados, respectivamente, com uma, duas ou três linhas. Aminoácidos destacados em preto indicam resíduos conservados que foram mostrados serem importantes em experimentos de mutagênese direcionada na proteína NIAD de *A. nidulans* (Garde et al., 1995), e a seta indica o possível íntron em *nit1* de *C. lindemuthianum*. C1 -*C. lindemuthianum*, Ma -*M. anisopliae*, Mg -*M. grisea*, Vf -*V. fungicola*, Bf -*B. fuckeliana* e Af -*A. fumigatus*.

Continua...

C1	PPDHGKPVRIIPGQIGGRSVKWLKKIIVTKEPSSNWHYI	306
Ma	HPDHGKPVRVVIPGQIGGRSVKWLKRITVTEKPSDNWYHI	300
Mg	HPDHGKPLRIVIPGQIGGRSVKWLKRIVVTSEPSDNWYHI	312
Vf	HPDHGKPVRIIPGQIGGRSVKWLKKITITAEPSDNWYHI	298
Bf	RPDHGKPLRAVVPQIGGRSVKWLKKIIVTAAPSDNWYHI	300
Af	RPDHGRPLRAVVPQIGGRSVKWIKKLILTDAPSDNWYHI	283
<hr/>		
C1	YDNRVLPMTMVSPEASADLPDTWKDERYAIYDLNTNSVTAF	346
Ma	YDNRVLPMTMVTPEASADLPDTWKDERYAIYDLNTNSVICY	340
Mg	YDNRVLPMTMVTPEASADLPDTWKDERYAIYDLNTNSATCY	352
Vf	YDNRVLPMTTISPEASADLPNVWKDEKYAIYDLNVNSAICY	338
Bf	YDNRVLPMTMISPEQSANEPKWWTDERYAIYDLSTNSATAY	340
Af	YDNRVLPMTTVSPEMAASDPMWWRDERYAIYDLNVNSAAAY	323
<hr/>		
C1	PAHDEVLSLVDGPKS.YRIRGYAYGGGRRITRVELTLDLDR	385
Ma	PAHNETL.LLNGDSSTYKVRGYAYGGGKRITRIEVTLDK	379
Mg	PAHDEKVPITAG.AGVYKFRGYAYAGGKRVTRMEVTLDK	391
Vf	PQHDELIMLESAPET.YKVRGYAYGGGKRITRLEITLTK	377
Bf	PEHEERLSLVSGQQT.YRAKGYAYGGGRRVTRVEVTLDK	379
Af	PQHNEVLDLATAGPS.YTAKGYAYGGGRRVTRVEISLTK	362
<hr/>		
C1	GKTWVLANVNYPEDEYR.FAPEGETLYGGRVDMWRETWL	424
Ma	GKTWRLANIDYPEDRYR.LAPDGERLYGGRVDMWRETSF	418
Mg	GKSWRLAKMIYPEDDYR.LASVDDTLYGGKVDLSWREASF	430
Vf	GKSWLLAGIRYPEDDYR.RAPDGDVLYGGSTDMWREACF	416
Bf	GKSWALLDIRYHEDDYRDRAYENETLFGGKLDMEWRETCF	419
Af	GKSWRLANIQYAEDRYR..DFDGELFGGKVDMPWRETCY	399
<hr/>		
C1	LRGASGTLTCQVAQLADAADVMMRAMDEGMMVQPRDMYWS	464
Ma	C.WCFWELDVDIGDLKTTTDDIMVRAMDESMLVQPRDMYWS	457
Mg	C.WCFWELDIPPTDLVAADDVMIRAMDDSMVQPRDMYWS	469
Vf	C.WCFWEIDIPVSDLCESDDMMIRAMDEGMMVQPRDMYWS	455
Bf	T.WCFWEVDLDVQDLAMSGDIMVRAMDESMMVQPRDMYWS	458
Af	C.WCFWSLDIPVPDLEASDALLVRSMDSEAMSVQPRDMYWS	438
<hr/>		
C1	VLGMMNPNWVRVVIHREGHSLRFEHPTQPMLGGGWMERV	504
Ma	VLGMMNPNWFRVVDHIGHALQFEHPTQPALIPGGWMERI	497
Mg	VLGMMNPNWYRVMIHKEGHDLRFEHPTQPALIPGGWMERV	509
Vf	VLGMMNPNWFRVVIHRENGVLRFEHPTQPALQAGGWMERV	495
Bf	VLGMMNPNWYRVVITKEGDYLRFEHPTQPALMPGGWMERV	498
Af	VLGMMNPNWFRVVTITKQNGTLLFEHPTHPVMAGG.WMERV	477
<hr/>		
C1	KKAGGNLTNGFWGEEKIEG.ESEN.TVSEEPFREICMTRES	542
Ma	KKAGGNLTNGSWGKLAG.QTED.VMGQEPQDVCMTNPR	535
Mg	KKAGGDLNNGFWGERVAGDEEESAVAEPPANEICMTNPS	549
Vf	KASGGNLANGFWGECTSS.EAVE.A.PKEPEKDICMTNPK	532
Bf	KSAGGNLANGFWGEEKM.GTEDES.VALVEVKQEIKMTKDD	536
Af	KKAGGDLTNGNWGERQEGEILAE...PEPVKEINMKKEG	513
<hr/>		
C1	VKRVIAMDELROHGGETDPWFVINGEVYDGTFFLEGHPGG	582
Ma	ADRLVTMCELKSHSGEQEPWFIVDGGQVYDGTFFLEGHPGG	575
Mg	VNKTITLDELKAHDSSESPWFVVDGGQVYDGIKFFLEGHPGG	589
Vf	IDRVIKLEELKAHSGETEPWFVIKGVYDGTPLYDGHHPGG	572
Bf	VKREISIEELRQHDNEKEPWFVNLNGEVYDGAFFLEGHPGG	576
Af	LNRTISLEEFKKSNEEGAQWFIVKGEVYDGPFFLEGHPGG	553

Continua...

C1	AASIFGAAGQDVSEEFVTIR.NENAKAMPEYHIGSMDEA	622
Ma	SASIFGAAGQDVTEEFVTIH.SENAKAMMPAYHIGKLDED	614
Mg	AASIIIGAAGQDCSEEFVTIH.SENAKAMPEYHIGSLDEK	628
Vf	ATSIINAAGQDTTEEFITIH.SENAKAMPKYHIGTLDAA	611
Bf	ATSITGAA.EDSTDEFMAIH.SETAKAMMPAYHIGTSLSPS	614
Af	AQSIISSIGLDVTEDFSEIH.SETAKAMMPDYHIGTMDEA	592
<hr/>		
C1	GNKTLALGVVVED..DPEKRPRPVFLQSKAWTKGILNARR	660
Ma	ALAQLS.GETNEC..DPS...RSVFLDSKVMKATLQEKI	648
Mg	SRSLLAPESTQP..ESTE.PRPVFLQSRVWSKALLQEKI	665
Vf	SLKALEGGDEDESVNDPT...RPVFLQPKTWSKAILKSKT	648
Bf	AFTSLLNPEPLSS..SSQS.LRPVFLQPKSWSKAVLTAKK	651
Af	SLKMLKEARKEE...PSK.PRALFLQPRSWTKAKLAKR	628
<hr/>		
C1	MISSDTKIFTFSLQHPEQSIGLPVGOHLMMLRDRPVTREA	700
Ma	SVSSDSKIFRFKLDHAEQEVGLPVGOHLMMLRDRPVTRES	688
Mg	SVSGDSKIFSFKLDHAEQAIGLPVGOHLMMLRDRPATREA	705
Vf	DVSSDSKIFSFRLDHPNQSIGLPTGOHLMMLRDRPATREA	688
Bf	VISSDTRIFSFRLDHAEQVIGLPVGOHLMMLRDRPVTREA	691
Af	DVSWDTRIFTFELEHQKQKGLPIGOHMMIRVODSTTKEK	668
<hr/>		
C1	IIRAYTPISE.GSDKGKLHVLVKIYYDTPERKGGRTQAL	739
Ma	IIRAYTPISE.GTDRGCLDVLIKIYHGTPERRGGKMTQAL	727
Mg	IIRAYTPLSDCVVEKGLLRVLVKIYYKSAGMEGGKMTQAL	745
Vf	IIRAYTPLSE.THAKGQLDVLIKIYRDSGQPPGGKMTQAL	727
Bf	IIRSYPPLSL.GTDKGVLDILIKIYLNKKGPPGGKMTMAL	730
Af	IIRSYPPLSD.PNKEGSVDVLIKVFYFPTPLVPPGGKMTMAL	707
<hr/>		
C1	DSIPLGHVWDFKGPVKGFEYLGGLCSIAGKQRRVKRFVM	779
Ma	DSIPVGHVWDFKGPVKGFEYLGRGLCSISGKPRHVSFRFM	767
Mg	DHLPVGHVWDFKGPVGRFEYLGKGRVSGKERSVRRFIM	785
Vf	DSIPLGHFIDIKGPVKGFEYIGRGQCTVSGVRRHVRRFIM	767
Bf	ESIPVGHSIDFKGPIGKFEYVAKGECVIGKKRRVKRFVM	770
Af	DQLPLGSMIECKGPTGRFEYLGNGRVIISGKERRVRSFKM	747
<hr/>		
C1	ICAGSGITPIFQVLRVAVLKNVQ..DPTRCLVLDGNRVEED	817
Ma	ICGGSGITPIFQVFRAMIKGAD..DSTECVILDGNRVEED	805
Mg	ICGGSGVTPIFQVFRAVMQDKE..DQTRCLVLDGNRTEED	823
Vf	ICAGSGVTPIFQVLRVAVTSAE..DETECLVLDGNRFEED	805
Bf	ICGGSGVTPIFSVLRAVLNEEVGGAPKIVLDGNRREED	810
Af	ICGGTGITPIFQVLRVAVMQDPQ..DPTSCVVLFGNRQEED	785
<hr/>		
C1	ILCRELDDMASANPDRCLLHTLSKPASSWTGLKGRIDA	857
Ma	ILCRLELDQMASSAKHRCSLLHCLSRPSSWEGRTGRIDK	845
Mg	ILCKDELDKLAVGNEDRCLRVYSLSKPSESWTGAKGRMDR	863
Vf	ILCKAELDAMVARAPSRRTTVLYKLSRPTETWQGLRGRMNK	845
Bf	ILCREELDDLKGVNEQRCLRVHALSQPTEEWKGLRGRIGK	850
Af	ILCRAELDAFEASDNKCKIVHTLSKAPDTWAGRRGRIGE	825
<hr/>		
C1	AFLETEVGA.RR.SDSDGE...E...LVLVCGPEPELEKSV	889
Ma	DLISSEIGS.PR.LDKD....D...IVLVCGPQMEKGV	875
Mg	ALFEKELGV.SG.SNSQ....D...MVLICGPESMEKSV	893
Vf	DFLEESIGAFGK.SDGQ....E...MVLVCGPGALEATV	876
Bf	EVLEKEVGRFEMDMGEGNGYRDGEQLVLICGPEALEKNV	890
Af	ALLKEFAVP....DDES.....MVLICGPEAMENSA	852
<hr/>		
C1	RSTL.LDLGWKGDDLLFF	898
Ma	CETL.RVLGWPDENIVVF	892
Mg	KQILTQELGWKDDLLFF	911
Vf	REVL.GGIGWKAEDLLFF	893
Bf	HGIL.SDLGWKDQDILFF	907
Af	KTIL.LAOGWKESNLHFF	869

4.3. Análise filogenética da proteína nitrato redutase em *C. lindemuthianum*

A análise filogenética da proteína NIT1 de *C. lindemuthianum* foi realizada por meio do alinhamento de diversas seqüências da proteína de diferentes espécies de fungos e plantas. Os programas computacionais utilizados para o alinhamento e a construção da árvore filogenética foram, respectivamente, o ClustalX, empregando-se o método de *neighbor-joining*, e o PAUP*, versão 4.0. A árvore filogenética consenso mostrada na Figura 7 apresenta índice de consistência de 0,78, e os valores de *bootstrap* são baseados em 5.000 replicatas, o que indica confiabilidade dos dados da análise filogenética. O alto índice de consistência da árvore indica que os diferentes genes da nitrato redutase analisados provavelmente tiveram origem em comum e, dessa forma, podem ser ditos homólogos entre si. Ao observar essa árvore, nota-se uma clara divisão entre grupos distintos diretamente correlacionados com a categoria taxonômica a qual eles pertencem, refletindo, dessa maneira, sua possível história evolutiva.

Além disso, uma correlação pode ser feita entre as características do gene da nitrato redutase de cada indivíduo e a divisão em grupos observada na árvore. Pereira et al. (2004) e Zhou (1996) relataram o número de íntrons como importante correlação no agrupamento de ascomicetos. É interessante notar que todos os indivíduos do ramo onde *A. fumigatus* está presente possuem seis íntrons em regiões conservadas e são correlacionados entre si, pertencendo à mesma ordem taxonômica. Outro ramo de ascomicetos que se destaca na árvore é o ramo em que *B. funckeliana* está presente. Nesse ramo estão os fungos que apresentam nenhum ou apenas um íntron. Apesar de *H. cylindrosporum* e *U. maydis* divergirem em relação ao número de íntrons, com 12 e nenhum intron, respectivamente, a identidade na seqüência da proteína nitrato redutase foi grande suficiente para estes serem agrupados em um mesmo ramo refletindo assim, o táxon ao qual pertencem. Os fungos *C. lindemuthianum* e *M. anisopliae*, que apresentam maior identidade na seqüência de aa da proteína nitrato redutase ficaram próximos na árvore, como esperado.

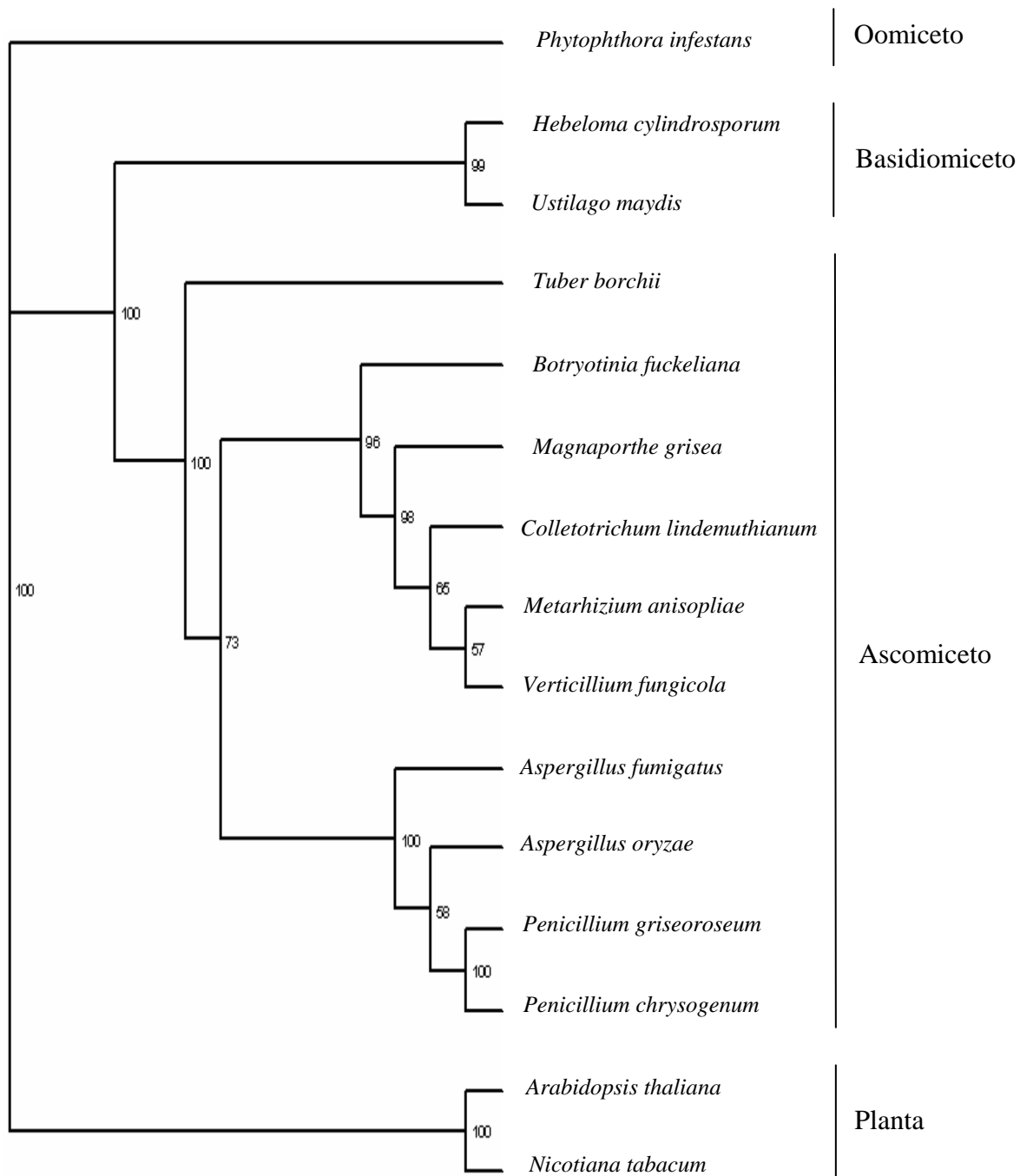


Figura 7 – Análise filogenética da proteína nitrato redutase. A árvore enraizada foi baseada na comparação da seqüência de aminoácidos da proteína nitrato redutase de *C. lindemuthianum* com outros fungos filamentosos. Os valores em porcentagem de *bootstrap* são mostrados em cada ramo e baseados em 5.000 replicatas.

Muitas moléculas têm sido utilizadas para estudos filogenéticos em espécies de fungos, entretanto, nem todas as moléculas possuem igual valor na análise de eventos evolutivos e nas relações filogenéticas. Segundo Zhou e Kleinhofs (1996), a molécula a ser utilizada deve ser suficientemente grande e consistir de um número razoável de unidades funcionais, as quais, de alguma forma devem ser independentes uma das outras no sentido evolutivo. Baseado nessas especificações, a proteína nitrato redutase pode ser usada para o estudo da evolução molecular de plantas, fungos e bactérias. Os genes da nitrato redutase têm evoluído a uma taxa constante e consistem de três domínios altamente conservados separados por três regiões. Essas regiões têm evoluído a taxas variáveis e, por consequência disso, podem ser utilizadas como ferramenta para estudar as relações evolutivas entre grupos mais próximos ou distantes entre si (Silva et al., 1995). Além disso, a presença de íntrons na seqüência do gene da nitrato redutase e a conservação dos domínios funcionais (Campbell e Kinghorn, 1990) podem ser consideradas na análise se houve perda ou ganho de íntrons durante a evolução.

4.4. Estudo da regulação do gene *nit1* em *C. lindemuthianum*

Fungos filamentosos, de forma geral, apresentam forte regulação para a via de assimilação do nitrato, por meio de reguladores positivos e negativos que garantem a repressão metabólica quando fontes primárias de nitrogênio como glutamina ou amônio estão presentes. Para verificar se em *C. lindemuthianum* ocorre regulação dessa via, experimentos de indução e repressão do gene da nitrato redutase foram feitos, e RT-PCR semiquantitativo utilizando 23 ciclos de amplificação (na fase logarítmica de amplificação) foi empregado para avaliar a presença de transcritos do gene *nit1* nas diferentes condições de cultivo a que o fungo foi submetido. Os resultados da análise de seqüência da região promotora desse gene já trouxeram indícios de que o gene *nit1* podia ser regulado de maneira positiva, uma vez que cis-elementos consensos para a ligação de reguladores positivos foram encontrados.

A transcrição do gene *nit1* de *C. lindemuthianum* é ativada por NaNO_3 e reprimida por glutamina, NH_4^+ e uréia (Figura 8). Neste experimento foram utilizados os oligonucleotídeos CLPcr1 e Niacol-2 (Tabela1) que flanqueiam o íntron do gene *nit1* e são capazes de amplificar uma região genômica de 491 pb. No cDNA, o tamanho da região amplificada foi menor, o que comprova a presença do íntron nessa região. Nos experimentos de repressão, onde o micélio do fungo foi crescido em meio mínimo (MM) contendo nitrato como única fonte de nitrogênio e a glutamina foi adicionada nos tempos de 0, 5, 15, 60 e 360 minutos (Haas et al., 1996), não houve diferença na quantidade de cDNA amplificado nos tempos de 0 e 5 minutos, uma vez que as bandas obtidas por meio da amplificação dele estão semelhantes. No tempo de 15 minutos após a adição de glutamina, é perceptível uma redução na quantidade de cDNA amplificado, o que indica uma menor transcrição do gene nessa condição. Nos tempos de 60 e 360 minutos, não foi possível detectar a presença de cDNA amplificado (Figura 8A). Resultados semelhantes foram obtidos por Haas et al. (1996) e Pereira et al. (2004), ao estudarem a regulação do gene da nitrato redutase para nos fungos *P. chrysogenum* e *P. griseoroseum*. Em *N. crassa*, a meia-vida estimada para o mRNA *nit-3* foi de apenas 5 minutos (Okamoto et al., 1991). Essa acentuada queda no nível de mRNA do gene da nitrato redutase é um mecanismo que permite à célula rápida resposta à condição nutricional do meio e garante grande economia em termos de energia, visto que ocorre a assimilação de uma fonte de nitrogênio mais prontamente metabolizável. Em *N. crassa*, a atividade da enzima NIT-3 cai relativamente rápida em micélio crescendo em fontes de nitrogênio primárias, sendo a meia-vida da atividade da enzima de cerca de 15 minutos (Okamoto et al., 1991). Segundo esses autores, esse declínio relativamente rápido da atividade enzimática ajuda a assegurar o uso preferencial das fontes de nitrogênio primárias.

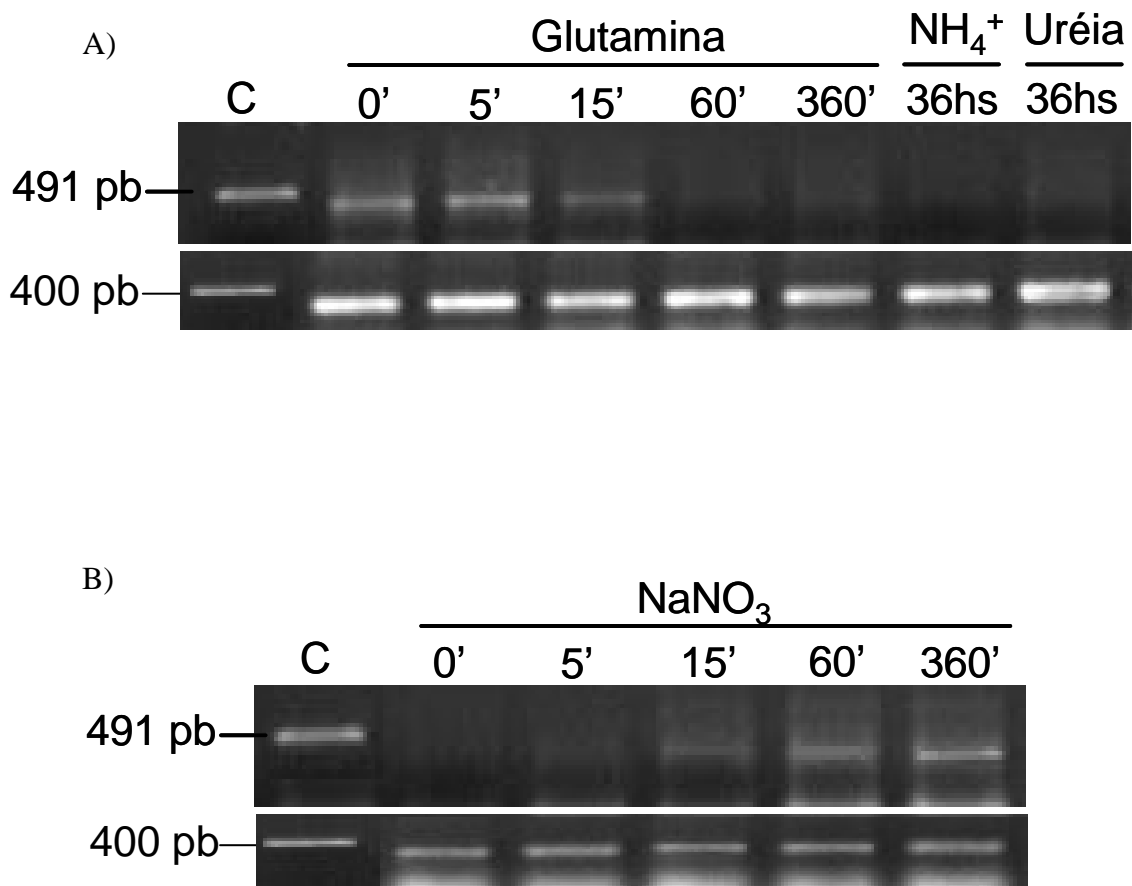


Figura 8 – Análise por RT-PCR da transcrição do gene *nit1* de *C. lindemuthianum*. A) Análise da repressão do gene feita a partir de micélio cultivado em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio e coletado após a adição de glutamina nos tempos indicados sobre cada canaleta. Repressão também foi analisada em micélios cultivados em NH₄⁺ e uréia. B) Análise da ativação do gene feita a partir de micélios cultivados em glutamina e coletados após a transferência para meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio nos tempos indicados sobre as canaletas. Controles internos positivos para a detecção da presença de cDNA em cada reação de RT foram feitos por meio da amplificação do cDNA com os oligonucleotídeos EF1 e EF2 que amplificam uma região de aproximadamente 400 pb do gene constitutivo que codifica para o fator de alongação ribossomal.

Nos experimentos de ativação do gene *nit1*, o micélio do fungo foi cultivado em glutamina por 36 horas e transferido para MM contendo nitrato como única fonte de nitrogênio nos tempos de 0, 5, 15, 60 e 360 minutos (Haas et al., 1996). No tempo 0, ou seja, antes da transferência do micélio para o MM contendo nitrato como única fonte de nitrogênio, não foi observado qualquer produto de amplificação, indicando que o gene não foi expresso nessa condição como aconteceu nos tempos de 60 e 360 minutos após a adição de glutamina nos experimentos de repressão do gene. No tempo de 15 minutos, já foi verificada uma banda de amplificação indicando a expressão do gene *nit1*. Uma rápida resposta a essa condição também é reportada para *N. crassa* (Okamoto et al., 1991), *P. chrysogenum* (Haas et al., 1996) e *P. griseoroseum* (Pereira et al., 2004). Em *N. crassa*, em apenas 15 minutos de indução por NO_3^- a quantidade de mRNA *nit-3* é máxima, sendo que a atividade da proteína NIT-3 aumenta rapidamente nos primeiros 15-20 minutos, atingindo um nível máximo a 60 minutos (Okamoto et al., 1991). No tempo de 60 minutos após a transferência para o meio MM com nitrato, transcritos do gene *nit1* foram observado numa condição quase máxima, tendo atingindo esse estado aos 360 minutos.

Como visto, a regulação do gene *nit1* de *C. lindemuthianum* parece não diferir da regulação para esse gene em outros fungos filamentosos, concluindo-se ser esse um mecanismo geral e importante para evitar gastos energéticos desnecessários. A única exceção para esse tipo de mecanismo de regulação do gene da nitrato redutase descrito na literatura é o *H. cylindrosporum*, que quando cultivado em fontes de nitrogênio, como uréia, serina e glicina, apresenta altas taxas de transcritos do gene da nitrato redutase, sugerindo a presença de um regulador geral e a possível ausência de fatores de transcrição específicos para a ativação desse gene. Jargeat et al. (2000) sugerem que fatores homólogos a *nirA/nit4* poderiam estar presentes, porém expressos de forma constitutiva, mascarando o requerimento de *nar1* para indução. O interessante é que outros basidiomicetos, como *U. maydis* (Banks et al., 1993) e *Crinipellis perniciososa* (Silva et al., 1995), apresentam regulação para o gene da nitrato redutase similar à dos outros fungos.

5. Conclusões

A caracterização do gene *nit1* de *C. lindemuthianum* indicou que a região estrutural desse gene possui 2.787 pb em tamanho com um único íntron localizado a partir do nucleotídeo 1.808 e que apresenta tamanho de 69 pb. A seqüência de aminoácidos deduzida a partir da ORF desse gene revelou uma proteína com 905 aminoácidos e massa molecular estimada de 101,1 KDa. Essa proteína demonstrou alta similaridade com a mesma proteína de outros fungos ascomicetos, como: *Beauveria bassiana*, *Fusarium oxysporum*, *Gibberella fujikuroi*, *Metarhizium anisopliae* e *Verticillium fungicola*. Além disso foram localizadas na região reguladora deste gene quatro seqüências TATC, que são sítios de ligação da proteína reguladora geral positiva e uma seqüência CTCCGTGT, que é um possível sítio da ligação da proteína reguladora positiva específica para a via de assimilação do nitrato. A presença desses cis-elementos na região promotora do gene *nit1* foi indicativo de uma possível regulação desse gene em *C. lindemuthianum*, como acontece com outros fungos relacionados, e que foi comprovada com os experimentos de regulação. Esses experimentos evidenciaram que transcritos do gene da nitrato redutase de *C. lindemuthianum* não puderam ser detectados quando o fungo foi cultivado em meio contendo NH_4^+ , ou uréia, como únicas fontes de nitrogênio e que bastaram 15 minutos após a repressão do gene com glutamina para que a quantidade do transcrito do gene

diminuísse praticamente pela metade, 15 minutos também foi o tempo que levou para que transcritos do gene pudessem ser detectados durante a indução do gene com NaNO_3 .

As características de seqüência do gene *nit1*, a alta identidade de sua proteína deduzida com a proteína de outros fungos e o modelo de regulação que ele apresenta levam a conclusão de que esse gene é altamente conservado quando comparado com o gene da nitrato redutase de outros fungos e que a via de assimilação do nitrato em *C. lindemuthianum* aparentemente é semelhante à de outros fungos, o que comprova, de forma geral, que a repressão metabólica do nitrogênio nesses organismos é regra.

5. Referências Bibliográficas

- Amaar, Y.G. e 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.
- Ballance, D.J. e Turner, G. Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene*, v. 36, p. 321-331, 1985.
- Balance, D. J. Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast*, v. 2, p.229-236, 1986.
- Banks, G.R., Shelton, P.A., Kanuga, N., Holden, D.W. e Spanos, S. The *Ustilago maydis nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene*, v. 131, p. 69-78, 1993.
- Bailey, J. A. e Jeger, M. J. *Colletotrichum*, Biology, Pathology and Control. CAB International, Wallingford, 1992
- Benton, W. D. C., Davis, R. W. Screening of Xgt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science*, v. 196, p. 180-183, 1977.

- Brooker, J. F. L. e Dickman M. B. Nitrate non-utilising mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. *Phytopathology*, v. 81, p. 672-677, 1991
- Brun, A., Chalot, M., Botton, B. e Martin, F. Purification and characterization of Glutamine synthetase and NADP-glutamato dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Plant Physiology*, v. 99, p. 938-944, 1992
- Caddick, M.X., Peters, D. e Platt, A. Nitrogen regulation in fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 64, p. 169-177, 1994.
- Campbell, W. H. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Physiologia Plantarum*, v. 74, p. 214-219, 1988.
- Campbell, W. H. e Kinghorn, J. R. Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends in Biochemistry Sciences*, v. 15, p. 315-319, 1990.
- Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Linz, J.E.L., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. e Bennet, J.W. Characterization of the *Aspergillus parasiticus niaD* and *niiA* gene cluster. *Current Genetics*, v. 30, p. 68-75, 1996.
- Chaves, G. Anthracnose In: *Bean Production Problems* (Schwartz, H.F. and Galvez, G.E., eds.). Centro Intern. de Agric. Tropical, Cali, p. 37-54, 1980.
- Christensen, T., Hynes, M. J. e Davis, M. A. Role of the regulatory gene *areA* of *Aspergillus oryzae* in Nitrogen metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 3232-3237, 1998.
- Colins, P. J. e Dobson, A. D. W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63 (9), p. 3444-3450, 1997.

- Chiang, T. Y. e Marzluf, G. A. DNA recognition by the NIT2 nitrogen regulatory protein: importance of the number, spacing, and orientation of Gata core elements and their flanking sequences upon NIT2 binding. *Biochemistry*, v. 33. p. 576-582, 1994.
- Cove, D. J. e Paterman, J. A. Autoregulation of the synthesis of nitrate reductase in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, v. 97, p. 1374-1378, 1969.
- Cutler, S.B., Cooley, R.N. e Caten, C.E. Cloning of the nitrate reductase gene of *Stagonospora (Septoria) nodorum* and its use as a selectable marker for targeted transformation. *Current Genetics*, v. 34, p. 128-137, 1998.
- Cutler, S.B. e Caten, C.E. Characterization of the nitrite reductase gene (*NII1*) and the nitrate-assimilation gene cluster of *Stagonospora (Septoria) nodorum*. *Current Genetics*, v. 36, p. 282-289, 1999.
- Exley, G. E., Colandene, J. D. e Garret, R. H. Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of *nit-6*, the structural gene for nitrite reductase in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, v. 175, p. 2379-2392, 1993.
- Felipe, M. S. S., Azevedo, M. A., Vainstein, M. H. e Schrank, A., *Biologia molecular de fungos filamentosos: construção de bancos genômicos e de cDNA*. Manual técnico, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", p. 99, 1992
- Feng, B., Xiao, X. e Marzluf, G. A. Recognition of specific nucleotide bases and cooperative DNA binding by the trans-acting nitrogen regulatory protein NIT2 of *Neurospora crassa*. *Nucleic Acid Research*. v. 21. p. 3989-3996, 1993.
- Feng, B. e Marzluf, G.A. Interaction between major nitrogen regulatory protein NIT2 and pathway-specific regulatory factor NIT4 is required for their synergistic activation of gene expression in *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, v. 18, p. 3983-3990, 1998.
- Fincham, J. R. S. Transformation in fungi. *Microbiological Reviews*, v. 53, p. 148-170, 1989.

- Fu, Y. H. e Marzluft, G. A. Characterization of *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, v. 7, p. 1691-1696, 1987.
- Fu, Y. H., Kneesi J. Y., Marzluft G. A. Isolation of *nit-4*, the minor nitrogen regulatory gene which mediates nitrate induction in *Neurospora crassa*, *Journal of Bacteriology*, v. 171, p. 4067-4070, 1989.
- Fu, Y. H. e Marzluft, G. A. *Nit-2*, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence- specific DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.87, p. 5331-5335, 1990.
- Fu, Y. H., Marzluft G. A. Nuclear DNA-binding which recognize nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol*, v. 175, p. 2379-2392, 1993.
- Garde, J., Kinghorn, J. R. e Tomsett, A. B. Site-direct mutagenesis of nitrate reductase from *Aspergillus nidulans*. *The journal of biological Chemistry*, v. 270. p. 6644-6650, 1995.
- Gromroff, E.D., Treier, U. e Beck, C.F. Three light-inducible heat shock genes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and Cellular Biology*, v. 9, p. 3911-3918, 1989.
- Gurr, S.J., Unkles, S.E. 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. e Marzluft, 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. e 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.

- Huber, D. M. e Watson, R. D. Nitrogen form and disease. Annual Review Phytopathol, v. 12, p. 139-100, 1974.
- Jargeat, P., Gay, G., Debaud, J.C. e Marmeisse, R. Transcription of a nitrate reductase gene isolated from the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporum* does not require induction by nitrate. Molecular and General Genetics, v. 263, p. 948-956, 2000.
- Jargeat, P., Gay, G., Debaud, J.C. e Marmeisse, R., Rekangalt, D., Verner, M. V. e Tachet, L. F. Characterization and expression analysis of a nitrate reductase transporter and nitrite reductase genes, two members of gene cluster for nitrate assimilation from the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporum*. Current Genetics, v. 43, p. 199-205, 2003.
- Johnstone, I.L., McCabe, P.C., Greaves, P., Gurr, S.J., Cole, G.E., Brow, M.A.D., Unkles, S.E., Clutterbuck, A.J., Kinghorn, J.R. e Innis, M.A. Isolation and characterisation of the *crnA-niiA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. Gene, v. 90, p. 181-192, 1990.
- Kitamoto, N., Kimura, T., Kito, Y., Ohmita, K. e Tsukagoshi, N. The nitrate reductase gene from a shoyu koji mold, *Aspergillus oryzae* KBN616. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 59, p. 1795-1797, 1995.
- Lenavel, F., Fraissinet-Tachet, L., Van de Vondervoort, P. J. I. e Visser, J. Isolation of UV-induced mutations in the *areA* nitrogen regulatory gene of *Aspergillus niger*, and construction of a disruption mutant. Mol. Genet. Genomics, v. 266, p. 42-47, 2001.
- Levis, C., Fortini, D. e Brygoo, Y. Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase (*niaD*) shows a high frequency of homologous recombination. Current Genetics, v. 32, p. 157-162, 1997.
- Marzluf, G. A. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. Microbiological Reviews, v. 45, p. 437-461, 1981.

- Marzluf, G.A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular biology Reviews*, v. 61, p. 17-32, 1997.
- O'connell, R.J.; Bailey, J.A.; Richmon, D.V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum* *Physiological Plant Pathology*, v. 27: p. 75-98, 1985.
- 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 and General Genetics*, v. 227, p. 213-233, 1991.
- Okamoto, P. M. e Marzluf, G. A. Nitrate reductase of *Neurospora crassa*: The functional role of individual amino acids in the heme domain as examined by site-direct mutagenesis. *Molecular and General Genetics*, V. 240, p. 221-230, 1993.
- Pereira, J. F., Lima, J. O., Rocha, R. B., Medina, P. X. L., Araújo, E. F., Queiroz, M. V. Nitrate reductase em fungos filamentosos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 31, p. 74-85, 2003.
- Pereira, J. F., Queiroz M. V., Lopes, F. J. F., Rocha, R. B. e Araújo, E. F. Characterization, regulation and phylogenetic analysis of the *Penicillium griseoroseum*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 50, p. 891-900, 2004.
- Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J., Green, J. R. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*, v. 27, p. 186-198, 1999.
- Platt, A., Langdon, T., Arst, H. N. Jr., Kirk, D., Tollervey, D., Sanchez, J. M. M. e Caddick, M. X. Nitrogen metabolite signaling involves the C-terminus and the GATA domain of the *Aspergillus* transcription factor AREA and the 3' untranslated region of this mRNA. *The EMBO Journal*, v. 15, p. 2791-2801, 1996.

- 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.
- Pompeu, A. S. Catu, Aeté-3, Aroana-10, Moruna-80, Carioca-80 e Aysó – novos cultivares de feijoeiro. *Bragantia*, Campinas, v. 41, p. 213-218, 1982.
- Prebble e Anderson. DNA extraction: miniprep. The *Aspergillus* website, 1998. www.aspergillus.man.ac.uk
- Punt P. J., Strauss, J., Smit, R., Kinghorn, J. R., van den Hondel C. A. M. J. J., Scazzocchio C. The intergenic region between the divergently transcribed *niiA* and *niaD* genes of *Aspergillus nidulans* contains multiple NirA-binding sites which act bidirectionally. *Mol Cell Biol*, v 10, p. 5688-5699, 1995.
- Rodriguez, R. J. e Yoder, O. C. Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum*). *Gene*, v. 54, p. 72-81, 1987.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Sanger, F., Nicklen, S. e Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- Silva, V. A. O. Isolamento, caracterização e regulação do gene que codifica nitrato redutase em *Crinipellis pernicioso*. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 2005. 37p.
- Snoeijers, A. S., Garcia-Pérez, A., Joosten, M. H. A. J. e De Will, P. J. G. M. The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, v. 106, p. 493-506, 2000.

- Thompson, J. D., Higgins, D. G. e Gibson, T. J. CLUSTALW: Improving the sensibility of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- Tudzynski, B., Mende, K., Weltring, K.M., Kinghorn, J.R. e Unkles, S.E. The *Gibberella fujikuroi niaD* gene encoding nitrate reductase: isolation, sequence, homologous transformation and electrophoretic karyotype location. *Microbiology*, v. 142, p. 553-539, 1996.
- Unkles, S.E., Campbell, E.I., Punt, P.J., Hawer, K.L., Contreras, R., Hawins, A.R., Van den Hondel, C.A.M.J.J. e 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.
- Xiao, X., Fu, Y.H. e Marzluf, G.A. The negative-acting NMR regulatory protein of *Neurospora crassa* binds to and inhibits the DNA-binding activity of the positive-acting nitrogen regulatory protein NIT2. *Biochemistry*, v. 34, p. 8861-8868, 1995.
- Williams, R.S.B., Davis, M.A. e Howlett, B. Nitrate reductase of the ascomycetous fungus, *Leptosphaeria maculans*: gene sequence and chromosomal location. *Molecular and General Genetics*, v. 244, p. 1-8, 1994.
- Zhou, J. e Kleinhofs, A. Molecular evolution of nitrate reductase genes. *Journal of Molecular Evolution*, v. 42, p. 432-442, 1996.