

Nitrato Redutase em Fungos Filamentosos

O potencial multifuncional da nitrato redutase em pesquisas com biologia molecular de fungos

Jorge Fernando Pereira

Biólogo, MS em Microbiologia Agrícola, Doutorando em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.
dgfernando@yahoo.com

Juliana Oliveira Lima

Bióloga, Mestrando em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.
ju.olima@bol.com.br

Rodrigo Barros Rocha

Biólogo, Mestrando em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa.
rodrigobarrosrocha@yahoo.com.br

Pilar Ximena Lizarazo Medina

Bacteriologista, MS em Microbiologia Agrícola, Doutoranda em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.
pixilime@hotmail.com

Elza Fernandes de Araújo

Bióloga, DS em Genética UFRGS; Profª Titular do Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa.
ezfa@ufv.br

Marisa Vieira de Queiroz

Bióloga, DS em Genética e Melhoramento ESALQ-USP; Professora Adjunta do Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa.
mvqueiro@ufv.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Introdução

Fungos filamentosos podem metabolizar uma série de compostos nitrogenados para obterem o requerimento nutricional necessário para seu desenvolvimento. Nesses organismos, o metabolismo do nitrogênio é um processo altamente controlado por um complexo de proteínas reguladoras, que assegura grande eficiência na utilização das fontes de nitrogênio disponíveis. Esse complexo é constituído por uma série de proteínas que são requeridas para que vários compostos secundários sejam assimilados quando as fontes preferenciais de nitrogênio, isto é, o amônio ou a glutamina, não estão disponíveis (Caddick et al., 1994; Marzluf, 1997). Entre os compostos secundários, o nitrato inorgânico é uma excelente fonte utilizável por muitos fungos filamentosos. Seu transporte para o meio intracelular é mediado pela permease do nitrato, e após sua assimilação, ocorre a redução seqüencial do nitrato a nitrito e do nitrito a amônio, catalisada, respectivamente, pelas enzimas nitrato e nitrito redutase. O amônio é considerado o ponto de partida para o metabolismo anabólico do nitrogênio em fungos e a sua incorporação em moléculas orgânicas é, então, realizada por dois sistemas: glutamato desidrogenase (GDH) ou glutamina sintase (GS)/ Glutaminaamida: 2-oxoglutarato amino transferase (GOGAT), que produzem glutamato e glutamina (Griffin, 1994) (Figura 1). A enzima nitrato redutase de fungos é um grande complexo multiredox, que possui

duas subunidades idênticas, cada uma composta de três grupos prostéticos em domínios separados. Na extremidade C-terminal, localiza-se o domínio FAD, mais ao 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 e molibdênio e, então, para o nitrato. A especificidade pelo doador de elétrons é utilizada para classificar as nitrato redutases eucarióticas em 3 grupos: NADH-específica (EC 1.6.6.1), que está presente na maioria das plantas superiores e em algumas algas, NADPH-específica (EC 1.6.6.2), que é encontrada em fungos e NAD(P)H-biespecífica, que é encontrada em algumas plantas e em algumas algas (Losada, 1976; Shen et al., 1976; Renosto et al., 1982).

Em 1989, foi descrito o isolamento do primeiro gene da nitrato redutase de fungos filamentosos utilizando-se o organismo modelo *Aspergillus nidulans* (Malardier et al., 1989). Desde então, genes que codificam para a enzima nitrato redutase vêm sendo clonados e seqüenciados em diversas espécies de fungos filamentosos representados por organismos modelos de estudos genéticos em eucariotos, espécies com potencial de aplicação industrial ou com importância fitopatológica e micorrízica. O interesse na clonagem desse gene é baseado, principalmente, no estabelecimento de protocolos de transformação genética cujo valor biotecnológico é muito importante por representar um método de seleção geral e conveniente. Mas, além

de marca de seleção para transformação, esse gene também pode ser utilizado para estudos de organização e regulação gênica, análises filogenéticas, obtenção de mutantes, estudos de grupos de compatibilidade vegetativa e como isca para detecção e isolamento de elementos transponíveis. Baseado nesse contexto, este trabalho tem como objetivo apresentar resultados que contribuam para esse potencial multifuncional do gene da nitrato redutase em fungos filamentosos. Mesmo que, muitas vezes, dentro de uma mesma espécie, esse gene possa não ser utilizado com toda essa potencialidade, ele representa uma das maiores versatilidades de uso na micologia molecular.

Organização dos genes de assimilação do nitrato

O seqüenciamento e a comparação das seqüências de genes que codificam para nitrato redutase têm contribuído para estudos de organização gênica em fungos filamentosos, sendo esses estudos imprescindíveis para o conhecimento de características importantes como número e tamanho de íntrons, seqüências envolvidas com mecanismo de *splicing*, tamanho de regiões promotoras, ligação de genes e sentido da transcrição entre genes ligados. Um quadro comparativo da organização gênica entre os genes da nitrato redutase de 16 diferentes espécies de fungos filamentosos é apresentado na Figura 2.

A análise de seqüências do gene da nitrato redutase revela a ausência de íntrons nos fungos *Ustilago maydis*

(Banks et al., 1993) e *Botryotinia fuckeliana* (Levis et al., 1997a) e um máximo de 12 íntrons para *Hebeloma cylindrosporium* (Jargeat et al., 2000). Em *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *Penicillium chrysogenum* e *P. griseoroseum*, ocorre a presença de 6 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, 2001). Em *Leptosphaeria maculans* e *Stagonospora nodorum*, esse gene é interrompido por 4 íntrons que correspondem aos íntrons II, III, IV e VI de *Aspergillus Penicillium* (Williams et al., 1994; Cutler et al., 1998), enquanto em *Beauveria bassiana* (número de acesso no Genbank X84950), *Fusarium oxysporum*, *Gibberella fujikuroi*, *Metarbizium anisopliae* (número de acesso no Genbank AJ001141) e *Neurospora crassa*, apenas 1 íntron está presente na mesma posição do íntron VI de *Aspergillus* e *Penicillium* (Okamoto et al. 1991; Dirolez et al., 1993; Tudzynski et al., 1996). O gene da nitrato redutase de *H. cylindrosporium* parece ser o único que possui íntrons (11 e 12) na região correspondente ao domínio FAD (Jargeat et al., 2000). Pode-se observar na Figura 2 que o tamanho médio dos íntrons é de, aproximadamente, 58 pares de bases (pb), sendo o menor de 46 pb e o maior de 92 pb. Na grande maioria das vezes, esses íntrons não apresentam similaridade a não ser nas seqüências envolvidas com o processo de sua retirada (*splicing*). Os íntrons encontrados

nos genes que codificam a nitrato redutase em eucariotos não interrompem a seqüência codificadora em éxons com os respectivos domínios funcionais da enzima, sendo que a maioria deles parece estar dentro e não entre os domínios funcionais (Zhou e Kleinhofs, 1996). A localização dos íntrons é conservada dentro de fungos, algas e plantas superiores, em relação a genes para nitrato redutase, mas, mesmo assim, difere entre esses grupos. Em algas, os genes da nitrato redutase de *Chlamydomonas reinhardtii* e *Volvox carteri* possuem 15 e 9 íntrons, respectivamente, localizados nos domínios molibdênio, heme e FAD. A posição de 8 dos 10 íntrons em *Volvox* é idêntica à de *Chlamydomonas*. Os quatro íntrons presentes em *Oryzae sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Lypersicon esculentum* e *Nicotiana tobacum* estão localizados, precisamente, na mesma posição (Zhou e Kleinhofs, 1996). Com base no número e na posição dos íntrons presentes nos genes da nitrato redutase de fungos filamentosos, algas e plantas, Zhou e Kleinhofs (1996) não puderam afirmar se, durante a evolução, os íntrons foram incorporados (*gain hypotheses*) ou perdidos (*loss hypotheses*). Então, os íntrons podem ter sido inseridos no gene da nitrato redutase após a divergência entre fungos e plantas, ou o ancestral desses grupos possuía todos os íntrons e esses foram perdidos independentemente após a divergência. Ainda, segundo esses autores, a hipótese de embaralhamento de éxons (*exon shuffling*), em que as seqüências que codificam regiões estruturais ou funcionais da proteína estariam delimitadas por íntrons, não parece se aplicar a esse caso, pois as seqüências que codificam os domínios funcionais das proteínas nitrato redutase apenas são separadas por íntrons em *H. cylindrosporium* (íntron 9 entre domínios molibdênio e heme).

Além dos íntrons, a organização dos três genes relacionados com a assimilação do nitrato em fungos filamentosos pode ser separada em, pelo menos, quatro grupos diferentes (de A a D). No grupo A, os três genes estão ligados, mas os genes da nitrato e nitrito redutase são transcritos em direções opostas, sendo o gene do transportador transcrito na mesma

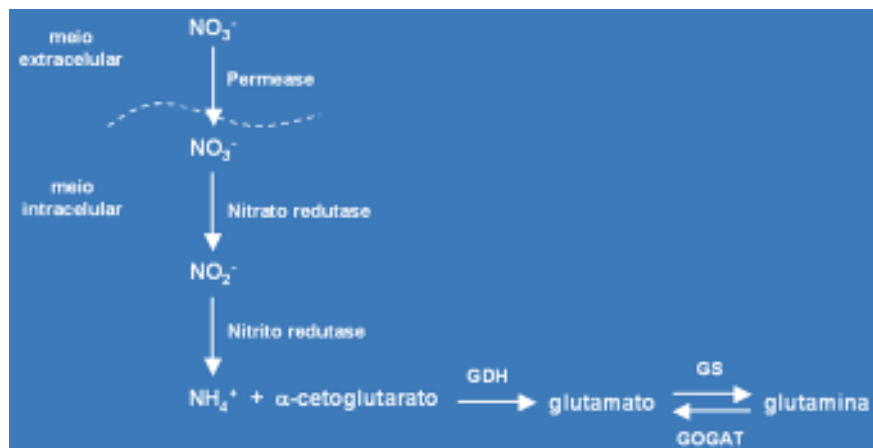


Figura 1 - Assimilação de nitrato em fungos filamentosos.

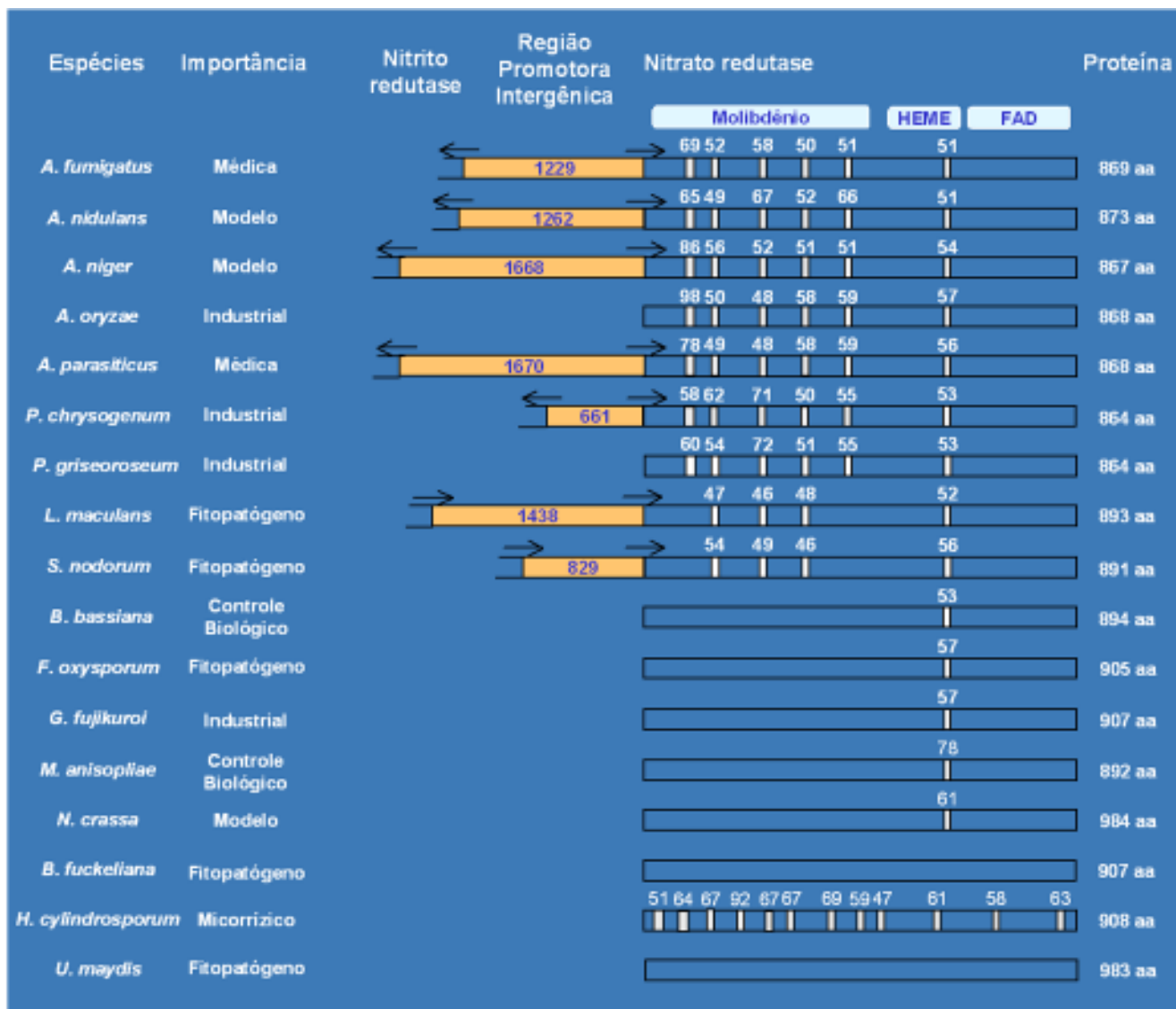


Figura 2 - Comparação da organização dos genes de assimilação do nitrato em fungos filamentosos. Em alaranjado, a região promotora intergênica dos genes nos quais foram relacionadas ligação entre nitrito e nitrato redutase. As setas representam o sentido da transcrição nesses genes. As caixas abertas indicam a região estrutural com tamanho e posição dos íntrons em relação às regiões codificadoras dos domínios molibdênio, heme e FAD. O tamanho da região promotora e dos íntrons é dado em pares de bases. O número de aminoácidos das respectivas proteínas é dado à direita.

direção da nitrito redutase. Essa organização é encontrada em *A. nidulans*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus* e *P. chrysogenum* (Johnstone et al., 1990; Unkles et al., 1992; Chang et al., 1996; Amaar e Moore, 1998; Haas e Marzluf, 1995). O tamanho da região intergênica é de 1.262 pb em *A. nidulans* (Johnstone et al., 1990), 1.668 pb em *A. niger* (Unkles et al., 1992), 1.670 pb em *A. parasiticus* (Chang et al., 1996), 1.229 pb em *A. fumigatus* (Amaar e Moore, 1998) e 661 pb em *P. chrysogenum* (Haas e Marzluf, 1995). No grupo B, os três genes também estão ligados, mas o gene do transportador está entre os genes da nitrato e da nitrito redutase, sendo transcritos na mesma direção descrita no grupo

A. Essa organização é encontrada em *H. cylindrosporium* (Jargeat et al., 2003). No grupo C, os genes da nitrato e da nitrito redutase estão ligados, são transcritos na mesma direção, mas o gene do transportador não está ligado, como é observado em *L. maculans* e *S. nodorum* (Williams et al., 1994; Cutler e Caten, 1999). O tamanho da região intergênica é de 1.438 pb em *L. maculans* (Williams et al., 1994) e 829 pb em *S. nodorum* (Cutler e Caten 1999). No grupo D, apesar da posição do transportador ainda não ter sido determinada, os três genes não parecem estar ligados, como ocorre em *Neurospora crassa* (Exley et al., 1993) e em *Gibberella fujikuroi* (Tudzynski et al., 1996).

Regulação do gene da nitrato redutase

As maiores contribuições para o conhecimento da regulação do metabolismo do nitrogênio em fungos filamentosos baseiam-se nos trabalhos realizados com os organismos *A. nidulans* e *Neurospora crassa* (Caddick et al., 1994; Marzluf, 1997), sendo que, nos últimos anos, estudos também têm sido relatados para outras espécies como, por exemplo, *Penicillium chrysogenum* (Haas e Marzluf, 1995; Haas et al., 1996).

A utilização de fontes de nitrogênio secundárias é controlada de maneira positiva e negativa, existindo um sistema de controle global e um

específico. A desrepressão de mais de 100 genes estruturais, incluindo, por exemplo, genes que codificam transportadores de aminoácidos, transportadores de purinas, proteases extracelulares e enzimas catabólicas, é dependente da presença do indutor e da ausência de fontes preferenciais de nitrogênio (amônio e glutamina). Essa desrepressão é realizada tanto pelo regulador global positivo *areA* em *A. nidulans* e seus correspondentes *nit-2* em *N. crassa* e *nre* em *P. chrysogenum*, quanto por reguladores específicos. O gene *areA* codifica uma proteína reguladora de 876 resíduos de aminoácidos que contém um único domínio de ligação ao DNA, o qual reconhece e se liga a seqüências que contêm o core GATA (Kudla et al., 1990; Langdon et al., 1995). As proteínas AREA, NIT-2 e NRE possuem somente 30% de homologia, mas, considerando apenas o domínio de ligação ao DNA, a identidade é de 98% (Haas e Marzluf, 1995). Em AREA, o domínio de ligação ao DNA é constituído por um único dedo de Zn com quatro cisteínas, seguido de um domínio terminal básico, que apresenta uma estrutura compacta formada por dois pares de folhas- β seguidas por uma α -hélice e uma cauda não estruturada. As cadeias laterais ao dedo de Zn fazem contato altamente hidrofóbico no sulco maior da molécula de DNA e a cauda carboxi-terminal faz contato com o esqueleto de fosfato (Scazzocchio, 2000). Elementos com, pelo menos, duas cópias de seqüências GATA, que podem estar na mesma direção, ou em direções opostas, e com espaço de, pelo menos, 30 pb, são considerados fortes sítios de ligação para NIT-2 (Chiang e Marzluf, 1994). Para *P. chrysogenum*, Haas e Marzluf (1995) descreveram fortes sítios de ligação de NRE 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 demonstraram ser fortes sítios de ligação NRE (Haas e Marzluf, 1995). Para *A. parasiticus*, Chang et al. (2000) relataram a ligação de AREA a segmentos de 42 pb da região promotora dos genes da nitrato e da nitrito redutase que continham um ou dois elementos GATA.

Outro gene importante para o metabolismo do nitrogênio é o *nmr* (do inglês *nitrogen metabolism repressor*), que atua de maneira negativa, reprimindo a síntese de vários genes. O gene *nmr* codifica uma proteína de 54,8 kDa, que 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), impedindo a ação dessa proteína, sendo a glutamina o possível sinal para essa ligação (Xiao et al., 1995). Pelo menos para AREA, ainda existem outros dois níveis de regulação: a transcrição de *areA* é auto-regulada e a estabilidade do mRNA de *areA* é menor em células que crescem em fontes de nitrogênio preferenciais (Platt et al., 1996). Dessa forma, na presença de fontes preferenciais, além de uma menor estabilidade do mRNA do gene *areA*, o regulador NMR se liga à proteína AREA já sintetizada e impede que essa proteína se ligue aos promotores e induza a transcrição dos genes relacionados com o metabolismo de fontes secundárias de nitrogênio. Assim, a célula assegura a assimilação de nitrogênio a partir de compostos que são prontamente metabolizáveis.

A indução do gene da permease do nitrato e dos genes da nitrato redutase (*niaD* para *Aspergillus* sp. e *P. chrysogenum* ou *nit-3* para *N. crassa*) e nitrito redutase (*niiA* para *Aspergillus* sp. e *P. chrysogenum* ou *nit-6* para *N. crassa*) requer síntese *de novo*, sendo necessária a ausência das fontes preferenciais e a presença de nitrato como indutor. Nesse caso, além do fator de regulação global, é necessária a presença de um fator específico chamado *nirA* em *A. nidulans* e *nit-4* em *N. crassa* (Caddick et al., 1994; Marzluf, 1997). A proteína NIRA liga-se ao DNA a partir de um domínio na sua região amino-terminal (Burger et al., 1991). Essa proteína se liga à seqüência 5'-CTCCGHGG-3', sendo que foram detectados sítios putativos ou já comprovados para essa proteína em várias espécies de ascomicetos (Punt et al., 1995). Para o reconhecimento de cis-elementos e expressão do gene *nit-3* em *N. crassa* (Feng e Marzluf, 1998), é requerida uma interação

específica entre os fatores de regulação NIT-2 e NIT-4. Em *N. crassa*, um acúmulo máximo de mRNA de *nit-3* ocorre apenas 15 minutos após a indução por nitrato, sendo que o acúmulo máximo de proteína ocorre após 60 minutos, e em *P. chrysogenum* transcritos de *niaD* são detectados com 15 minutos de indução, e atingem um nível máximo após 60 minutos (Okamoto et al., 1991; Haas et al., 1996). Até a presente data, a única exceção é o basidiomiceto *H. cylindrosporium*, onde o gene da nitrato redutase possui alto nível de transcrição na presença de nitrato, uréia, serina e glicina, sendo possível, neste caso, a inexistência de fatores de regulação específicos. Entretanto, na presença de amônio, ocorre uma forte, mas incompleta, repressão desse gene, indicando a existência de um sistema de regulação geral (Jargeat et al., 2000). Recentemente, foi reportado, para *H. cylindrosporium*, que a transcrição dos genes da permease do nitrato e da nitrito redutase também não é induzida por nitrato, mas é completamente reprimida por amônio (Jargeat et al., 2003).

Relações filogenéticas baseadas na proteína nitrato redutase

Apesar da proteína nitrato redutase apresentar regiões comprovadamente importantes para seu funcionamento, outras regiões parecem poder sofrer variação sem acarretar perda de funcionalidade para a proteína. A região N-terminal e 2 regiões curtas, entre os domínios molibdênio e heme e heme e FAD, apresentaram menor identidade entre 17 outras proteínas nitrato redutase de plantas, algas e fungos quando foram comparadas por Zhou e Kleinhofs (1996). Essa característica de apresentar regiões conservadas que flanqueiam regiões que podem sofrer variação é interessante para estudos de filogenia. Esses mesmos autores verificaram que o gene da nitrato redutase pode ser utilizado como relógio molecular, pois genes de diferentes espécies evoluem em uma taxa constante, e, baseados nesse gene, estimaram o tempo de divergência entre fungos e plantas, em torno de 1 bilhão de anos e, entre algas e plantas superiores, em torno de 750

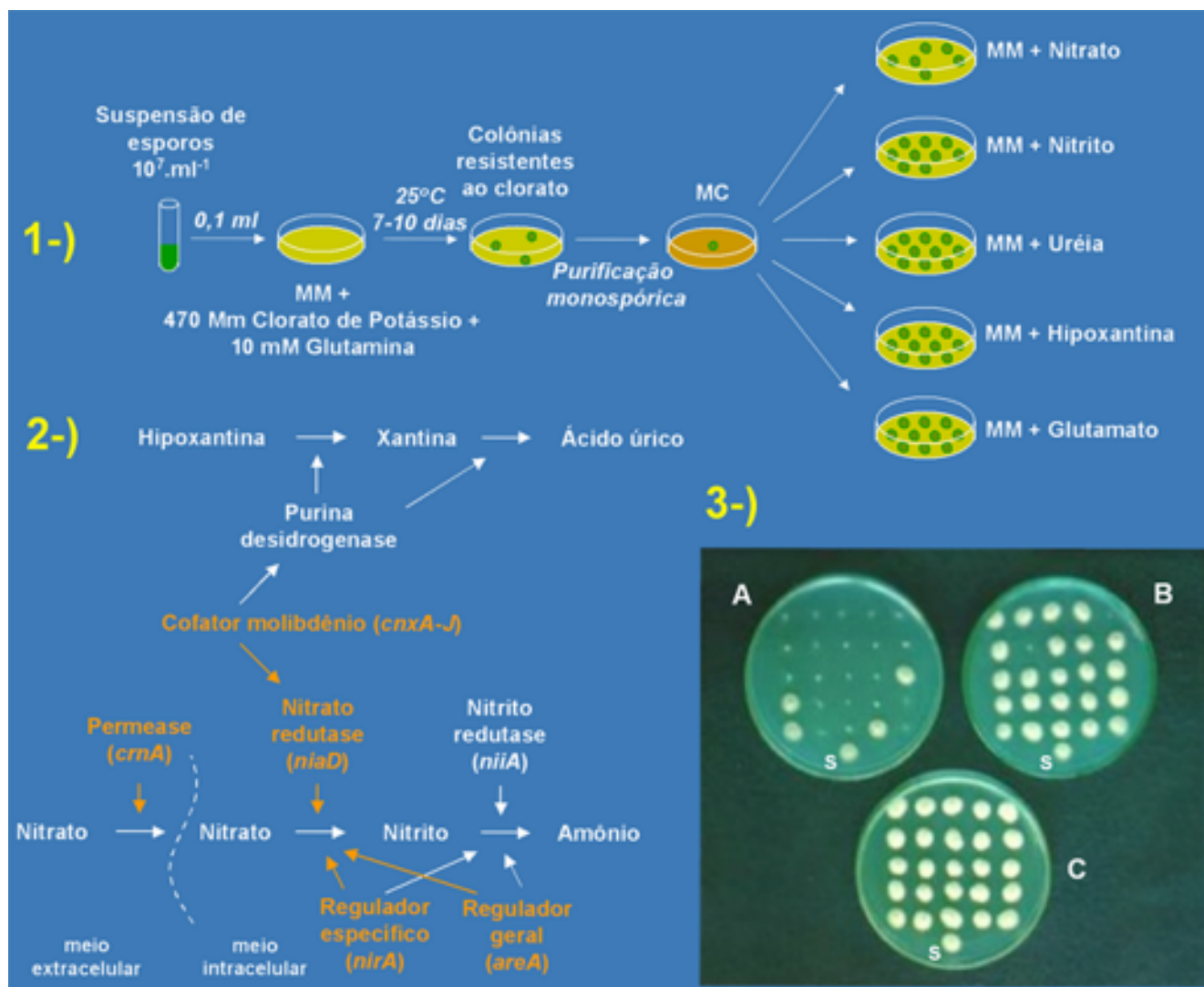


Figura 4 - Obtenção de mutantes nitrato redutase. 1-) Esquema do protocolo para obtenção de mutantes resistentes ao clorato e testes de crescimento para anotação da mutação; 2-) Vias metabólicas envolvidas com o fenótipo de resistência ao clorato (possíveis genes mutados são mostrados em laranja); 3-) Fenótipo de crescimento em placas contendo MM + nitrato (A), MM + nitrito (B) e MM + hipoxantina (C) de mutantes de *Penicillium griseoroseum* resistentes ao clorato. Colônias que não crescem em A mas crescem em B e C são mutantes nitrato redutase; S indica o tipo selvagem utilizado como controle positivo.

sibilite a célula de expressar a enzima nitrato redutase; (iii) mutação no gene do regulador geral da assimilação de nitrogênio (*areA*), que também impossibilite a célula de expressar a enzima nitrato redutase; (iv) mutação em algum gene envolvido na biosíntese do cofator molibdênio

(*cnxA-J*), que, não estando presente, torna ineficazes a enzima nitrato redutase e outras enzimas dependentes desse cofator; e (v) mutação no próprio gene da nitrato redutase (*niaD*), impossibilitando a célula de sintetizar essa enzima (Cove, 1976; Cove, 1979). Dessa forma, após a

obtenção das colônias resistentes ao clorato, é necessário fazer uma discriminação do fenótipo mutante por meio de um fácil teste de crescimento em meio mínimo contendo as seguintes fontes de nitrogênio: nitrato, nitrito, hipoxantina, glutamato e amônio. O crescimento ou não nes-

Tabela 1 - Testes de crescimento de mutantes resistentes ao clorato, em diferentes fontes de nitrogênio.

Mutação	Designação do mutante*	Testes de crescimento					
		Clorato	Nitrato	Nitrito	Hipoxantina	Glutamato	Amônio
Nenhuma	Selvagem	-	+	+	+	+	+
Nitrato redutase	<i>niaD</i>	+	-	+	+	+	+
Regulador específico	<i>nirA</i>	+	-	-	+	+	+
Cofator molibdênio	<i>cnxA-J</i>	+	-	+	-	+	+
Regulador geral	<i>areA</i>	+	-	-	-	-	+
Permease	<i>crnA</i>	+	+	+	+	+	+

* denominação dos genes para *Aspergillus nidulans*; + indica crescimento e - indica ausência de crescimento.

sas diferentes fontes (Tabela 1) é, então, correlacionado com a mutação em um dos cinco possíveis genes acima relacionados (Figura 4). Como em todas as espécies de fungos filamentosos estudadas até o momento, apenas uma cópia funcional do gene da nitrato redutase foi encontrada, mutantes nitrato redutase são reportados com alta frequência.

A razão do teste de crescimento em hipoxantina é que, além do requerimento por NAD(P)H, as enzimas nitrato redutase são dependentes de uma molécula chamada cofator molibdênio. A ausência desse cofator impossibilita a célula de utilizar o nitrato como também purinas como adenina, hipoxantina e xantina como única fonte de nitrogênio. Os mutantes incapazes de crescer em nitrato e hipoxantina apresentam uma perda pleiotrópica da atividade das enzimas nitrato redutase e xantina desidrogenase, respectivamente. Como esses mutantes são defectivos na síntese de um cofator comum, tanto para a nitrato redutase como para xantina desidrogenase, os genes envolvidos na síntese desse cofator foram denominados *cnx* (do inglês *common component for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase*) (Pateman et al., 1964; Cove, 1979). Por meio de testes de complementação entre diferentes mutantes, Pateman et al. (1964) reportaram a existência de vários *loci* (*cnx ABC, E, F, G e H*) relacionados com vários genes responsáveis pela produção do cofator molibdênio, e Arst et al. (1982) relataram a existência de outro *locus* (*cnxJ*). Unkles et al. (1997) comprovaram que o *locus cnxABC* é parte de um único gene que codifica uma proteína com dois domínios catalíticos requeridos para a síntese de um intermediário do cofator molibdênio.

Um protocolo para obtenção de mutantes deficientes na enzima nitrato redutase é apresentado a seguir e está esquematizado na Figura 4. Esse protocolo baseia-se em espécies que apresentam reprodução assexuada e/ou sexual possibilitando o uso de esporos na análise. Como na grande maioria das espécies de fungos filamentosos os esporos são uninucleados e contêm genoma haplóide, a mutação é expressa sem

efeito de dominância. Mesmo assim, algumas espécies de fungos não produzem esporos *in vitro*, e esse protocolo pode ser modificado para obtenção de mutantes por intermédio de fragmentos de micélio, onde setores resistentes ao clorato apresentam crescimento mais vigoroso. Entretanto, em algumas espécies de fungos, a resistência ao clorato parece ser natural, o que impossibilita a obtenção de mutantes por essa técnica.

Protocolo para obtenção de mutantes nitrato redutase (segundo Cove, 1976; Cove, 1979; Unkles et al., 1989):

- Preparar uma suspensão de esporos em tween 80 0,05% contendo cerca de 10^7 .ml⁻¹ esporos;
- Plaquear 0,1 ml dessa solução em meio mínimo (MM) sólido (Pontecorvo et al., 1953) sem nitrato e acrescido de 470 mM de clorato de potássio e 10 mM de glutamato de sódio (clorato de potássio 57,6 g; glutamato de sódio monobásico 1,87 g; KH₂PO₄ 1,5 g; KCl 0,5 g; MgSO₄ 0,5 g; FeSO₄ 0,01 g; ZnSO₄ 0,01 g; glicose 10 g; ágar 15 g; água destilada 1.000 ml; pH 6,8);
- Incubar as placas a 25°C por cerca de 7 a 10 dias;
- Transferir as colônias resistentes ao clorato para placas contendo meio completo (MC) sólido, Pontecorvo et al. (1953) modificado por Azevedo e Costa (1973) [meio mínimo adicionado de peptona 2,0 g; caseína hidrolisada 1,5 g; extrato de levedura 2,0 g; solução de vitaminas 1,0 ml; (biotina 0,2 mg; ácido p-aminobenzóico 10,0 mg; piridoxina 50,0 mg; tiamina 50,0 mg; ácido nicotínico 100,0 mg; riboflavina 100,0 mg; água destilada 100 ml); ágar 15 g; água destilada 1.000 ml; pH 6,8];
- Fazer purificação monospórica dos mutantes;
- Inocular as colônias resistentes em placas de MM contendo 10 mM das seguintes fontes de nitrogênio : nitrato de sódio, nitrito de sódio, cloreto de amônio, hipoxantina e glutamato de sódio;
- Incubar a 25°C por 3 a 5 dias;

- Verificar o crescimento e anotar os fenótipos mutantes;
- Separar e identificar os mutantes nitrato redutase.

Assim, o sistema nitrato redutase apresenta vantagens sobre outros sistemas, como a fácil obtenção de mutantes espontâneos por seleção positiva via resistência ao clorato, e, como não há emprego de mutagênese, a possibilidade de mutações secundárias que atinjam genes importantes ou de interesse é reduzida. Também esses mutantes apresentam um único fenótipo desejável, não utilizar nitrato como única fonte de nitrogênio, sendo que esse fenótipo é dispensável sem alterar o crescimento ou fluxos metabólicos importantes.

Utilização de mutantes deficientes na utilização do nitrato em estudos de grupos de compatibilidade vegetativa

Isolados de uma espécie fúngica podem ser caracterizados pela compatibilidade ou incompatibilidade vegetativa. A compatibilidade ocorre quando micélios de diferentes isolados podem sofrer anastomoses e originar heterocários (hifas que contêm núcleos geneticamente diferentes), enquanto a incompatibilidade ocorre quando não há formação de heterocários. Nem sempre é possível formar essas anastomoses, principalmente quando os cruzamentos são interespecíficos ou intergenéricos, pois o fator determinante da interação entre as células pode estar na parede celular manifestando-se como bloqueio da fusão celular (Peberdy, 1991). Os isolados que apresentem compatibilidade podem ser colocados dentro de um mesmo grupo, formando um grupo de compatibilidade vegetativa (GCV). Em fungos de reprodução assexuada, isolados de um mesmo GCV são mais similares geneticamente que isolados de diferentes GCV.

A heterocariose também é a primeira etapa para que fungos assexuados troquem material genético por meio de um ciclo alternativo chamado parassexual. Nesse ciclo, os diferentes núcleos no heterocáριο se fundem, originando diplóides he-

terozigotos, e, a seguir, ocorre a produção de recombinantes por meio de recombinação mitótica e haploidização (Pontecorvo & Roper, 1952).

A detecção de heterocários pode ser alcançada pelo cruzamento de indivíduos portadores de diferentes mutações. Quando são formadas anastomoses entre as hifas desses diferentes mutantes, o heterocáριο pode ser visualizado já que o núcleo de um indivíduo contém o gene selvagem que complementa a mutação do outro. As diferentes mutações podem estar relacionadas, por exemplo, à coloração da colônia, mas a obtenção de mutantes por técnicas de mutagênese tradicionais é muito trabalhosa, o que torna esse procedimento difícil de ser empregado para estudo com muitos isolados de campo. Assim, vários trabalhos reportam o estudo de GCVs utilizando mutações auxotróficas que incapacitem a célula de utilizar nitrato como única fonte de nitrogênio (Puhala, 1985; Correl et al., 1986; Brooker et al., 1991). Nesses estudos, é suficiente fazer a triagem de populações utilizando indivíduos que contenham mutações únicas em diferentes genes da assimilação do nitrato, que possam ser testados para a sua habilidade de complementar as mutações e de formar heterocáριο em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. Como o isolamento de mutantes resistentes ao clorato gera mutações de diferentes tipos, essas mutações podem ser utilizadas como marcas de seleção para a formação dos heterocários. Assim, esse sistema torna-se simples e rápido para ser utilizado para essa finalidade.

Estudos de compatibilidade vegetativa são de particular interesse em fungos que se reproduzem assexuadamente, já que os indivíduos dentro de um GCV podem trocar informações genéticas por meio de heterocariose e de ciclo parassexual. Em fungos fitopatogênicos, os GCVs podem ser correlacionados com a patogenicidade, embora essa correlação não esteja sempre ligada. Puhalla (1985) utilizou mutantes deficientes na assimilação de nitrato para testar a compatibilidade vegetativa entre 21 isolados de *F. oxysporum*, reportando que membros do mesmo GCV pertenciam à mesma *formae*

speciales. Correl et al. (1986) também utilizaram mutantes incapazes de metabolizar nitrato em testes de compatibilidade vegetativa para identificar *F. oxysporum* f. sp. *apii* raça 2 de uma população de raças de *F. oxysporum* que colonizava raízes de aipo. Assim, o teste de compatibilidade vegetativa é uma ótima ferramenta para estudos de diversidade genética constituindo marcadores genéticos naturais que podem ser utilizados para diferenciar isolados. Além disso, em fungos que se reproduzem sexuadamente, esses estudos também são importantes para determinar genes relacionados com o tipo sexual (*mating type*), importantes no reconhecimento e desenvolvimento do ciclo sexual.

Transformação genética baseada no gene da nitrato redutase

Um dos principais passos no desenvolvimento de uma tecnologia para manipulação e análise molecular de um organismo é o estabelecimento de um protocolo que permita introduzir seqüências de DNA clonadas em uma linhagem recíprota. A disponibilidade de um sistema de transformação oferece possibilidade de adição e de deleção de rotas metabólicas em um organismo de interesse, alterando o fenótipo selvagem para uma aplicação específica. As seqüências a serem introduzidas têm interesses distintos, dependendo do tipo de organismo estudado. Dessa forma, o principal objetivo da clonagem de genes que codificam nitrato redutase é o estabelecimento de protocolos de transformação baseados na complementação de mutações no gene da nitrato redutase. Nesse ponto, além das vantagens inerentes a esse sistema, outra característica importante é ser baseado na complementação de uma mutação auxotrófica, o que evita a introdução de genes de seleção baseados na resistência a drogas.

A transformação é realizada pela introdução do gene da nitrato redutase em um mutante nitrato redutase por biobalística ou *Agrobacterium tumefaciens*, sendo que o método mais comum é o da transformação de protoplastos pela técnica do polietilenoglicol (PEG)/CaCl₂. Após a trans-

formação, os protoplastos são plaqueados por *pour-plate* em meio mínimo contendo estabilizador osmótico e nitrato como única fonte de nitrogênio. Apenas aquelas células mutantes onde o gene da nitrato redutase se integrar, serão capazes de crescer (Figura 5). Para tanto, pode-se utilizar um gene da nitrato redutase já isolado de um organismo em uma espécie de interesse. Quando o gene é de uma espécie diferente da espécie receptora, o sistema é dito heterólogo, e quando o gene foi isolado do organismo receptor, o sistema é dito homólogo.

Nos sistemas heterólogos, geralmente há baixa similaridade entre o vetor de transformação e o genoma do organismo receptor, o que resulta em baixa freqüência de transformação, integração aleatória e alto número de cópias do vetor. Esse padrão de integração aleatório pode ser interessante para obtenção de mutantes pela técnica de REMI (do inglês *restriction enzyme-mediated integration*), descrita por Schiestl e Petes (1991), que é uma variação da técnica de transformação, onde enzima de restrição é adicionada à mistura de transformação juntamente com o plasmídeo linear. Queiroz et al. (1998) verificaram que o gene da nitrato redutase de *F. oxysporum* se integrava aleatoriamente no genoma de *P. griseoroseum*, sendo essa característica utilizada por Soares (2002) para obtenção de mutantes de *P. griseoroseum* pela técnica de REMI.

Mesmo assim, sistemas de transformação homólogos têm sido desenvolvidos para vários fungos filamentosos, incluindo *A. oryzae* (Unkles et al., 1989), *Cephalosporium*

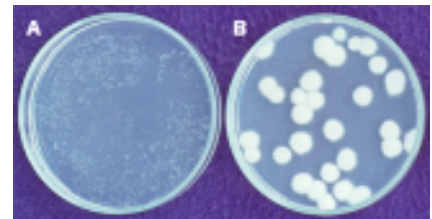


Figura 5 - Seleção de transformantes baseada no gene da nitrato redutase. Placas com meio mínimo contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. (A) Controle negativo - protoplastos do mutante nitrato redutase que não foram transformados; (B) protoplastos do mesmo mutante que foram transformados com gene homólogo da nitrato redutase.

acremonium (Whithead et al., 1990), *P. chrysogenum* (Gouka et al., 1991), *Fusarium oxysporum* (Diolez et al., 1993), *G. fujikuroi* (Tudzynski et al., 1996), *B. cinerea* (Levis et al., 1997a), *S. nodorum* (Cutler et al., 1998) e *P. griseoroseum* (Pereira, 2001). Na literatura, existem relatos para *A. oryzae* (Unkles et al., 1989) e *S. nodorum* (Cutler et al., 1998) de 100% de integração do vetor no locus da nitrato redutase, sendo que nesses estudos foram analisados 22 transformantes para *A. oryzae* e 13 transformantes para *S. nodorum*. Para *B. cinerea* (Levis et al., 1997a), a análise de 36 transformantes revelou 34 integrações homólogas, sendo 29 eventos de troca gênica. Mesmo que a utilização de genes homólogos aumente a probabilidade de ocorrência de integração em sítios homólogos, para fungos filamentosos e outros organismos eucariotos, parecem ser mais comuns eventos de integração heteróloga. Sistemas de transformação homólogos, baseados na complementação de mutações nitrato redutase, desenvolvidos para *Cephalosporium acremonium* (Whitehead et al., 1990) e *P. chrysogenum* (Gouka et al., 1991) resultam, na maioria dos transformantes, na integração do vetor em sítios diferentes do locus da nitrato redutase, enquanto que *G. fujikuroi* (Tudzynski et al., 1996) e *F. oxysporum* (Diolez et al., 1993) ocorreu um número similar de integrações, dentro e fora desse locus.

Um sistema de transformação com alta incidência de integração homóloga, especialmente troca gênica, pode ser utilizado para estudos de regiões importantes, tanto em nível de regulação como em nível estrutural. Assim, mutações geradas *in vitro*, como alteração dos sítios de ligação de proteínas reguladoras, podem ser introduzidas e avaliadas *in vivo* no exato local onde reside o gene. Além disso, essa alta taxa de integração homóloga é interessante em experimentos de co-transformação, pois diminui a probabilidade de integrações em sítios heterólogos que sejam importantes para o metabolismo celular e/ou de interesse biotecnológico.

Vários trabalhos relatam a utilização de vetores de transformação que carregam o gene da nitrato

redutase como marcadores de seleção em experimentos de co-transformação para introduzir genes de interesse biotecnológico. Por exemplo, Ribeiro (2001) relatou a obtenção de transformantes com até 89% de aumento na produção de poligalacturonase quando co-transformou um mutante nitrato redutase de *P. expansum* com o plasmídeo pPE 15, que carrega o gene homólogo de poligalacturonase, e o plasmídeo pNH24, contendo o gene da nitrato redutase de *F. oxysporum* como marcador de seleção. Linhagens transformantes de *A. oryzae* apresentaram a produção de poligalacturonase aumentada em até 3,2 vezes quando transformadas com um gene de poligalacturonase de *Penicillium janthinellum*, sendo os transformantes selecionados pela complementação de uma mutação nitrato redutase (Ishida et al. 1997). Cardoso et al. (2003) utilizaram o gene homólogo da nitrato redutase de *P. griseoroseum* para introduzir uma construção do gene da pectina liase e obtiveram transformantes com aumento expressivo na atividade dessa enzima.

Utilização do gene da nitrato redutase como vetor de expressão

Uma outra perspectiva na aplicação biotecnológica do gene da nitrato redutase é sua utilização como vetor de expressão. Isso é baseado nas análises de expressão onde são observadas grandes quantidades de transcrito do gene da nitrato redutase apenas poucos minutos após sua indução por nitrato (Okamoto et al., 1991; Haas et al., 1996), sendo esse indutor acessível e de baixo custo. Essa perspectiva é importante uma vez que muitos genes de valor biotecnológico somente são expressos na presença de um indutor específico que, muitas vezes, é oneroso e acarreta a inviabilidade da aplicação industrial. Para tanto, a região estrutural do gene de interesse pode ser clonada sob controle do promotor do gene da nitrato redutase, abrindo a possibilidade para a indução do gene por uma fonte mais acessível e apenas no momento em que o indutor estiver presente.

Uso da nitrato redutase para detecção e isolamento de elementos transponíveis

Elementos transponíveis são seqüências de DNA que podem se mover no genoma integrando-se em regiões não homólogas, e que constituem importantes agentes de mutação e reorganização gênica, sendo também utilizados em sistemas de inativação de genes. Assim, detectar e isolar esses elementos é um importante passo para estudos de biologia básica e aplicada em um organismo. Diferentes estratégias são empregadas para o isolamento de elementos transponíveis em fungos filamentosos. Entre essas diferentes estratégias, o método de armadilha para transposons (“*transposons trapping*”) é o melhor método para detecção e isolamento de elementos transponíveis ativos. Esse método requer, além de um sistema de seleção positiva de mutantes espontâneos, que o gene alvo esteja clonado e caracterizado. Conforme discutido anteriormente, um dos melhores sistemas para seleção positiva de mutantes espontâneos é o sistema nitrato redutase. Dessa maneira, esse sistema vem sendo empregado com muito sucesso para o isolamento de vários elementos transponíveis em fungos filamentosos. Os elementos *Fot1*, *impala*, *Ant1*, *Vader*, *Flipper* e *hupfer*, são exemplos de transposons clonados pela seleção de mutações espontâneas no gene da nitrato redutase em *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Botrytis cinerea* e *Beauveria bassiana* (Daboussi et al., 1992; Langin et al., 1995; Glayzer et al., 1995; Amutan et al., 1996; Levis et al., 1997b; Maurer et al., 1997).

Para isolar esses elementos utilizando-se o sistema nitrato redutase, é necessário isolar mutantes nitrato redutase e caracterizar, por hibridização com o gene alvo, o tipo de mutação que originou o fenótipo mutante. Nos mutantes isolados podem ocorrer mutações de diferentes tipos no gene da nitrato redutase, como, por exemplo, mutações pontuais, deleções ou inversões. Além

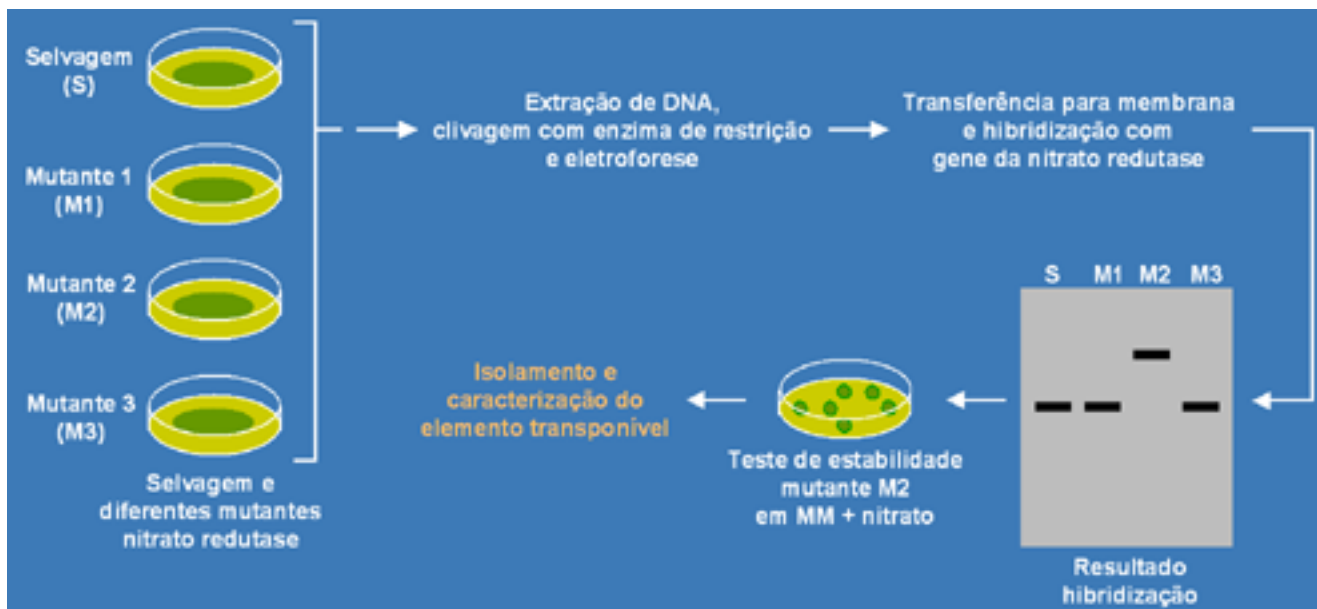


Figura 6 - Esquema da detecção e isolamento de elementos transponíveis utilizando o gene da nitrato redutase como isca.

desses tipos, também pode ocorrer a inserção de um fragmento de DNA, como a inserção de um elemento transponível. Assim, espera-se que o resultado da hibridização apresente algum mutante com o fragmento do gene alvo maior quando comparado ao tipo selvagem (Figura 6). Após a obtenção de um mutante com a inserção, pode-se fazer um teste de estabilidade plaqueando-se esporos do mutante em meio mínimo contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. Se a inserção for oriunda de um transposon ativo, esse pode saltar e reconstituir o fenótipo selvagem, apresentando maior instabilidade. O fragmento inserido, ou parte dele, pode ser recuperado por meio de bancos genômicos parciais ou de amplificação com oligonucleotídeos específicos e, então, seqüenciado e caracterizado.

Mesmo que o gene da nitrato redutase não tenha sido clonado para uma espécie de interesse, há possibilidade de usar um gene heterólogo conforme realizado com sucesso por Daboussi et al. (1992). Esses autores introduziram o gene da nitrato redutase de *A. nidulans* em uma linhagem mutante para nitrato redutase de *F. oxysporum* e isolaram o elemento *Fot1* inserido no gene heterólogo.

Assim, a fácil seleção de mutantes nitrato redutase têm-se mostrado uma ótima ferramenta no isolamento de elementos transponíveis ativos em diferentes espécies de fungos filamentosos.

Referências Bibliográficas

- Aberg B, 1947. On the mechanism of the toxic action of chlorates and some related substances upon young wheat plants. Kungl. Lantbruksakademien Ann. 15:37-107.
- Amaar YG, Moore MM, 1998. 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*. Curr. Genet. 33:206-215.
- Amutan M, Nyssönen E, Stubbs J, Dias-Torres MR, Dunn-Coleman N, 1996. Identification and cloning of a mobile transposon from *Aspergillus niger* var. *awamori*. Curr. Genet. 29:468-473.
- Arst HNJr, Tollervey DW, Sealy-Lewis, HM, 1982. A possibly regulatory gene for the molybdenum-containing cofactor in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 128:1083-1093.
- Azevedo JL, Costa SOP, 1973. Exercícios práticos de genética. São Paulo: ed. Nacional, EDUSP, 288 p.
- Banks GR, Shelton PA, Kanuga N, Holden DW, Spanos S, 1993. The *Ustilago maydis nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. Gene 131:69-78.
- Brooker NL, Leslie JF, Dickman MB, 1991. Nitrate non-utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. Phytopathol. 81:672-677.
- Burger G, Tilburn J, Scazzocchio C, 1991. Molecular cloning and functional characterization of the pathway-specific regulatory gene *nirA*, which controls nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. Mol. Cell. Biol. 11:795-802.
- Caddick MX, Peters D, Platt A, 1994. Nitrogen regulation in fungi. Antonie van Leeuwenhoek 64:169-177.
- Cardoso PG, Teixeira JA, Ribeiro JB, Queiroz MV, Araújo EF, 2003. Transformantes de *Penicillium griseoroseum* superprodutores de pectina liase. Anais do Congresso de Genética, Sociedade Brasileira de Genética, Águas de Lindóia, S.P.
- Chang PK, Ehrlich KC, Linz JEL, Bhatnagar D, Cleveland TE, Bennet JW, 1996. Characterization of the *Aspergillus parasiticus niaD* and *niiA* gene cluster. Curr. Genet. 30:68-75.
- Chang PK, Yu J, Bhatnagar D, Cleveland TE, 2000. Characterization of the *Aspergillus parasiticus* major nitrogen regulatory gene, *areA*. Biochim. Biophys. Acta 1491:263-266.
- Chiang TY, Marzluf GA, 1994. 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* 33:576-582.
- Correl JC, Puhala JE, Schneider, 1986. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* on the basis of colony, virulence, and vegetative compatibility. *Phytopathol.* 76:396-400.
- Cove DJ, 1976. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterization of chlorate resistant mutants. *Heredity* 36:191-203.
- Cove DJ, 1979. Genet studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biol. Rev.* 54:291-327.
- Cutler SB, Cooley RN, Caten CE, 1998. Cloning of the nitrate reductase gene of *Stagonospora (Septoria) nodorum* and its use as a selectable marker for targeted transformation. *Curr. Genet.* 34:128-137.
- Cutler SB, Caten CE, 1999. Characterization of the nitrite reductase gene (*NIII*) and the nitrate-assimilation gene cluster of *Stagonospora (Septoria) nodorum*. *Curr. Genet.* 36:282-289.
- Daboussi MJ, Langin T, Brygoo Y, 1992. *Fot1*, a new family of fungal transposable elements. *Mol. Gen. Genet.* 232:12-16.
- Dirolez A, Langin T, Gerlinger C, Brygoo Y, Daboussi MJ, 1993. The *nia* gene of *Fusarium oxysporum*: isolation, sequence and development of a homologous transformation system. *Gene* 131:61-67.
- Exley GE, Colandene JD, Garret RH, 1993. Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of *nit-6*, the structural gene for nitrite reductase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 175:2379-2392.
- Feng B, Marzluf GA, 1998. 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*. *Mol. Cell. Biol.* 18:3983-3990.
- Glayzer DC, Roberts IN, Archer DB, Oliver RP, 1995. The isolation of *Ant1*, a transposable element from *Aspergillus niger*. *Mol. Gen. Genet.* 249:432-438.
- Griffin DH, 1994. *Fungal Physiology*, WILEY-LISS, Nova York, N.Y.
- Gouka RJ, Hartingsveldt WV, Bovenberg RAL, Hondel CAMJJ, Gorcom RFM, 1991. Cloning of nitrate-nitrite reductase gene cluster of *Penicillium chrysogenum* and use of the *niaD* gene as a homologous selection marker. *J. Biotechnol.* 20:189-200.
- Haas H, Marzluf GA, 1995. 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. *Curr. Genet.* 28:177-183.
- Haas H, Marx F, Graessle S, Stöffler G, 1996. Sequence analysis and expression of the *Penicillium chrysogenum* nitrate reductase encoding gene (*niaD*). *Biochim. Biophys. Acta* 1309:81-84.
- Ingram PR, Homer NZM, Smith RA, Pitt AR, Wilson CG, Olejnik O, Spickett CM, 2003. The interaction of sodium chlorite with phospholipids and glutathione: a comparison of effects in vitro, in mammalian and in microbial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 410:121-133.
- Ishida Y, Kakibuchi K, Hirao Y, Izumori K, 1997. Cloning and characterization of a polygalacturonase-encoding gene from *Penicillium janthinellum*. *J. Ferment. Bioeng.* 84:257-260.
- Jargeat P, Gay G, Debaud JC, Marmeisse R, 2000. Transcription of a nitrate reductase gene isolated from the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporium* does not require induction by nitrate. *Mol. Gen. Genet.* 263:948-956.
- Jargeat P, Rejangalt D, Verner MC, Gay G, Debaud JC, Marmeisse R, Fraissinet-Tachet L, 2003. Characterisation and expression analysis of a nitrate transporter and nitrite reductase genes, two members of a gene cluster for nitrate assimilation from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporium*. *Curr. Genet.* 43:199-205.
- Johnstone IL, McCabe PC, Greaves P, Gurr SJ, Cole GE, Brow MAD, Unkles SE, Clutterbuck AJ, Kinghorn JR, Innis MA, 1990. Isolation and characterisation of the *crnA-niaA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 90:181-192.
- Kitamoto N, Kimura T, Kito Y, Ohmita K, Tsukagoshi N, 1995. The nitrate reductase gene from a shoyu koji mold, *Aspergillus oryzae* KBN616. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:1795-1797.
- Kudla B, Caddick MX, Langdon T, Martinez-Rossi NM, Bennett CF, Sibley S, Davis RW, Arst HNJr, 1990. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *EMBO J.* 9:1355-1364.
- Langdon T, Sheerins A, Ravagnani A, Caddick MX, Arst HNJr, 1995. Mutational analysis reveals dispensability of the N-terminal region of the *Aspergillus nidulans* transcriptional factor mediating nitrogen metabolite repression. *Mol. Microbiol.* 17:877-888.
- Langin T, Capy P, Daboussi MJ, 1995. The transposable element *impala*, a fungal member of the *Tc1-mariner* superfamily. *Mol. Gen. Genet.* 246:19-28.
- Levis C, Fortini D, Brygoo Y, 1997a. Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase (*niaD*) shows a high frequency of homologous recombination. *Curr. Genet.* 32:157-162.
- Levis C, Fortini D, Brygoo Y, 1997b. Flipper, a mobile *Fot1*-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Mol. Gen. Genet.* 254:674-680.
- Losada M, 1976. Metalloenzymes of the nitrate-reducing system. *J. Mol. Catalysis* 1:245-264.
- Malardier L, Daboussi MJ, Julien J, Roussel F, Scazzochio C, Brygoo Y, 1989. Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene*:78:147-156.
- Marzluf GA, 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the

- fungi. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61:17-32.
- Maurer P, Réjasse A, Capy P, Langin T, Riba G, 1997. Isolation of the transposable element *hupfer* from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by insertion mutagenesis of the nitrate reductase structural gene. Mol. Gen. Genet. 256:195-202.
- Okamoto PM, Fu YH, Marzluf GA, 1991. *Nit-3*, the structural gene of nitrate reductase in *Neurospora crassa*: nucleotide sequence and regulation of mRNA synthesis and turnover. Mol. Gen. Genet. 227:213-223.
- Pateman JA, Cove DJ, Rever BM, Roberts DB, 1964. A common cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis for nitrate reductase. Nature 201:58-60.
- Peberdy JF, 1991. Fungal protoplasts. In: Bennet, J. W. & Lasure, L. L. (Ed.) More Gene Manipulations in Fungi. Academic Press, INC., San Diego, California, p.307:319.
- Pereira JF, 2001. Caracterização e estudo da regulação do gene que codifica nitrito reductase em *Penicillium griseoroseum* e sua utilização como marcador de seleção para transformação homóloga. Tese de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 37 p.
- Platt A, Langdon T, Arst HJ Jr, Kirk D, Tollervey D, Sanchez JMM, Caddick MX, 1996. 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. EMBO J. 15:2791-2801.
- Pontecorvo G, Roper JA, 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploid in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 6:62-79.
- Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, MacDonald KD, Bufton AWJ, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet. 5:141-238.
- Punt JP, Strauss J, Smit R, Kinghorn JR, Van den Hondel CAMJJ, Scazzocchio C, 1995. The intergenic region between the divergently transcribed *niiA* and *niiD* genes of *Aspergillus nidulans* contains multiple NirA binding sites which act bidirectionally. Mol. Cell. Biol. 15:5688-5699.
- Puhala JE, 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. Can. J. Bot. 63:179-183.
- Queiroz MV, Barros AO, Barros EG, Guimarães WV, Araújo EF, 1998. Transformation of *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase mutant with the *niiA* gene from *Fusarium oxysporum*. Can. J. Microbiol. 44:1-3.
- Renosto F, Schmidt ND, Degel IH, 1982. Nitrate reductase from *Penicillium chrysogenum*: the reduced flavin-adenine dinucleotide-dependent reaction. Arch. Biochem. Biophys. 219:12-20.
- Ribeiro JB, 2001. Isolamento e caracterização de genes que codificam poligalacturonases e transformação de *Penicillium expansum*. Tese de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 57 p.
- Scazzocchio C, 2000. The fungal GATA factors. Curr. Opin. Microbiol. 3:126-131.
- Schiestl RH, Petes TD, 1991. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA 88:7585-7589.
- Shen TC, Funkhouser EA, Guerrero MG, 1976. NADH- and NAD(P)H-nitrate reductases in rice seedlings. Plant Physiol 58:292-294.
- Soares MA, 2002. Transformação e mutagênese insercional em *Penicillium griseoroseum* por REMI (Integração Mediada por Enzima de Restrição). Tese de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 49 p.
- Swofford DL, 1993. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1. Champaign, IL, USA, Illinois Natural History Survey.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F., Higgins DG, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24:4876-4882.
- Tudzynski B, Mende K, Weltring KM, Kinghorn JR, Unkles SE, 1996. The *Gibberella fujikuroi niaD* gene encoding nitrate reductase: isolation, sequence, homologous transformation and electrophoretic karyotype location. Microbiology 142: 553-539.
- Unkles SE, Campbell EI, Ruitter-Jacobs YMJT, Brockhuijsen M, Macro JA, Carrez D, Contreras R, Van den Hondel CAMJJ, Kinghorn JR, 1989. The development of a homologous transformation system for *Aspergillus oryzae* based on the nitrate reductase assimilation pathway: a convenient and general selection system for filamentous fungal transformation. Mol. Gen. Genet. 218:99-104.
- Unkles SE, Campbell EI, Punt PJ, Hawer KL, Contreras R, Hawins AR, Van den Hondel CAMJJ, Kinghorn JR, 1992. The *Aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase: upstream nucleotide and amino acid sequence comparisons. Gene 111:149-155.
- Unkles SE, Smith J, Kanan GJMM, Millar LJ, Heck IS, Boxer DH, Kinghorn JR, 1997. The *Aspergillus nidulans cnxABC* locus is a single gene encoding two catalytic domains required for synthesis of precursor Z, an intermediate in molybdenum cofactor biosynthesis. J. Biol. Chem. 272:28381-28390.
- Whitehead MP, Gurr SJ, Grieve C, Unkles SE, Spence D, Ramsden M, Kinghorn R, 1990. Homologous transformation of *Cephalosporium acremonium* with the nitrate reductase-encoding gene (*niiA*). Gene 90:193-198.
- Williams RSB, Davis MA, Howlett BJ, 1994. Nitrate reductase of the ascomycetous fungus, *Leptosphaeria maculans*: gene sequence and chromosomal location. Mol. Gen. Genet. 244:1-8.
- Xiao X, Fu YH, Marzluf GA, 1995. 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 34:8861-8868.
- Zhou J, Kleinhofs A, 1996. Molecular evolution of nitrate reductase genes. J. Mol. Evol 42:432-442. †