

CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO TRANSPORTE E METABOLISMO DE
FONTES DE NITROGENIO EM *Aspergillus nidulans*: INFLUÊNCIA DA
CONCENTRAÇÃO DE NITRITO, DO pH E DA PRESENÇA DE CITRATO

SANDRA REGINA DE CAMPOS POMBEIRO

ORIENTADORA: Profa. Dra. NILCE M. MARTINEZ-ROSSI

Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Genética e Matemática
Aplicada à Biologia da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Genética.

A minha mãe, que
acompanhou passo à passo
o crescimento deste
trabalho, compartilhando
os erros e acertos, sempre
com palavras de incentivo
e muito amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho e, em especial:

A minha orientadora Profa. Dra. Nilce M. Martinez-Rossi, pelos ensinamentos, estímulos e amizade que muito contribuíram para fazer-me atingir esta importante etapa na minha carreira.

Ao Prof. Dr. Antonio Rossi Filho, pela participação em todas as fases deste trabalho, amizade e preocupação constante com a minha formação científica.

A Profa. Dra. Eucléia P. Betioli Contel, coordenadora do curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética e Matemática Aplicada à Biologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), pela amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Moacyr Antonio Mestriner, chefe do Departamento de Genética e Matemática Aplicada à Biologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), pela atenção dispensada.

Ao Prof. Dr. Francisco A. Moura Duarte, ex-chefe do Departamento de Genética e Matemática Aplicada A Biologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelas condições oferecidas durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sang Won Han, pela amizade e colaboração em algumas fases deste trabalho.

Aos companheiros Claudio, Cristina, Haroldo, Mirian, Raimundo, Sílvia, Sílvio e Walter pelos estímulos e esperanças compartilhadas.

A sras. Seny Motta e Clementina Antolini, pelos auxílios técnicos.

A sras. Cleusa Mazzucato Motta e Maria Aparecida Silva Elias, pela solícita colaboração.

Aos funcionários do setor de Computação do Departamento de Genética e Matemática Aplicada à Biologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), pelo auxílio drante a digitação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aquinaldo Simões, pela atenção dispensada no uso do microcomputador.

A todos os amigos, professores e funcionários do Departamento de Genética e Matemática Aplicada à Biologia, que contribuíram, propiciando um ambiente alegre e saudável para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e CAPES, pela concessão da bola de estudo.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAL E MÉTODOS	11
II.1. Linhagens	11
II.2. Soluções	12
II.2.1. Solução de cloroneb	12
II.2.2. Solução de benomil	12
II.2.3. Solução de vitaminas	14
II.2.4. Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras	14
II.2.5. Requerimentos nutricionais	15
II.2.6. Solução de elementos-traço	16
II.3. Meios de cultura	16
II.3.1. Meio mínimo	16
II.3.2. Meio completo	17
II.4. Métodos de cultivo	18
II.4.1. Preparação da suspensão de conídios	18
II.4.2. Estoque das linhagens	18
II.5. Métodos de isolamento de mutantes	19
II.5.1. Indução com luz ultravioleta	19
II.5.2. Cruzamento entre as linhagens inoB2 e wA3 pabaA6 palG21	19
II.6. Caracterização dos mutantes	20
II.7. Análise genética	21

II.7.1. Obtenção de heterocários e setores diplóides	21
II.7.2. Análise mitótica	22
II.7.3. Análise meiótica	23
II.7.4. Relação de dominância	24
II.7.5. Teste de alelismo	25
II.8. Análise bioquímica	25
II.8.1. Captação de nitrato	25
II.8.2. Captação de nitrito	27
II.8.3. Determinação de parâmetros cinéticos	27
III. RESULTADOS	29
III.1. Mutantes com crescimento restrito em elevadas concentrações de nitrito, como fonte de nitrogênio	29
III.1.1. Caracterização	29
III.1.2. Análise genética	37
III.1.3. Análise bioquímica	40
III.1.3.1. Captação de nitrato	40
III.1.3.2. Captação de nitrito	50
III.1.3.3. Efeito da amônia na captação de nitrito	63
III.2. Mutantes com crescimento reduzido na presença de citrato	74
III.2.1. Caracterização	74
III.2.2. Análise genética	80

III.3. Mutantes com crescimento ralo e produção de pigmento escuro, exceto em tartarato de amônio 10 mM	81
III.3.1. Caracterização	81
III.3.2. Análise genética	81
III.4. Mutantes com alteração morfológica em tartarato de amônio 10 mM	85
III.4.1. Caracterização	86
III.4.2. Análise genética	91
IV. DISCUSSÃO	93
IV.1. Mutantes com crescimento restrito em elevadas concentrações de nitrito, como fonte de nitrogênio	93
IV.2. Mutante com crescimento reduzido na presença de citrato	100
IV.3. Mutante com crescimento ralo e produção pigmento escuro, exceto em tartarato de amônio 10 mM	101
IV.4. Mutante com alteração morfológica em tartarato de amônio 10 mM	103
IV.5. Considerações gerais	104
V. RESUMO	106
VI. SUMMARY	108
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
VIII. APÊNDICES	121

I. INTRODUÇÃO

O controle da expressão gênica determina a diferenciação celular e a adaptabilidade metabólica ao meio ambiente, constituindo-se portanto num dos aspectos mais complexos da Biologia Moderna. Apesar desta complexidade muito se progrediu na compreensão destes fenômenos, inclusive ao nível molecular com o advento da tecnologia do DNA recombinante. Muitos sistemas biológicos contribuíram como modelos de estudo para o desenvolvimento conceitual do controle da expressão gênica e entre eles, os microrganismos ocupam um lugar de destaque. De fato, o primeiro mecanismo regulatório descrito em resposta à variação ambiental foi o clássico modelo do operon lac em *Escherichia coli*, que consiste na interligação física e funcional dos genes regulatórios, estruturais e sítio promotor (Jacob e Monod, 1961). A descoberta deste e de outros operons em bactérias levou a procura de sistemas controlados de forma semelhante em eucariotos inferiores. Neste sentido, os fungos *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans* têm contribuído de maneira expressiva desde o final da década de 60, principalmente no que concerne ao controle da utilização de substâncias como fontes essenciais de nitrogênio, carbono, fósforo e outros. Cada um destes sistemas tem particularidades próprias que variam também com a espécie em estudo.

O nitrogênio, constituinte de proteínas e ácidos nucléicos, é obtido por *A. nidulans* e *N. crassa* a partir de uma grande variedade de compostos nitrogenados. Embora amônia e

glutamina sejam utilizadas preferencialmente, esses microrganismos também podem utilizar nitrato, nitrito, purinas, proteínas, aminoácidos e acetamida como fontes de nitrogênio. X
Pará a captação e metabolização destas fontes alternativas, é requerida a síntese de enzimas específicas ou a ativação de enzimas pré-existentes (Marzluf, 1981; Dunn-Coleman et al., 1984; Tomsett, 1989).

A via de assimilação de nitrato dos fungos filamentosos *A. nidulans* e *N. crassa* envolve a redução de nitrato à amônia pela ação das enzimas nitrato e nitrito redutases (Pateman et al., 1967; Nicholas & Nason, 1954). A amônia é utilizada pela célula após a sua transformação em glutamato e glutamina (Figura 1) e alguns genes que participam dessa via estão listados na Tabela 1. A utilização pela célula de uma ou outra substância como fonte de nitrogênio depende de indutores e repressores, principalmente ao nível de transcrição gênica. Assim, a presença de nitrato ou nitrito no meio irá induzir a síntese de permeases e enzimas específicas (indução pelo substrato) somente na ausência de amônia ou glutamina, que agem como repressores (repressão pelo produto ou repressão metabólica pelo nitrogênio) (Arst & Cove, 1973; Hynes, 1975; Arst & Scazzocchio, 1985; Wiame et al., 1985; Tomsett, 1989). Pelo menos, dois genes regulatórios de ação positiva, não ligados, mediam este equilíbrio: o *nirA* e o *areA* em *A. nidulans* (ou os correspondentes *nit-4* e *nit-2* em *N. crassa*). Deste modo, enquanto a desrepressão do gene *nirA* (ou *nit-4*) é estimulada pela presença de nitrato ou nitrito, a desrepressão do gene *areA* (ou *nit-2*) é estimulada pela ausência de amônia (Sorger & Giles, 1965; Pateman

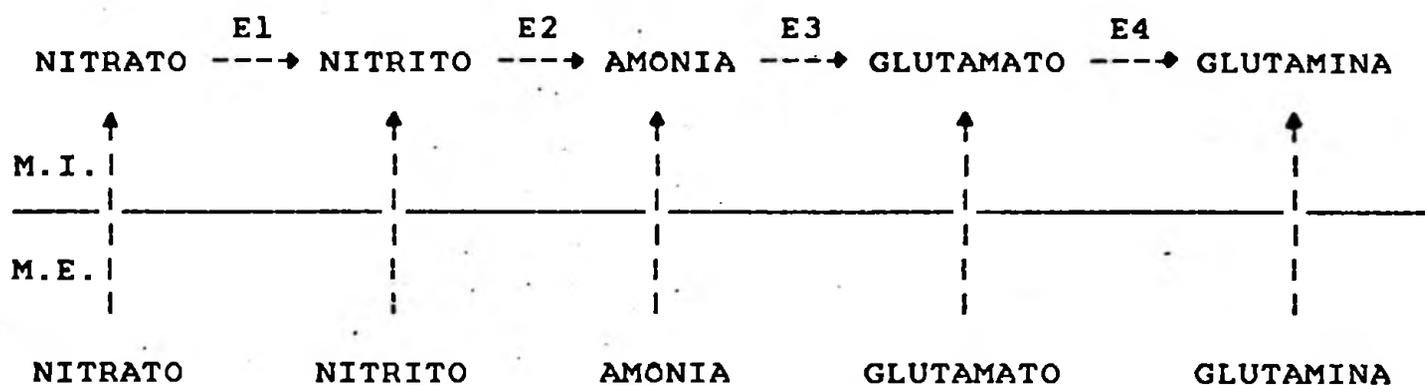


FIGURA 1 - Via de utilização de nitrato em *A. nidulans* (Tomsett, 1989). As letras E1, E2, E3 e E4 representam, respectivamente, as enzimas nitrato redutase, nitrito redutase, glutamato desidrogenase e glutamina sintetase. M.I. e M.E. significam meios intracelular e extracelular, respectivamente.

TABELA 1 - Genes envolvidos na assimilação de nitrato no fungo filamentoso *A. nidulans*.

GENE ^(a)	GRUPO DE LIGAÇÃO	FUNÇÃO (REFERÊNCIAS)
<i>niaD</i> (<i>nit-3</i>)	VIII	Gene estrutural para a enzima nitrato redutase (Cove & Pateman, 1963)
<i>cnx ABC, E, F, G, H</i> (<i>nit-ABC, 1, 7, 8, 9</i>)	II, III, VI, VIII	Gene envolvido na síntese do cofator contendo molibdênio, requerido para a atividade das enzimas nitrato redutase e xantina desidrogenase (Pateman et al., 1964)
<i>niaA</i> (<i>nit-6</i>)	VIII	Gene estrutural para a enzima nitrito redutase (Pateman et al., 1967)
<i>nirA</i> (<i>nit-4</i>)	VIII	Gene regulatório cujo produto media a indução da síntese nitrato e nitrito redutases (Pateman & Cove, 1967)
<i>areA</i> (<i>nit-2</i>)	III	Gene regulatório cujo produto media a repressão por amônia (Arst & Cove, 1973)
<i>crnA</i>	VIII	Gene envolvido no transporte de nitrato (Brownlee & Arst, 1983)
<i>niaH</i>	I	Gene provavelmente envolvido no transporte de nitrito (Pombeiro et al., 1983)

(a): Genes entre parênteses são os homólogos funcionais em *N. crassa* (Tonsett & Garrett, 1980).

& Cove, 1967; Cove, 1979; Tomsett & Garrett, 1980; Marzluf et al., 1985; Arst, 1989; Davis & Hynes, 1989; Fu et al., 1989; Tomsett, 1989).

A função regulatória do gene *nirA* foi sugerida por Cove (1979), quando foram detectados dois tipos de alelos mutantes de ação oposta: o *nirA^c*, constitutivo para a síntese das enzimas nitrato e nitrito redutases e o *nirA*, que é incapaz de utilizar nitrato ou nitrito como fonte de nitrogênio (Rand & Arst, 1978; Tollervey & Arst, 1981).

O *areA* codifica uma proteína regulatória que na presença de amônia ou glutamina media a repressão de várias permeases e enzimas envolvidas na utilização de várias fontes de nitrogênio, inclusive nitrato (Pateman & Cove, 1967; Cove, 1979). Mutações no gene *areA* também levam a fenótipos opostos: o *areA^r* (reprimido) apresenta níveis não detectáveis de enzimas e permeases sob seu controle e portanto, não permite a utilização de outras fontes de nitrogênio que não sejam amônia ou glutamina; o *areA^d* (desreprimido) induz a síntese de enzimas e permeases em condições que seriam reprimidas pela amônia, capacitando o mutante a utilizar inclusive acrilamida, L-histidina e L-citrulina como fontes de nitrogênio, o que não é possível para a linhagem selvagem (Hynes, 1975; Arst et al., 1989b; Tollervey & Arst, 1982). Surpreendentemente esta mesma mutação (*areA^d*) pode reprimir outras atividades repressíveis por amônia, sugerindo que os sítios receptores para o produto do gene *areA* diferem em estrutura (Wiame et al., 1985).

Dois modelos foram propostos para explicar a repressão metabólica pelo nitrogênio em *A. nidulans* e *N. crassa*:

através da glutamina sintetase ou da glutamina (Dunn-Coleman & Garrett, 1980; MacDonald, 1982; Dunn-Coleman et al., 1984). Se a glutamina fosse o efetor direto da repressão metabólica pelo nitrogênio, seria esperado que mutantes *glnA* ou *gln-1b* (genes estruturais para a glutamina sintetase em *A. nidulans* e *N. crassa*, respectivamente) se comportassem como selvagens, ou seja, tivessem reprimidas as enzimas de assimilação de nitrato na presença de glutamina. No entanto, linhagens com mutações no locus *glnA* (ou *gln-1b*) apresentam as enzimas nitrato e nitrito redutases desreprimidas quando cultivadas em glutamina (Dunn-Coleman & Garrett, 1981; MacDonald, 1982). Por outro lado, a habilidade de L-glutamina em eluir especificamente a proteína repressora (*nit-2*), quando ligada ao DNA de *N. crassa* (DNA-celulose), sugere que a própria glutamina seja o co-repressor (Grove & Marzluf, 1981). Está sendo mais aceito que a glutamina atuaria diminuindo a afinidade do produto do gene *nit-2* pelos sítios receptores, provavelmente ligando-se a este produto e impedindo a sua transcrição (Fu & Marzluf, 1990). Em *A. nidulans*, a glutamina agiria de forma semelhante (Wiame et al., 1985; Arst, 1989). Um resumo da provável interação dos genes de *A. nidulans* envolvidos na utilização de algumas fontes de nitrogênio está mostrado na Figura 2. Este modelo está alicerçado em resultados de análises genéticas, fisiológicas e bioquímicas e vem sendo confirmado e mais intimamente conhecido através da Biologia Molecular. Por exemplo, a clonagem do gene *nit-2* de *N. crassa* e seu uso para transformar linhagens *araA* de *A. nidulans*, permitiu verificar que este gene é expressado e que sua proteína

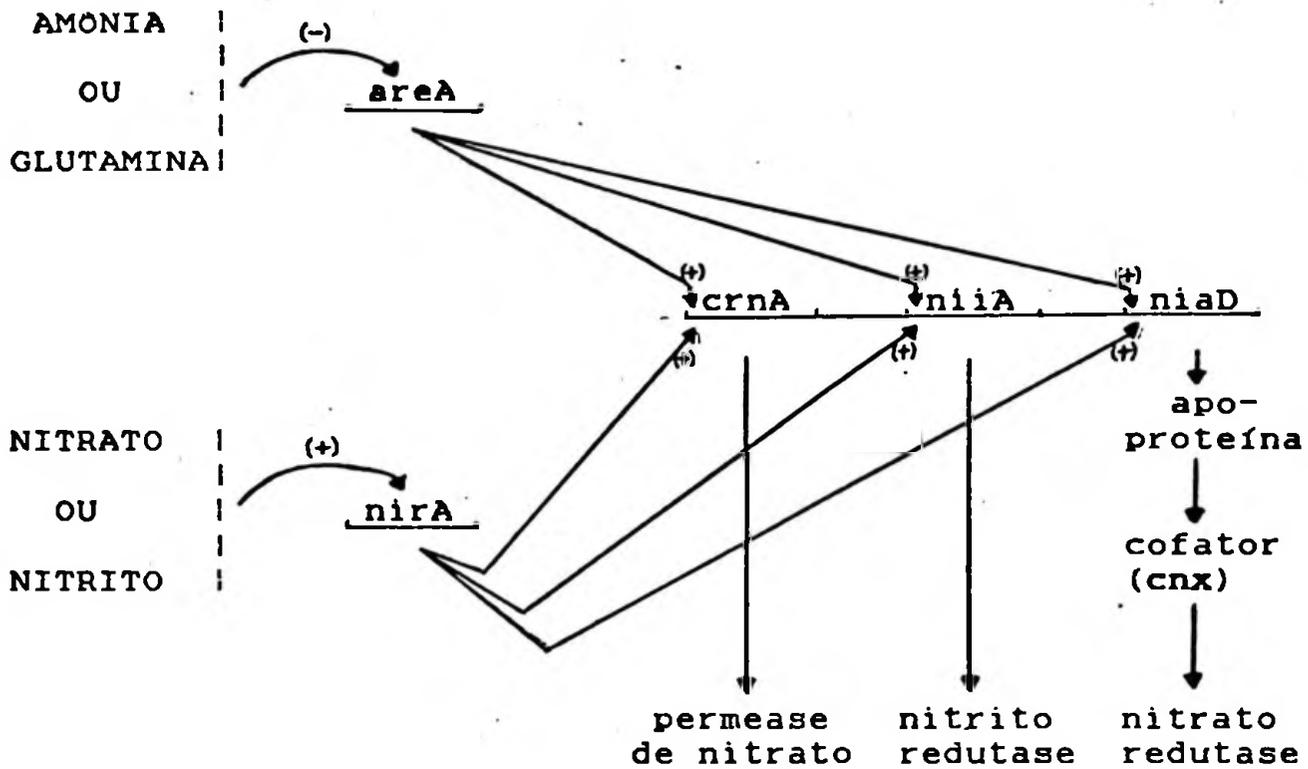


FIGURA 2 - Modelo ilustrando o possível mecanismo de controle da utilização de fontes de nitrogênio em *A. nidulans*.

ativa a expressão de genes regulados pelo nitrogênio no hospedeiro. Isto sugere que apesar da distância evolucionária entre estes organismos, as duas proteínas regulatórias são bastante conservadas conformacional e funcionalmente (Davis & Hynes, 1987).

O gene *areA* foi clonado (Caddick et al., 1986b) e a proteína derivada do sequenciamento deste gene revelou uma estrutura do tipo "zinc-finger", envolvendo cerca de 17 aminoácidos com alta homologia a um dos "zinc-fingers" de GF-1 (uma proteína regulatória para vários genes dos eritrócitos de camundongo) (Arst et al., 1989a; Caddick & Arst, 1990; Fu & Marzluf, 1990). Além disto, vários alelos mutantes do gene *areA* apresentam a sequência nucleotídica alterada justamente na região correspondente ao "zinc-finger", mostrando que esta região, além de bem conservada evolutivamente, é essencial para a funcionalidade da proteína (Arst et al., 1989a, Kudla et al., 1990).

Pelo modelo regulatório proposto para a assimilação de nitrato, a proteína regulatória do gene *areA* deveria se ligar, juntamente com o produto de *nirA*, na região 5' não codificadora dos genes estruturais que são reprimidos pelo nitrogênio. O sequenciamento dos genes da nitrato redutase (*niaD*) e nitrito redutase (*niaA*) (Johnstone et al., 1990) mostrou que embora suas regiões 5' não codificadoras possuam pequenos sítios de homologia em comum, não existe a dupla simetria de nucleotídeos (Kingham et al., 1990), característica de sítios de ligação de proteínas regulatórias descritas em leveduras e fungos (Arndt & Fink, 1986). Por outro lado, a existência de

sequências características de regiões promotoras (TATA box, bloco CT, etc) em ambos genes (*niaD* e *niaA*) (Kinghorn et al., 1990) indica que eles poderiam ser expressados em transcritos independentes, apesar de pertencerem ao mesmo "cluster" gênico no grupo de ligação VIII. A independência funcional dos genes *niaD* e *niaA* havia sido sugerida anteriormente por Arst et al. (1979), através do estudo genético de mutantes com translocação localizada entre estes genes.

Em contraposição a este rico legado de conhecimento sobre a metabolização das principais fontes de nitrogênio, pouca atenção tem sido dada para os mecanismos de sua captação. Schloemer e Garrett (1974a) verificaram que em *N. crassa* a captação de nitrato é mediada por um mecanismo de transporte ativo. Esta captação, assim como a de nitrito, é induzida pela presença de nitrato ou nitrito. Nitrito, amônia e os produtos finais da via de assimilação, em associação com nitrato, inibem não competitivamente a captação de nitrato neste fungo (Schloemer & Garrett, 1974 a). Brownlee e Arst (1983) observaram que mutações no locus *crnA* de *A. nidulans* reduzem a captação de nitrato pelos conídios e micélio jovem, mas não afetam a captação por micélio velho, o que sugere uma regulação durante o desenvolvimento para esse sistema. Este locus, *crnA*, também é regulado pelos genes *nirA* e *areA* (Unkles et al., 1991). Embora a presença de uma permease para nitrito não tenha sido demonstrada formalmente em *A. nidulans*, a identificação do locus *niHA* sugeriu a sua existência (Pombeiro et al., 1983). Mutação no locus *niHA* resultou em sensibilidade da linhagem mutante a

elevadas concentrações de nitrito (70 mM). Como a linhagem mutante cresce em nitrato, parece claro que a enzima nitrito redutase está funcionando normalmente. Assim, foi sugerido que uma maior eficiência na captação de nitrito resulta em um acúmulo intracelular atingindo níveis tóxicos. Por outro lado, a proteção da amônia contra a toxicidade do nitrito, descrita por Rand e Arst (1977) na linhagem *niIA*, não foi observada na linhagem *niHA*. Ao contrário, a toxicidade do nitrito foi aumentada quando a linhagem mutante foi ensaiada em meio contendo nitrito e amônia. Portanto é provável que a mutação no locus *niHA* resultou em uma maior eficiência na captação de nitrito, e que não deve ser totalmente reprimida pela amônia (Pombeiro et al., 1983).

Os objetivos deste trabalho foram:

1) Isolar mutantes com alterações na utilização de fontes de nitrogênio, na tentativa de identificar genes envolvidos no transporte de nitrito e distintos do *niHA*.

2) Estudar o transporte de nitrato e nitrito nas linhagens selvagem e mutantes.

3) Caracterizar os mutantes isolados quanto ao efeito do pH, temperatura de incubação e substâncias adicionadas ao meio (como ácidos orgânicos, SDS e antibiótico) em função da utilização de fontes de nitrogênio.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Linhagens

As linhagens de *Aspergillus nidulans* utilizadas neste trabalho e estocadas no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), estão relacionadas abaixo pelos símbolos de seus marcadores genéticos, segundo a nomenclatura proposta por Clutterbuck (1981):

a) veA1 (Kafer, 1965).

b) ppyn: proA1 pabaA6 yA2 niHA (Pombeiro et al., 1983).

c) CHL-14: proA1 pabaA6 yA2 chl14 niHA (Martinez-Rossi & Azevedo, 1982; Han et al., 1988).

d) inoB2 (proveniente da coleção do Prof. H. N. Arst Jr.).

e) biA1 facA303 (proveniente da coleção do Prof. H. N. Arst Jr.).

f) pabaA1 biA1 melA1 (FGSC no. A657 e gentilmente cedida pelo Prof. A. J. Clutterbuck).

g) yA2 inoB2 pacC14 (segregante cedido por A. Rossi).

h) wA3 pabaA6 palG21 (segregante cedido por A. Rossi).

i) MSE ("Master Strain E" FGSC no. 288): suA1adE20 yA2 adE20 wA3 galA1 pyroA4 facA303 sB3 nicB8 riboB2 (estes marcadores genéticos estão distribuídos nos oito grupos de ligação do fungo) (McCully & Forbes, 1965).

j) MSF ("Master Strain F" FGSC no. 283): suAladE20 yA2 adE20 acrA1 galA1 pyroA4 facA303 sB3 nicB8 riboB2 (estes marcadores genéticos estão distribuídos nos oito grupos de ligação do fungo) (McCully & Forbes, 1965).

O grupo de ligação e o fenótipo das mutações das linhagens descritas no presente trabalho estão mostrados na Tabela 2.

II.2. Soluções

II.2.1. Solução de cloroneb

Cloroneb (1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno) é um fungicida sistêmico derivado de hidrocarbonetos aromáticos e fabricado por E. I. Du Pont de Neumors & Co. (USA) com o nome comercial de Demosan 65W (Cardoso et al., 1979).

A solução aquosa (4 mg/ ml) foi preparada imediatamente antes do uso e aquecida em banho-maria por 15 minutos. A concentração usada levou em conta somente o produto ativo, que corresponde a 65% do produto bruto.

II.2.2. Solução de benomil

Benomil [metil-1-(butilcarbamoil) 2-benzimidazol carbamato] é um fungicida sistêmico, derivado do benzimidazol e fabricado por E. I. Du Pont de Neumors & Co. (USA)

TABELA 2 - Relação das mutações em *A. nidulans* presentes nas linhagens utilizadas neste trabalho.

SÍMBOLO GÊNICO	GRUPO DE LIGAÇÃO	FENOTIPOS
acrA1	II	Resistência à acriflavina
adE20	I	Auxotrofia para adenina
biA1	I	Auxotrofia para biotina
chl14	III	Resistência e dependência parcial ao cloroneb
galA1	III	Incapacidade de utilizar galactose, como fonte de carbono
facA303	V	Incapacidade de utilizar acetato, como fonte de carbono
inoB2	IV	Auxotrofia para inositol
melA1	VII	Produção excessiva de pigmento escuro
nicB8	VII	Auxotrofia para ácido nicotínico
nihA1	I	Incapacidade de crescer em elevadas concentrações de nitrito, como fonte de nitrogênio
pabaA6	I	Auxotrofia para ácido p-aminobenzoico
pacC14	VI	Gene regulatório de amplo domínio e mediador da resposta ao pH extracelular
palG21	III	Gene estrutural para fosfatase alcalina constitutiva
proA1	I	Auxotrofia para prolina
pyroA4	IV	Auxotrofia para piridoxina
riboB2	VIII	Auxotrofia para riboflavina
sB3	VI	Auxotrofia para tiosulfato
suA1adE20	I	Gene supressor de adE20
veA1	VIII	Conídios verdes (independente da presença de luz)
yA2	I	Conídios amarelos

com o nome comercial de Benlate (Cardoso et al., 1979).

A solução alcóolica (1 mg/ ml de etanol) foi preparada imediatamente antes do uso, levando-se em conta somente o produto ativo, que corresponde a 50% do produto bruto.

II.2.3. Solução de vitaminas

Esta solução, utilizada no preparo do meio completo, é constituída de:

Ácido fólico	25 mg
ácido nicotínico	100 mg
Ácido p-aminobenzóico	10 mg
B-mesoinositol	200 mg
Biotina	1 mg
Cloreto de colina	100 mg
Piridoxina	50 mg
Riboflavina	100 mg
Tiamina	50 mg
Água destilada estéril até completar	100 ml

A solução foi aquecida em banho-maria durante 15 minutos e guardada no refrigerador a 4 °C em frasco escuro, sob clorofórmio.

II.2.4. Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras

As soluções de ácido nucléico em meio ácido (2g/ 15 ml de HCl 1N) e em meio alcalino (2 g/ 15 ml de NaOH 1N),

obtidas após aquecimento por 20 minutos em banho-maria, foram misturadas e o pH ajustado em 6,0. A mistura foi filtrada, o volume completado com água destilada até 40 ml e estocada a 4 C, sob clorofórmio.

II.2.5. Requerimentos nutricionais

Para o crescimento das linhagens auxotróficas, o meio mínimo foi suplementado com os seguintes requerimentos dissolvidos em água:

Solução estoque (volume completa- do para 100 ml)		Volume da solução estoque adicionada por placa de Petri (20 ml de meio)	Concentração final do re- querimento no meio
Ácido nicotínico	10 mg	0,1 ml	0,50 ug/ml
Ácido p-aminobenzóico	5 mg	0,1 ml	0,25 ug/ml
(a)			
Acriflavina	500 mg	20,0 ul	3,75 ug/ml
Adenina	500 mg	0,1 ml	25,00 ug/ml
Biotina	4 mg	0,1 ml	0,20 ug/ml
Inositol	600 mg	0,1 ml	30,00 ug/ml
Piridoxina	5 mg	0,1 ml	0,25 ug/ml
Prolina	1 mg	0,1 ml	50,00 ug/ml
Riboflavina	10 mg	0,1 ml	0,50 ug/ml
Tiossulfato de sódio	25 g	0,1 ml	1240 ug/ml

(a): A acriflavina foi adicionada para ensaiar a resistência da linhagem MSF e dos segregantes obtidos.

II.2.6. Solução de elementos-traço (Cove, 1966)

Esta solução, utilizada no preparo do meio mínimo, é constituída dos seguintes sais:

Borato de sódio decahidratado	40 mg
Sulfato de cobre pentahidratado	400 mg
Sulfato de ferro heptahidratado	532 mg
Sulfato de manganês monohidratado	292 mg
Molibdato de sódio bihidratado	800 mg
Sulfato de zinco heptahidratado	8 g
Água destilada até completar	1000 ml

II.3. Meios de Cultura

II.3.1. Meio mínimo de Cove (1966)

Este meio de cultura tem a seguinte composição:

Sulfato de magnésio heptahidratado	0,52 g
Cloreto de potássio	0,52 g
Fosfato de potássio monobásico	1,52 g
Solução de elementos-traço	1,0 ml
Água destilada até completar	1000 ml

Após ajustar o pH em 6,8, o meio foi autoclavado a 1 atm de pressão por 20 minutos. As fontes de carbono e nitrogênio foram autoclavadas separadamente e então adicionados ao meio. Quando não mencionado, glicose (55 mM) foi

usada como fonte de carbono e tartarato de amônio (10 mM) como fonte de nitrogênio. Para a preparação de meio mínimo sólido foi adicionado, antes da autoclavagem, 1,3 g de agar por 100 ml de meio.

II.3.2. Meio completo de Pontecorvo et al. (1953) e modificado por Cove (1966)

Este meio de cultura apresenta a seguinte composição:

Peptona	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Extrato de leveduras	1,0 g
Solução de vitaminas (preparada conforme descrita no item II.2.3.)	2,0 ml
Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras (preparado conforme descrito no item II.2.4.)	2,5 ml
Meio mínimo líquido (preparado conforme descrito no item II.3.1.) para completar	1000 ml

Após ajustar o pH em 6,8 , o meio foi autoclavado a 1 atm de pressão por 20 minutos. As fontes de carbono e nitrogênio utilizadas foram, respectivamente, glicose (55mM) e tartarato de amônio (10mM), ambas autoclavadas separadamente. Para a preparação de meio sólido foi adicionado, antes da autoclavagem, 1,3 g de agar por 100 ml de meio.

II.4. Métodos de cultivo

II.4.1. Preparação da suspensão de conídios

Conídios obtidos após o crescimento das linhagens por 4 a 5 dias a 37 C foram coletados em solução salina contendo 0,01% de Tween 80. A suspensão foi vigorosamente agitada para desagregar as cadeias de conídios, filtrada em lã de vidro e centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm em uma centrífuga Excelsa 2. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em solução salina. O número de conídios por mililitro foi estimado, contando-os em câmara de Neubauer sob microscópio.

II.4.2. Estoque das linhagens

Para utilização diária, as linhagens foram mantidas em tubos de ensaio contendo meio completo inclinado, a 4 C. Para a preservação por longos períodos, as linhagens são mantidas em grânulos de sílica gel. Neste caso, esporos recém obtidos são ressuscitados em algumas gotas de leite em pó diluído a 5% e transferidos para tubos de ensaio contendo sílica gel esterilizada. Para a utilização de uma determinada linhagem alguns grânulos de sílica são colocados em placas de Petri contendo meio completo. Esta técnica permite que os repiques das linhagens sejam sempre obtidos de um mesmo estoque, evitando-se assim subculturas sucessivas.

II.5. Métodos de isolamento de mutantes

II.5.1. Indução com luz ultravioleta

Três mililitros de uma suspensão de conídios da linhagem *inoB2* (preparada conforme descrito no item II.4.1.) foram colocados em uma placa de Petri e irradiados com luz ultravioleta de 15 Watts (Germicidal G15T8) por 180 segundos em câmara escura, à uma distância de 20 cm. Após este tratamento, que permite uma sobrevivência em torno de 15%, os conídios foram imediatamente semeados em placas de Petri contendo meio completo e incubadas a 28 °C por 36 a 48 horas. As colônias foram transferidas, através de replicador coberto com veludo, para meio mínimo contendo nitrito de sódio 70 mM e citrato 20 mM e para meio mínimo contendo nitrato de sódio 70 mM. Citrato, além de ser amplamente utilizado como agente tamponante (Rossi & Arst, 1990), parece interferir na produção e/ou extrusão de prótons em culturas de *A. nidulans* (A. Rossi, comunicação pessoal). Após incubação a 28 °C por 36 a 48 horas, as colônias que apresentaram crescimento muito pobre em meio suplementado com nitrito e citrato foram isoladas, quando o crescimento em nitrato foi normal.

II.5.2. Cruzamento entre as linhagens *inoB2* e *wA3 pabaA6* *palG21*

A linhagem WA3 pabaA6 palG21, isolada por A. Rossi após tratamento com óxido de nitroquinolina (NQO), foi utilizada no presente trabalho por apresentar crescimento ralo em meio sólido suplementado com tartarato de amônio 10 mM como fonte de nitrogênio. O cruzamento destas duas linhagens teve como objetivo a seleção de segregantes portadores da mutação *inoB2* e que tenha afetada a utilização dessa fonte de nitrogênio. Segregantes meióticos, obtidos deste cruzamento, foram inoculados em 26 pontos prefixados em uma placa de Petri contendo meio completo e incubados a 28 °C por 36 a 48 horas. Após este tempo as linhagens foram inoculadas com o auxílio de um replicador multifio (Azevedo et al., 1976) em meio mínimo suplementado com inositol, citrato (20 mM) e uma das seguintes fontes de nitrogênio: nitrito de sódio (70 mM), nitrato de sódio (70 mM) e tartarato de amônio (10 mM).

II.6. Caracterização dos mutantes

Possíveis alterações na utilização de fontes de nitrogênio pelos mutantes, foram detectadas através do crescimento radial das colônias incubadas em meio mínimo a 28 °C por 96 horas ou a 37 °C por 72 horas, na presença e ausência de citrato (20 mM). Foram ensaiadas as seguintes fontes de nitrogênio: tartarato de amônio, nitrato de sódio, nitrito de sódio nas concentrações 10, 35, 70, 105 e 140 mM, uréia 5 mM, ácido úrico 0,6 mM, xantina 0,7 mM e hipoxantina 0,7 mM.

II.7. Análise genética

II.7.1. Obtenção de heterocários e diplóides

A primeira etapa para a análise genética consiste na obtenção de heterocários, que resultam da inclusão de dois núcleos geneticamente diferentes em um citoplasma comum.

As linhagens mutante e "Masters" (MSF ou MSE), com colorações de conídios diferentes e auxotrofias complementares, foram alternadamente inoculadas em meio completo a uma distância média de 5 mm. Após incubação por 24 horas a 37 C, interfaces formadas pelo contato entre as linhagens foram transferidas para meio mínimo. A cada período de 3 a 5 dias, pequenos segmentos da frente de crescimento, onde observa-se claramente hifas produzindo conídios de ambas as linhagens, foram sucessivamente transferidos para meio mínimo até que setores diplóides se desenvolvessem. Estes diplóides, além de crescerem em meio mínimo, apresentam o diâmetro dos conídios ligeiramente maior que o dos conídios haplóides que lhes deram origem, auxiliando a sua caracterização. A medida dos conídios foi obtida através de um microscópio equipado com ocular micrométrica, utilizando-se como critério somente cadeias com cinco conídios. Para preservar as cadeias de conídios, as lâminas foram preparadas com lisofórmio diluído (1:10). O resultado obtido para cada diplóide foi sempre comparado com o das linhagens originais.

Por convenção, os componentes de um núcleo diplóide foram representados com o símbolo // entre eles.

II.7.2. Análise mitótica

A análise mitótica foi efetuada através do ciclo parassexual. Este ciclo se constitui numa alternativa de sexo, pois pode ocorrer recombinação genética sem necessidade de um processo sexual através da meiose (Pontecorvo & Roper, 1952). As linhagens diplóides foram haploidizadas através de aneuploidias sucessivas até que o estágio haplóide estável fosse atingido (Kafer, 1961). Deste modo, os marcadores genéticos de um mesmo grupo de ligação segregam como uma unidade e cada gene mutante em estudo pode ser relacionado com um grupo de ligação particular, desde que se utilize uma linhagem com marcadores nos oito grupos de ligação.

Para induzir a haploidização, inoculou-se os diplóides em meio completo contendo benlate (0,63 ug/ml de meio) (Hastie, 1970) ou cloroneb (20 ug/ml de meio) (Azevedo & Santana, 1975). Após 7 a 10 dias de incubação a 37 C, os setores haplóides foram purificados em meio completo. Estes segregantes haplóides (segregantes mitóticos) foram inoculados um a um em 26 pontos prefixados em placas de Petri contendo meio completo. Após 2 dias de incubação, esta placa serviu como mestra e foi replicada em placas de análise, usando-se um replicador contendo 26 fios de níquel-cromo (Azevedo et al., 1976).

A análise do genótipo de cada segregante foi feita em meio mínimo suplementado com os requerimentos nutricionais, exceto aquele sob análise. Os genótipos galA1 e facA303 foram identificados em meio mínimo suplementados

respectivamente com galactose ou acetato como fonte de carbono. Para a identificação de mutações relacionadas à utilização de fontes de nitrogênio, o meio mínimo foi suplementado com os requerimentos nutricionais e a fonte de nitrogênio sob análise. O crescimento das colônias foi analisado após 24, 48 e 72 horas de incubação a 37 C ou 28 C.

II.7.3. Análise meiótica

A análise meiótica em *A. nidulans* está fundamentada no estudo de cleistotécios híbridos, obtidos através do seu ciclo sexual. As interfaces formadas pelo contato entre as linhagens (veja ítem II.7.1.), foram implantadas em meio mínimo e incubadas a 37 C, por 48 horas. Após este período, as placas de Petri foram vedadas com fita celulósica e, após 15 a 20 dias de incubação a 37 C, observou-se a formação de cleistotécios maduros. Os cleistotécios maiores são retirados sob lupa e rolados em placas contendo meio mínimo para separá-los dos conídios e células de Hulle aderentes a suas paredes. Cada cleistotécio isolado foi transferido para um tubo de ensaio contendo 1,0 ml de solução salina e esmagado contra a parede do tubo para a liberação dos ascósporos. Uma estria de cada suspensão de ascósporos foi feita em meio completo (6 estrias em cada placa) para determinar quais cleistotécios eram híbridos. Diluições dos ascósporos destes cleistotécios híbridos foram inoculados em placas de meio completo de modo a se obter 30 a 50 colônias por placa. As colônias resultantes (segregantes

meióticos) foram inoculadas em 26 pontos prefixados de uma placa contendo meio completo (placa mestra). A progênie de cada cruzamento foi analisada (como descrito no ítem II.7.2.), em relação a auxotrofia, alterações na utilização de fontes de nitrogênio e outras características consideradas relevantes. Foram analisados pelo menos 250 segregantes de cada cruzamento e os valores de ligação genética foram calculados em função da porcentagem de recombinantes entre todos os segregantes meióticos analisados.

A base genética da herança de cada gene de interesse foi verificada através da relação entre o número de ascósporos mutantes e selvagens provenientes de um cleistotécio híbrido.

II.7.4. Relação de dominância

A expressão dos genes mutados quando em heterozigose (conforme descrito no ítem II.7.1.) foi observada através do fenótipo apresentado pelo diplóide e comparado ao das linhagens parentais. Se a característica do mutante ou selvagem era manifestada no diplóide, considerou-se o caráter como dominante ou recessivo, respectivamente. Se a característica apresentada pelo diplóide fosse intermediária entre mutante e selvagem, a mutação seria denominada codominante.

II.7.5. Teste de alelismo

O teste de alelismo tem por finalidade verificar se mutações com as mesmas características e mapeadas no mesmo grupo de ligação são alélicas. A técnica consiste em cruzar duas linhagens que apresentam determinada mutação no mesmo grupo de ligação e analisar as características sob estudo de pelo menos 100 ascósporos, provenientes de um cleistotécio híbrido (veja ítem II.7.3.). Esta análise fornece evidências da posição relativa das mutações.

II.8. Análise bioquímica

II.8.1. Captação de nitrato

A captação de nitrato pelos conídios e micélio foi estimada através da diminuição da quantidade de nitrato no meio em função do tempo. O método para determinação de nitrato descrito por Cawse (1967) é fundamentado na leitura da absorbância em 210 nm, após o tratamento da amostra com ácido perclórico a 5% .

Cerca de 5×10^8 conídios (obtidos conforme descrito no ítem II.4.1.) foram inoculados em 50 ml de meio mínimo líquido e suplementado com nitrato 10 mM e os requerimentos nutricionais. Após incubação por 4 horas a 37 °C sob agitação (pré-incubação necessária para a desrepressão do sistema

de captação e metabolização de nitrato), o meio foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e os conídios lavados com 10 ml de meio mínimo sem fonte de nitrogênio. Para se determinar a influência da concentração de nitrato na velocidade de sua captação, estes conídios pré-incubados foram ressuspensos em meio contendo quantidades determinadas de nitrato e incubados a 37 °C sob agitação (160 rpm). Amostras de 2,0 ml do meio foram coletadas a cada 15 ou 30 minutos, filtradas, diluídas em ácido perclórico e procedida a leitura da absorbância em 210 nm. O cálculo da velocidade de captação de nitrato pelo fungo, em função de sua concentração no meio, foi feito pela diferença entre o nitrato presente no início e no final de cada intervalo de tempo, utilizando um $E = 5714 \cdot \frac{M}{M}$. Para calcular a velocidade de captação em função da concentração de nitrato, foram consideradas apenas as medidas onde ocorreram captação linear em pelo menos dois intervalos de tempo consecutivos.

Quando se utilizou micélio para os experimentos de captação, 5×10^8 conídios foram inoculados em 50 ml de meio mínimo líquido suplementado com nitrato 1,5 mM. Após incubação a 37 °C por 15 horas sob agitação (160 rpm) e verificação que todo o nitrato adicionado havia sido consumido, foram adicionadas quantidades determinadas de nitrato nesse meio. A velocidade de captação de nitrato foi então medida como descrito acima.

II.8.2. Captação de nitrito

A captação de nitrito pelos conídios bem como pelo micélio foi estimada medindo-se a diminuição da quantidade de nitrito no meio de cultura em função do tempo. O método de determinação de nitrito é fundamentado na formação de um sal de diazônio, pela reação de nitrito com sulfanilamida em meio ácido. A posterior reação com N-(1-naftil)etilenediamina (NNEDA) resulta em um complexo colorido que absorve em 540 nm (Snell & Snell, 1949).

A desrepressão do sistema de captação e metabolismo de nitrito, tanto nos conídios como no micélio, seguiu o mesmo procedimento descrito para a captação de nitrato (veja ítem II.8.1.). Após incubação dos conídios ou micélio em meio contendo quantidades determinadas de nitrito, a 37 °C sob agitação (160 rpm), amostras de 2,0 ml foram retiradas a cada 15 ou 30 minutos, filtradas, diluídas e misturadas com 1,0 ml de sulfanilamida (1%) e 1,0 ml de NNEDA (0,02%) em água destilada. Após 10 minutos de repouso à temperatura ambiente foi lida a absorbância em 540 nm. A velocidade de captação de nitrito foi determinada do mesmo modo descrito para a captação de nitrato (veja ítem II.8.1.), usando-se neste caso um $E = 29895 \cdot \frac{M}{M}$.

II.8.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos de estado estacionário (K_s e V_{lim}), utilizados para a caracterização de enzimas, foram

determinados para as velocidades de captação de nitrato e nitrito em função de suas concentrações, conforme procedimento gráfico descrito por Lineweaver e Burk (1934).

A constante de interação (h) foi determinada conforme o procedimento gráfico de Hill descrito por Koshland (1970). Todos os pontos experimentais foram efetuados em duplicata, com pelo menos 3 repetições de cada experimento.

III. RESULTADOS

Utilizando-se os métodos descritos no ítem II.5 foram identificadas onze linhagens de *A. nidulans* com possíveis alterações na utilização de fontes de nitrogênio. Estas alterações foram detectadas através do crescimento colonial (medida do diâmetro) e/ou morfologia das colônias crescidas em várias fontes de nitrogênio, durante 72 horas a 37 °C ou 96 horas a 28 °C. Por apresentarem características em comum, estes mutantes foram agrupados em quatro classes, representados pelos seguintes fenótipos: 1) crescimento restrito em elevadas concentrações de nitrito como fonte de nitrogênio; 2) crescimento reduzido na presença de citrato; 3) crescimento ralo e produção de pigmento escuro, exceto em tartarato de amônio 10 mM e 4) alteração morfológica em tartarato de amônio 10 mM. A Tabela 3 mostra a origem e o genótipo de um mutante representativo de cada classe.

III.1. Mutantes com crescimento restrito em elevadas concentrações de nitrito como fonte de nitrogênio

III.1.1. Caracterização

Além do mutante 1 isolado neste trabalho, foram estudadas duas outras linhagens que apresentam restrição do crescimento radial em elevadas concentrações de

TABELA 3 - Descrição sumária da origem e genótipo dos mutantes estudados.

MUTANTE ^(a)	ORIGEM ^(b)	GENÓTIPO	CARACTERÍSTICAS
1 (nihB)	A	inoB2	Crescimento restrito em altas concentrações de nitrito, como fonte de nitrogênio
2 (ctsA)	A	inoB2	Redução do crescimento radial na presença de citrato
3 (melC)	B	inoB2	Produção de pigmento escuro, exceto em tartarato de amônio (10 mM)
4 (pacC)	C	γA2 inoB2 pacC14	Alteração morfológica em tartarato de amônio 10 mM

(a): Entre parênteses estão os loci responsáveis pelas características aqui descritas e que foram identificadas no decorrer deste trabalho.

(b) A: indução com luz ultravioleta durante 180 segundos.

B: cruzamento entre as linhagens inoB2 e wA3 pabaA6 palG21.

C: linhagem cedida por A. Rossi.

nitrito: ppyn (Pombeiro et al., 1983) e CHL-14 (Martinez-Rossi & Azevedo, 1982; Han et al., 1988).

A linhagem 1 não cresce em nitrito de sódio (140 mM) quando cultivada a 28 °C e nessas condições, a linhagem selvagem inoB2 tem seu crescimento reduzido em cerca de 50%, quando comparado com o crescimento em tartarato de amônio ou nitrato de sódio (Tabela 4). Além disto, esta linhagem não apresenta conidiação (Figura 3) e tem o crescimento radial reduzido em cerca de 40 a 60%, em todas as fontes de nitrogênio ensaiadas (Tabela 4). Citrato reduz o crescimento das linhagens selvagem e mutante praticamente nas mesmas proporções, exceto em nitrato onde o crescimento da linhagem mutante não foi significativamente afetado (Tabela 4). A Tabela 5 mostra que, ao contrário do nitrito de sódio, elevadas concentrações de tartarato de amônio ou nitrato de sódio não interferem no crescimento radial das linhagens 1 e selvagem. A linhagem inoB2 praticamente recuperou o crescimento radial em 140 mM de nitrito, quando cultivada a 37 °C, o que não ocorreu com a linhagem 1 (Tabela 6). Por esta razão, a análise genética deste mutante foi realizada a 37 °C, em meio suplementado com nitrito 140 mM. As linhagens CHL-14 e ppyn, usadas como controle neste experimento, apresentaram uma maior inibição do crescimento radial na presença de nitrito que a linhagem 1 (Tabela 6), sugerindo diferentes níveis de toxicidade.

A associação de tartarato de amônio e nitrito potencia o efeito tóxico do nitrito nas linhagens ppyn e CHL-14 (Tabelas 6 e 7) (Pombeiro et al., 1983). No entanto, o mesmo

(a)
 TABELA 4 - Diâmetro de colônias (em mm) das linhagens inoB2 e 1, após crescimento por 96 horas a 28 °C, em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de nitrogênio, na ausência e presença de citrato (20 mM).

FONTE DE NITROGÊNIO	CONCENTRAÇÃO (mM)	--- AUSÊNCIA DE CITRATO ---		--- PRESENÇA DE CITRATO ---	
		inoB2	1	inoB2	1
Tartarato de amônio	10	29,5±1,8	17,5±1,9	23,8±1,3	13,0±0,0
Nitrato de sódio	70	32,5±1,4	17,8±3,4	25,5±1,9	16,5±2,1
Nitrito de sódio	10	31,0±0,8	17,3±2,5	24,8±1,2	13,5±2,1
Nitrito de sódio	140	15,0±0,0	0,0	n.d.	n.d.
Xantina	0,7	30,0±0,9	18,3±2,5	23,8±1,9	13,0±2,8
Hipoxantina	0,7	28,7±0,8	15,7±3,0	25,5±0,6	12,0±2,8
Uréia	5,0	29,8±1,5	15,3±1,5	20,3±1,7	12,0±1,4
Ácido úrico	0,6	29,8±1,1	17,0±4,2	26,3±0,5	13,0±2,1

(a): Os valores do diâmetro são a média ± desvio padrão de pelo menos 4 experimentos

n.d.: não determinado.



FIGURA 3 - Crescimento das linhagens inoB2 (A) e 1 (B), por 96 horas a 28 C., em meio mínimo contendo nitrato de sódio (70 mM) ou nitrito de sódio (70 mM) como fonte de nitrogênio.

TABELA 5 - Caracterização das linhagens inoB2 e 1, após o crescimento a 28 °C por 96 horas, em meio mínimo suplementado com diversas fontes de nitrogênio.

FONTE DE NITROGÊNIO	CONCENTRAÇÃO (mM)	(a) DIÂMETRO	
		inoB2	1
Tartarato de amônio	10 ^(b)	29,5±1,8	17,5±1,9
	35	28,5±0,7	19,0±1,4
	70	26,0±0,0	16,0±1,4
	105	25,5±0,7	17,0±1,4
	140	25,0±0,0	17,0±1,4
Nitrato de sódio	10	33,0±0,7	19,0±2,1
	35	31,5±0,7	16,0±1,4
	70 ^(b)	32,5±1,4	17,5±3,4
	105	32,0±0,0	15,0±0,0
	140	33,0±0,0	18,0±0,0
Nitrito de sódio	10 ^(b)	31,0±0,8	17,3±2,5
	35	30,3±1,2	12,2±4,7
	70	25,4±1,4	11,8±2,2
	105	16,5±2,8	3,5±2,1
	140 ^(b)	15,0±0,0	0,0

(a): Os valores do diâmetro das colônias (em mm) representam a média ± desvio padrão de pelo menos 4 experimentos independentes.

(b): Dados retirados da Tabela 4.

TABELA 6 - Caracterização das linhagens inoB2, 1, ppyn e CHL-14, após o crescimento a 37 C por 72 horas, em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de nitrogênio.

FONTE DE NITROGÊNIO	CONCENTRAÇÃO (mM)	(a)			
		DIÂMETRO			
		inoB2	1	ppyn	CHL-14
Tartarato de amônio	10	29,5±0,4	26,0±0,0	30,0±0,0	17,6±0,5
Nitrato de sódio	70	35,7±1,5	25,5±0,7	40,0±0,0	17,2±0,5
Nitrito de sódio	10	33,7±0,6	24,0±0,0	37,0±0,0	26,7±0,9
	20	33,7±0,7	25,0±1,0	28,5±0,7	17,0±3,5
	35	31,3±0,6	22,0±2,6	2,3±0,6	2,0±0,0
	70	29,0±1,0	21,3±3,7	0,0	0,0
	140	25,7±0,6	0,0	0,0	0,0

(a): Os valores do diâmetro das colônias (em mm) representam a média ± desvio padrão de pelo menos 4 experimentos independentes.

TABELA 7 - Caracterização das linhagens *veA1*, *inoB2*, *i*, *ppyn* e *CHL-14*, após o crescimento a 37 °C por 72 horas, em meio mínimo suplementado com tartarato de amônio (10 mM) e diferentes concentrações de nitrito de sódio.

TARTARATO DE AMÔNIO (10 mM) + NITRITO DE SÓDIO (mM)	(a)				
	DIÂMETRO				
	<i>veA1</i>	<i>inoB2</i>	<i>i</i>	<i>ppyn</i>	<i>CHL-14</i>
0	32,5±0,7	29,5±0,4	26,0±0,0	31,0±2,8	17,6±0,5
10	34,5±0,7	33,0±1,0	29,3±0,6	25,5±2,1	14,5±1,7
20	36,5±0,7	34,7±0,6	30,7±0,6	11,0±0,0	14,3±0,6
35	37,5±0,7	36,3±0,6	34,0±2,6	0,0	0,0
70	35,5±0,7	32,0±1,7	24,0±5,6	0,0	0,0
140	26,7±0,6	25,3±0,6	0,0	0,0	0,0

(a): Os valores do diâmetro das colônias (20 µm) representam a média ± desvio padrão de pelo menos 4 experimentos independentes.

resultado não foi observado para a linhagem 1 (Tabelas 6 e 7).

A Tabela 8 mostra que a sensibilidade ao nitrito apresentada pela linhagem 1, CHL-14 e ppyn parece não ter sido afetada pela temperatura de incubação. A dependência parcial da linhagem CHL-14 pelo fungicida cloroneb parece ser afetada pela temperatura de incubação e pela fonte de nitrogênio utilizada (Tabela 8).

A Tabela 9 mostra que cloreto de potássio 0,6 M praticamente não afeta a toxicidade do nitrito, quando as linhagens 1, ppyn e CHL-14 foram incubadas a 37 °C.

III.1.2. Análise genética

O número de locus envolvido na sensibilidade a elevadas concentrações de nitrito foi determinado através da análise dos segregantes meióticos provenientes do cruzamento entre a linhagem 1 e a MSF (conforme descrito no item II.7.3). Ascósporos sensíveis ao nitrito (140 mM) e normais segregaram na proporção 1:1 (Apêndice 1), indicando que um único locus é responsável por esta sensibilidade. Todos os segregantes sensíveis ao nitrito apresentaram, como a linhagem 1, morfologia compacta e ausência de conidiação. Os que cresciam em nitrito tinham morfologia normal, indicando que a mesma mutação seja provavelmente responsável por ambas características.

A análise mitótica dos segregantes haplóides provenientes do diplóide heterozigoto 1 // MSF (veja item II.7.2) mostrou que o locus responsável pela sensibilidade

TABELA 8 - Diâmetro de colônias (em mm) (a) das linhagens veA1, 1, ppyn e CHL-14, após crescimento por 72 horas nas temperaturas de 28, 37 e 42°C, em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de nitrogênio.

FONTE DE NITROGENIO (Conc.)	veA1			inoB2			1			ppyn			CHL-14			CHL-14 (b)		
	28°C	37°C	42°C															
Tartarato de amônio (10 mM)	19,3 (±0,6)	32,5 (±0,7)	25,7 (±1,9)	19,6 (±1,8)	29,5 (±0,4)	26,0 (±1,2)	12,0 (±0,0)	26,0 (±0,0)	17,5 (±2,4)	17,0 (±0,0)	30,0 (±0,0)	19,0 (±2,2)	14,5 (±0,6)	17,6 (±1,0)	16,7 (±0,8)	11,7 (±0,5)	21,0 (±2,8)	12,5 (±0,6)
Nitrato de sódio (70 mM)	22,7 (±0,6)	37,0 (±1,4)	25,7 (±4,3)	20,7 (±1,4)	35,7 (±1,5)	28,0 (±0,6)	11,0 (±1,4)	25,5 (±0,7)	18,7 (±1,2)	21,7 (±0,5)	40,0 (±0,0)	31,0 (±1,2)	12,5 (±0,6)	21,3 (±0,5)	24,2 (±3,1)	17,2 (±0,9)	29,5 (±0,7)	19,2 (±2,7)
Nitrito de sódio (10 mM)	18,5 (±0,6)	32,5 (±0,7)	23,2 (±3,1)	21,8 (±0,8)	33,7 (±0,6)	25,0 (±1,0)	13,0 (±2,8)	24,0 (±0,0)	17,2 (±0,9)	18,3 (±0,6)	37,0 (±0,0)	21,7 (±3,6)	16,5 (±0,6)	26,7 (±0,9)	19,7 (±2,1)	15,2 (±1,9)	28,7 (±0,6)	21,0 (±3,0)
Nitrito de sódio (35 mM)	17,7 (±0,6)	29,0 (±1,4)	21,0 (±1,7)	19,9 (±1,2)	31,3 (±0,6)	26,0 (±1,0)	11,3 (±0,6)	22,0 (±2,6)	13,7 (±4,6)	0,0 (±0,6)	2,3 (±0,6)	3,2 (±0,5)	0,0	2,0 (±0,0)	3,5 (±0,6)	2,0 (±0,0)	4,3 (±0,6)	7,0 (±1,0)
Nitrito de sódio (70 mM)	16,0 (±0,7)	29,7 (±0,6)	26,2 (±2,9)	16,3 (±1,9)	29,0 (±1,0)	26,0 (±1,0)	9,0 (±1,0)	21,3 (±3,7)	11,2 (±3,8)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Nitrito de sódio (140 mM)	8,0 (±1,0)	25,5 (±0,7)	28,0 (±3,4)	7,0 (±0,6)	25,7 (±0,6)	25,5 (±0,7)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

(a): Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da média dos diâmetros da colônias.

(b): O meio mínimo foi suplementado com 52 µg de chloroneb por mililitro de meio.

TABELA 9 - Caracterização das linhagens *veA1*, *ppyn*, CHL-14 e 1, após o crescimento a 37 C por 72 horas, em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de nitrogênio, na presença e ausência de cloreto de potássio (0,6 M).

FONTE DE NITROGÊNIO (concentração)	CLORETO DE POTÁSSIO (0,6 M)	(a) DIÂMETRO			
		<i>veA1</i>	<i>ppyn</i>	CHL-14	1
Tartarato de amônio (10 mM)	ausente	32,5±0,7	30,0±0,0	17,6±0,5	26,0±0,0
	presente	39,0±2,0	39,7±2,0	14,5±0,7	25,5±0,7
Nitrato de sódio (70 mM)	ausente	37,0±1,4	40,0±0,0	17,2±0,5	25,5±0,7
	presente	35,5±0,7	31,5±0,7	11,5±0,7	18,0±1,4
Nitrito de sódio (70 mM)	ausente	29,7±0,6	0,0	0,0	21,3±3,7
	presente	34,0±0,0	0,0	0,0	19,5±0,7
Nitrito de sódio (140 mM)	ausente	25,5±0,7	0,0	0,0	0,0
	presente	29,0±1,4	0,0	0,0	0,0

(a): Os valores do diâmetro das colônias (em mm) representam a média ± desvio padrão de pelo menos 4 experimentos independentes.

n.d.: não determinado.

ao nitrito está localizado no grupo de ligação II, pois não foi observado segregantes dos tipos $acr \overset{s}{+} nih$ ou $acr \overset{r}{-} nih$ (Apêndice 2). Este locus passou a ser designado nihB e a mutação nihB1. O crescimento normal do diplóide heterozigoto nihB1 // MSF em nitrito (140 mM), indicou que esta mutação é recessiva. A frequência de recombinação meiótica entre nihB e acRA, ambos no mesmo grupo de ligação, foi de 42% (Apêndice 3), indicando que não deve haver ligação genética entre eles.

III.1.3. Análise bioquímica

A velocidade de captação de nitrato e nitrito pelos mutantes ppyn e CHL-14 foram medidas em diversas condições experimentais, como descrito no item II.8. Pelo fato da linhagem 1 não apresentar confídios, a captação de nitrato e nitrito desta linhagem não foi analisada.

III.1.3.1. Captação de nitrato

A Figura 4 mostra que a desrepressão da captação de nitrato ocorre após cerca de 180 minutos, quando o micélio da linhagem selvagem é incubado a 37 °C em meio suplementado com nitrato de sódio 500 µM. A linhagem ppyn só inicia a captação de nitrato após 270 minutos, sendo este atraso em relação a linhagem selvagem praticamente corrigido pela mutação chl14 (Figura 4). Independentemente deste aspecto, os

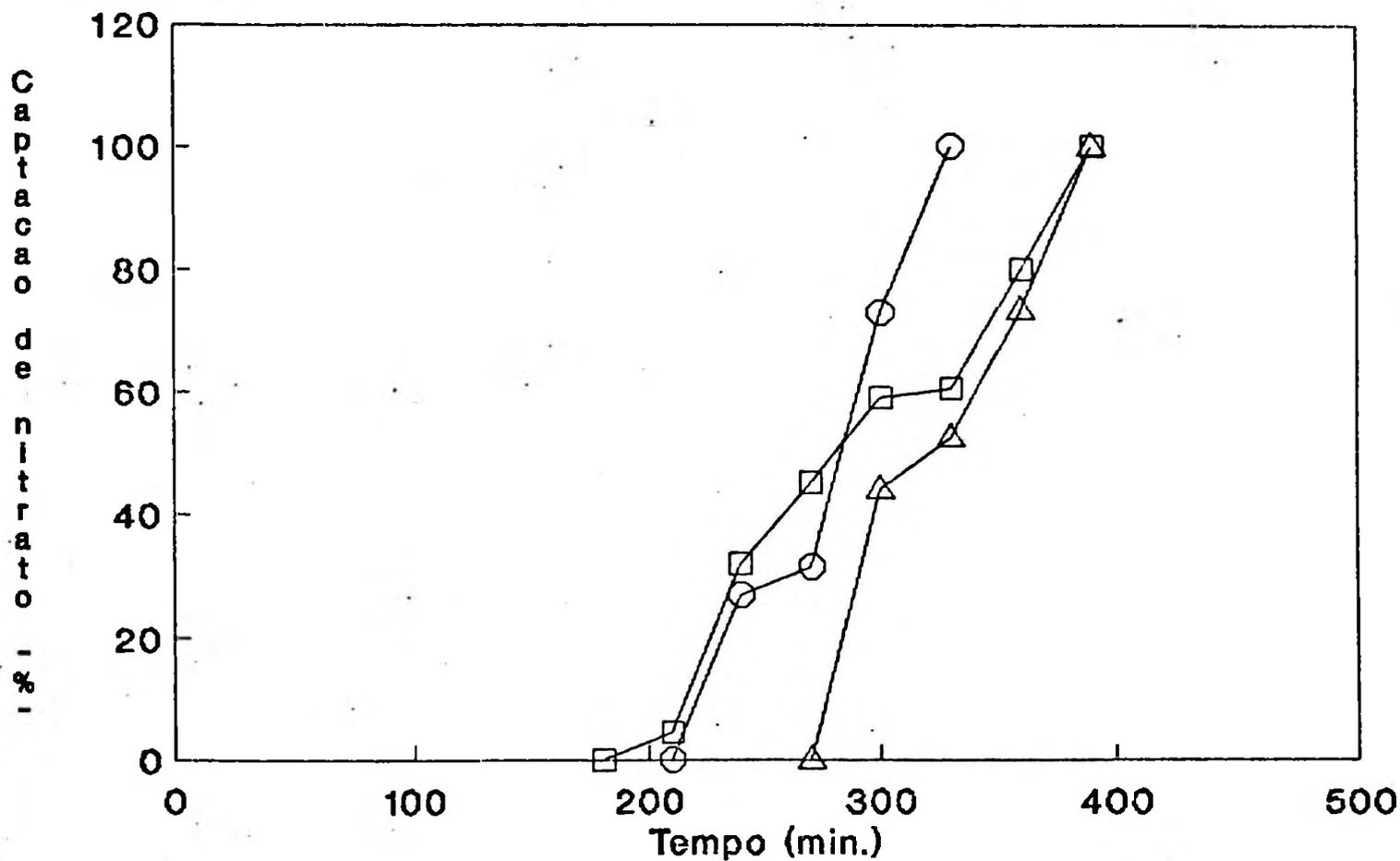


FIGURA 4 - Captação de nitrato (500 μ M) pelo micélio das linhagens selvagem (\square), ppyn (\triangle) e CHL-14 (\circ) em função do tempo.

valores das velocidades de captação de nitrato pelas linhagens ppyn e CHL-14 é cerca de duas vezes aquele obtido para a linhagem selvagem (Figura 4). Esta evidência parece indicar que a saturação da captação pelos mutantes ocorre em concentrações menores de nitrato. Um fenômeno semelhante é observado para a captação de nitrito 500 μM , ou seja, um atraso em cerca de 1 hora na desrepressão da captação pela linhagem ppyn e correção deste efeito na linhagem CHL-14 (Figura 5). Entretanto, a velocidade de captação de nitrito pela linhagem ppyn é menor que a mostrada pelas linhagens selvagem e CHL-14 (Figura 5), sugerindo que a saturação da captação somente ocorre em concentrações mais elevadas de nitrito.

A Figura 6 mostra como exemplo, curvas de captação de nitrato pelos conídios das linhagens *biA1 facA303*, ppyn e CHL-14. A partir de curvas como estas, foram calculadas as velocidades estacionárias de captação (v) para cada concentração de nitrato testada (Figura 6A). A linhagem *biA1 facA303* mostra uma curva bifásica para o gráfico da velocidade de captação em função da concentração de nitrato, o que pode indicar a existência de dois sistemas de captação (Figura 6A): um de menor afinidade, cujo valor estimado da K_s é cerca de 1,1 mM e outro de maior afinidade, com o valor estimado da K_s igual a 0,5 mM (Tabela 10). O respectivo gráfico do duplo-recíproco mostra concavidade para baixo (Figura 6B), com coeficiente de Hill igual a 0,9 (Figura 6C), característica de cooperatividade negativa. Porém, quando consideramos somente as velocidades determinadas para as concentrações de 0,8 a 5,5 mM, o coeficiente de Hill foi igual a 1,95 (Figura 6C'). E quando

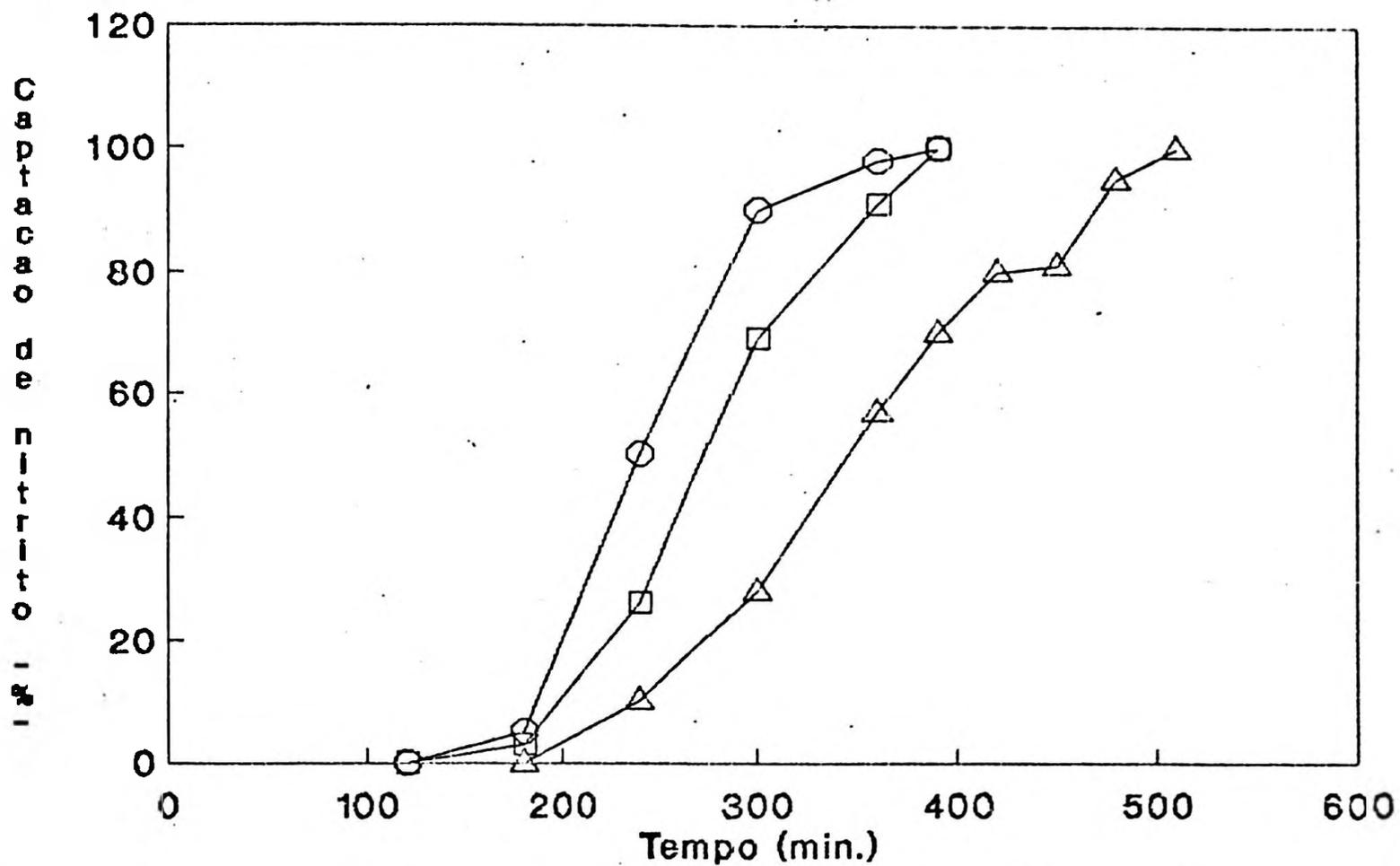
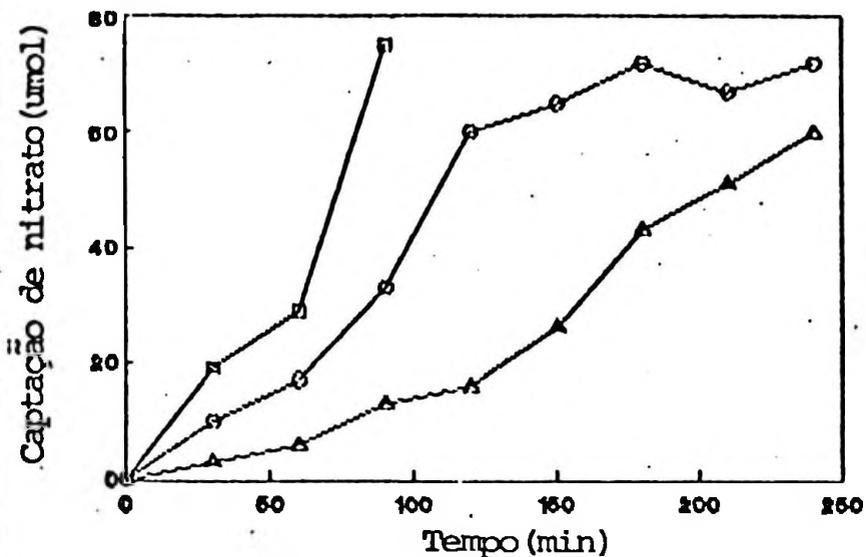
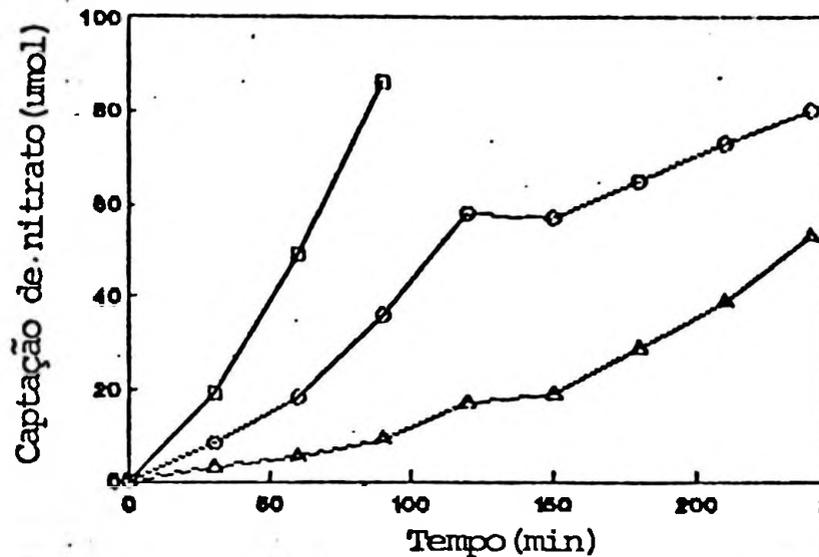


FIGURA 5 - Captação de nitrito (500 µM) pelo micélio das linhagens selvagem (□), ppyn (△) e CHL-14 (○) em função do tempo.

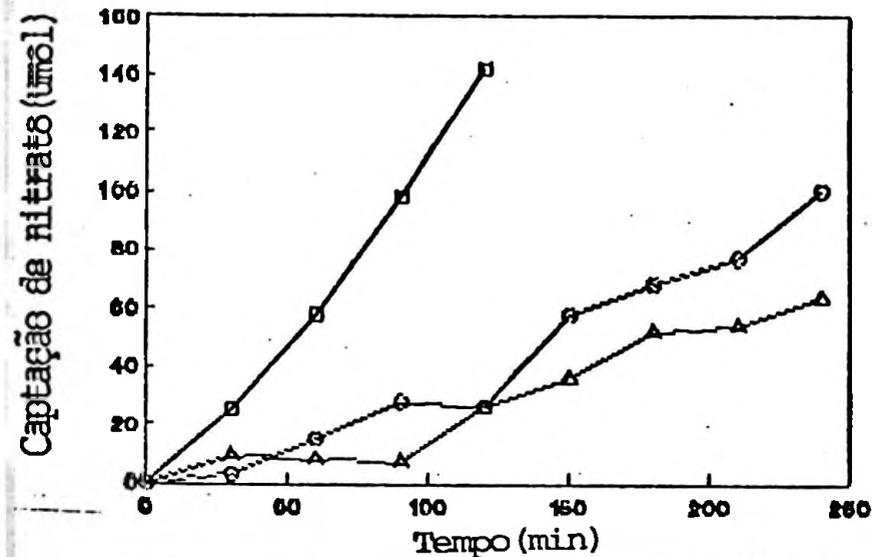
(I)



(II)



(III)



(IV)

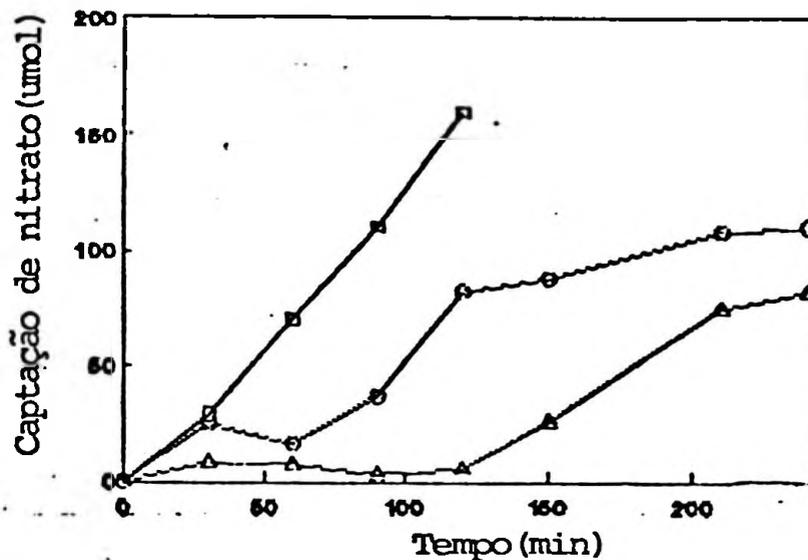


FIGURA 6 - Captação de nitrato pelos conídios das linhagens biAl facA303 (□), ppyn (Δ) e CHL-14 (○) em função do tempo. As concentrações de nitrato usadas foram: 500 μM (I), 1000 μM (II), 2500 μM (III) e 5000 μM (IV).

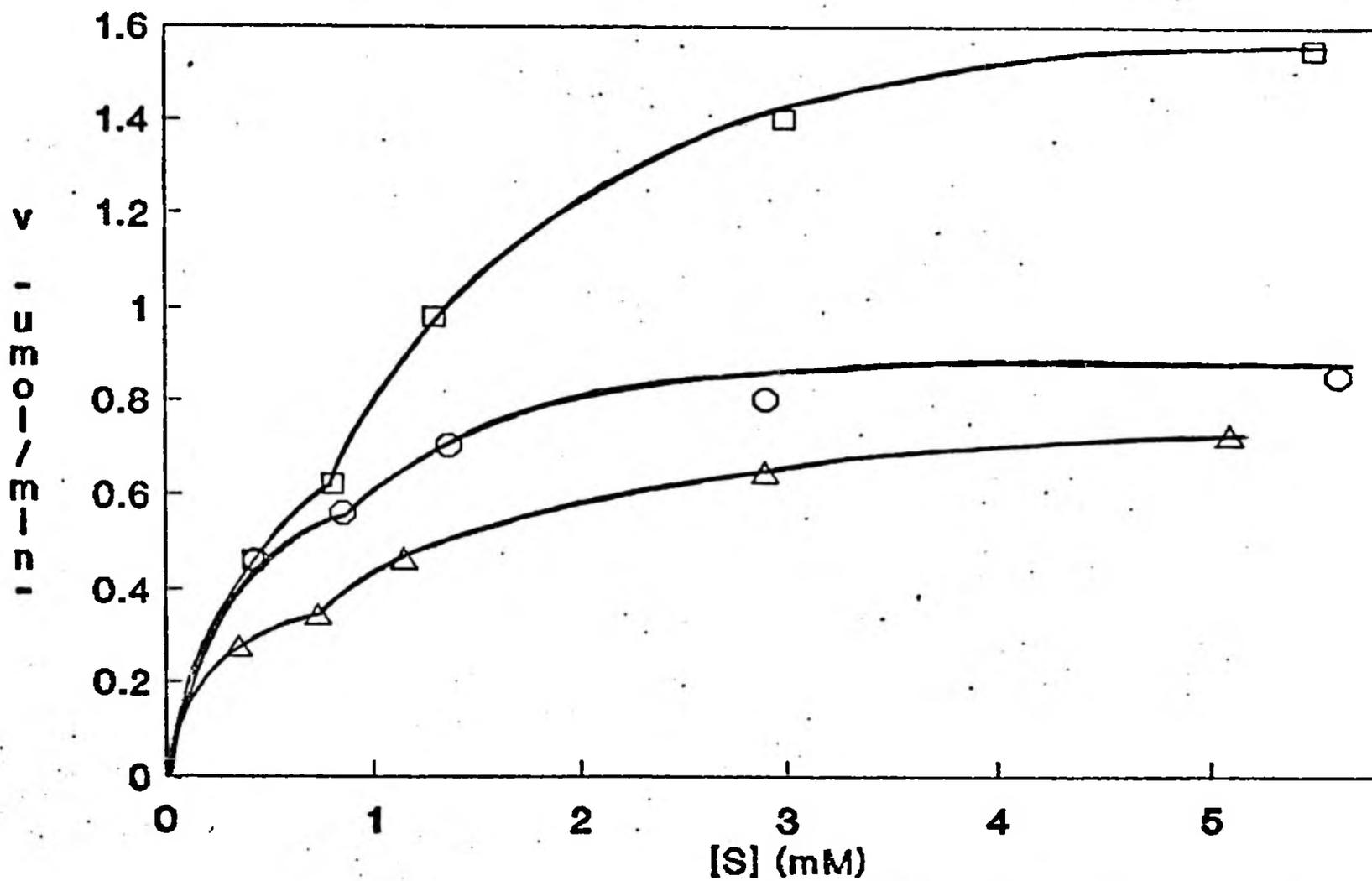


FIGURA 6A - Velocidades iniciais de captação de nitrato, em função da sua concentração, para os conídios das linhagens biAl facA303 (□), ppyn (△) e CHL-14 (○).

TABELA 10 - Parâmetros cinéticos estimados para o sistema de captação de nitrato em *A. nidulans*.

LINHAGEM	CONCENTRAÇÃO (mM)	K _s (mM)	V _{lim} (μ mol/min)	h
biA1 facA303	0 a 0,8	0,5	1,0	—
	0 a 5,5	1,8	2,2	0,9
	0,8 a 5,5	1,1	1,6	1,95
ppyn	0 a 0,7	0,2	0,45	—
	0 a 5,1	1,0	0,88	0,88
	0,7 a 5,1	1,1	0,88	1,0
CHL-14	0 a 0,8	0,3	0,7	—
	0 a 5,6	0,52	0,9	0,88
	0,8 a 5,6	0,46	0,9	1,25

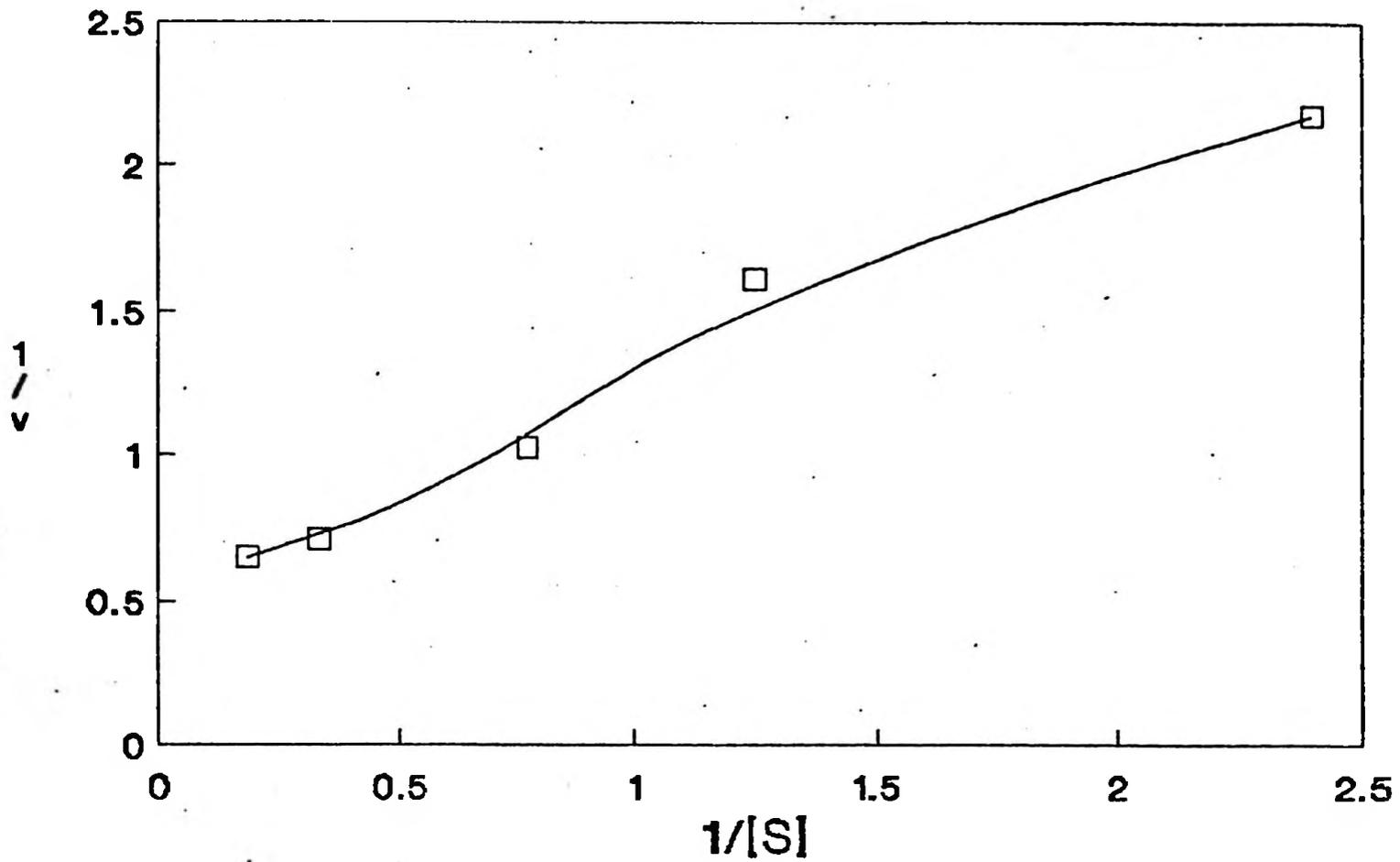


FIGURA 6B - Gráfico duplo-recíproco da velocidade de captação de nitrato, em função da sua concentração inicial, para a linhagem biA1 facA303.

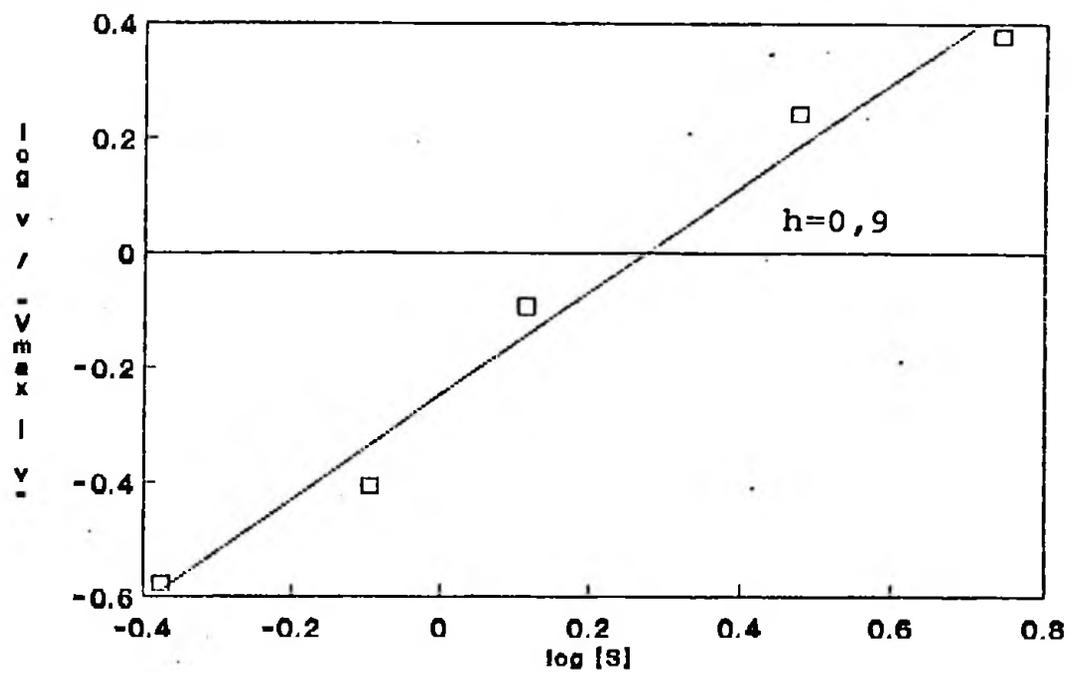


FIGURA 6C - Gráfico de Hill [$\log v / (V_{max} - v)$ vs. \log da concentração inicial de nitrato] para a linhagem biA1 facA303.

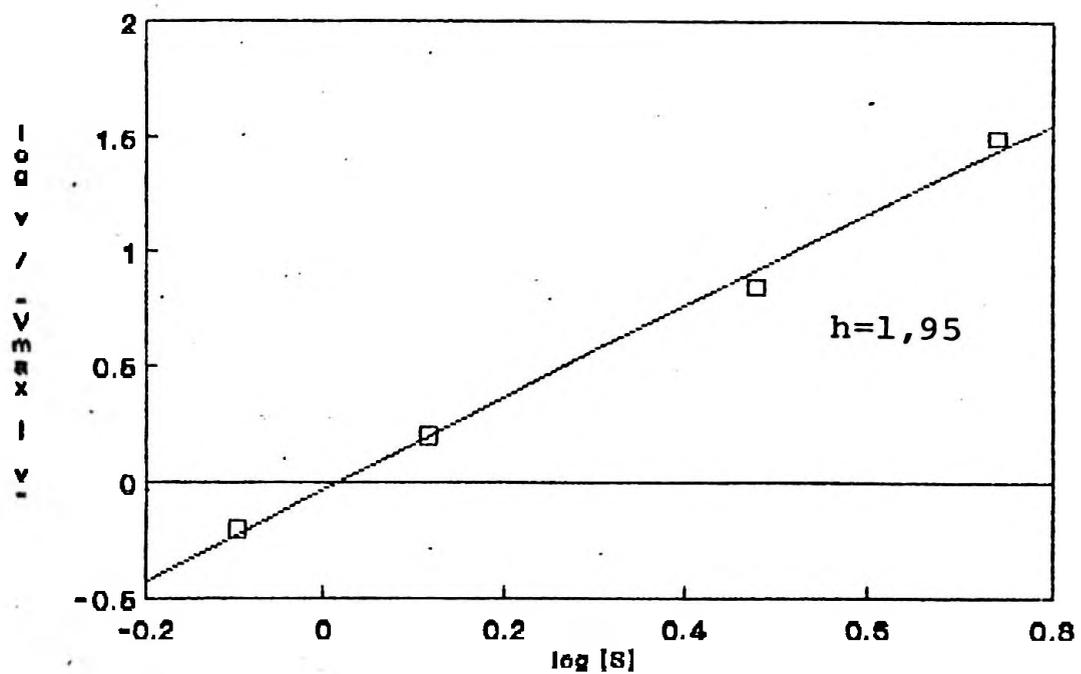


FIGURA 6C' - Gráfico de Hill para a linhagem biAl facA303 (calculado para as concentrações de 0,8 a 5,5 mM).

plotamos o duplo-recíproco das velocidades de captação de nitrato para a linhagem selvagem obtidas por Brownlee e Arst (1983), também observamos um coeficiente de Hill maior que 1 (Figura 6C''). Esse mesmo comportamento foi observado para as linhagens ppyn e CHL-14, que mostraram duplo-recíprocos não lineares (Figuras 6D e 6F), com coeficientes de Hill iguais a 0,88 (Figuras 6E e 6G e Tabela 10). No entanto, para as concentrações de 0,7 a 5,6 mM, os coeficientes de Hill foram iguais a 1,0 e 1,25 (Figuras 6E' e 6G' e Tabela 10). Estas linhagens exibem, respectivamente, valores estimados de K_s para o sistema de baixa afinidade iguais a 1,1 e 0,46 mM e para o sistema de alta afinidade iguais a 0,2 e 0,3 mM (Tabela 10).

III.1.3.2. Captação de nitrito

Algumas curvas de captação de nitrito em função do tempo estão mostradas na Figura 7. As velocidades de captação em função da concentração de nitrito, calculadas para cada linhagem estudada, estão mostradas na Figura 7A. A linhagem b1A1 facA303 mostra uma curva de saturação aparentemente hiperbólica com uma provável inibição pelo substrato, sugerindo a existência de pelo menos uma permease para nitrito, com um valor estimado para a K_s igual a 0,64 mM (Tabela 11). O gráfico dos duplo-recíprocos (Figura 7B) apresenta uma ligeira concavidade para cima com coeficiente de Hill igual a 1,1 (Figura 7C). Embora estes resultados sejam pouco acentuados, eles poderiam ser considerados como reflexo de uma cinética de

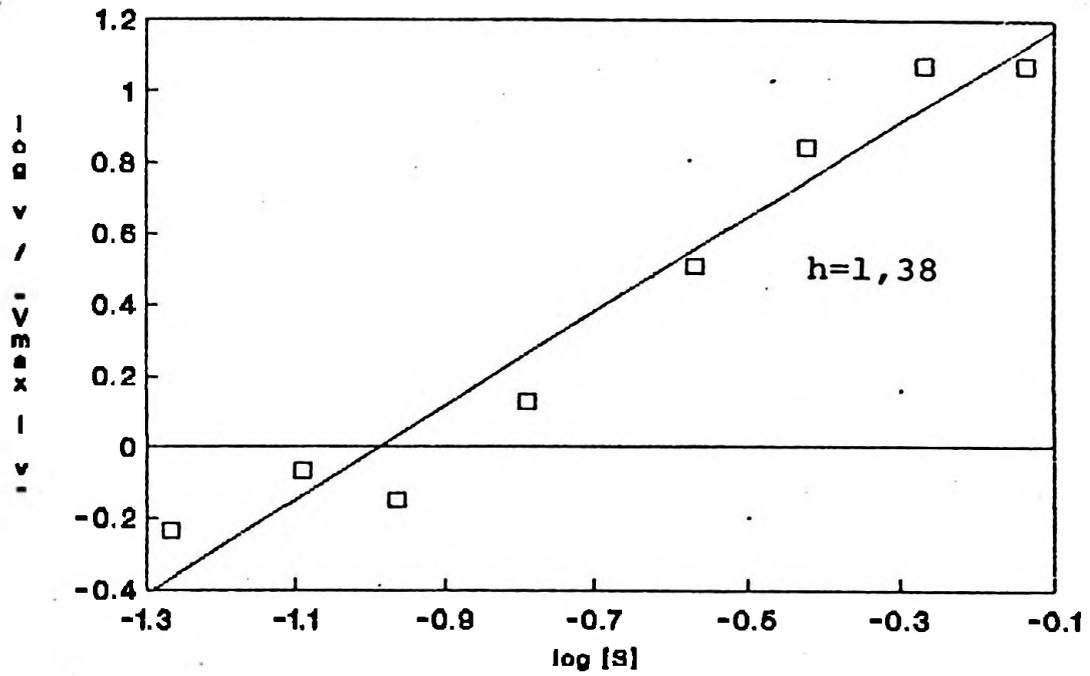


FIGURA 6C'' - Gráfico de Hill para a linhagem selvagem de *A. nidulans* [calculado a partir dos dados obtidos por Brownlee e Arst (1983)].

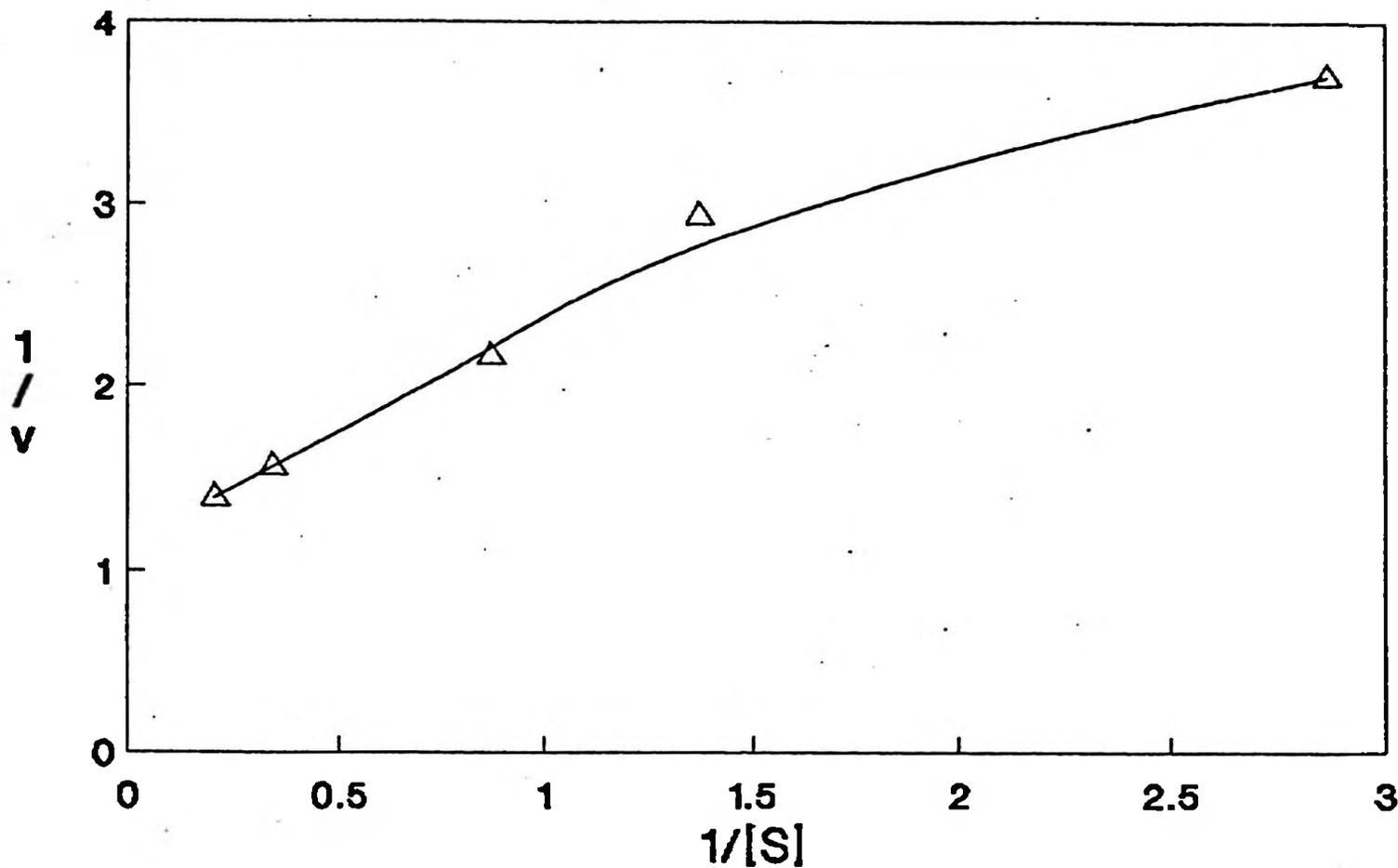


FIGURA 6D - Gráfico duplo-recíproco da velocidade de captação de nitrato, em função da sua concentração inicial, para a linhagem ppyn.

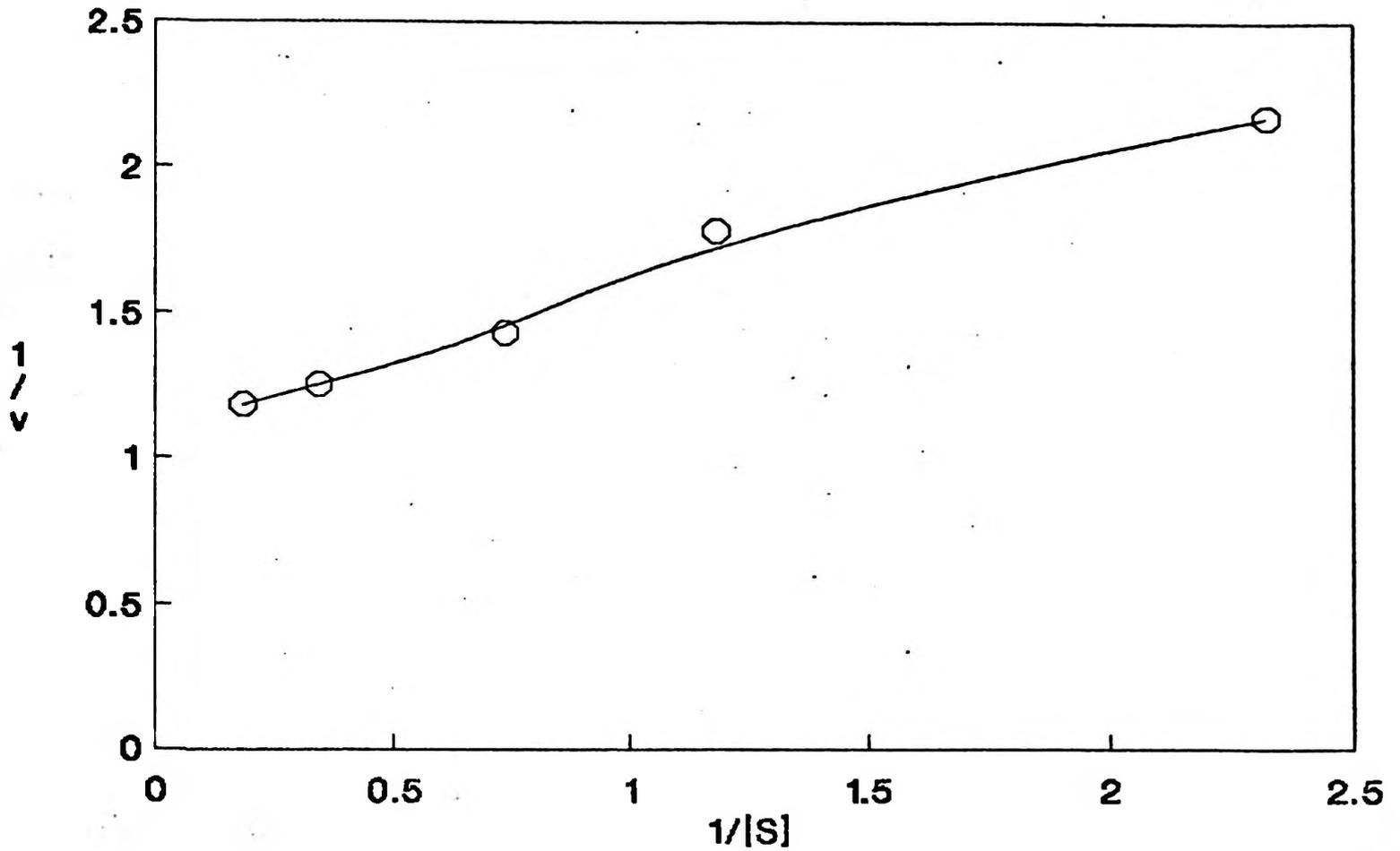


FIGURA 6F - Gráfico duplo-recíproco da velocidade de captação de nitrato, em função da sua concentração inicial, para a linhagem CHL-14.

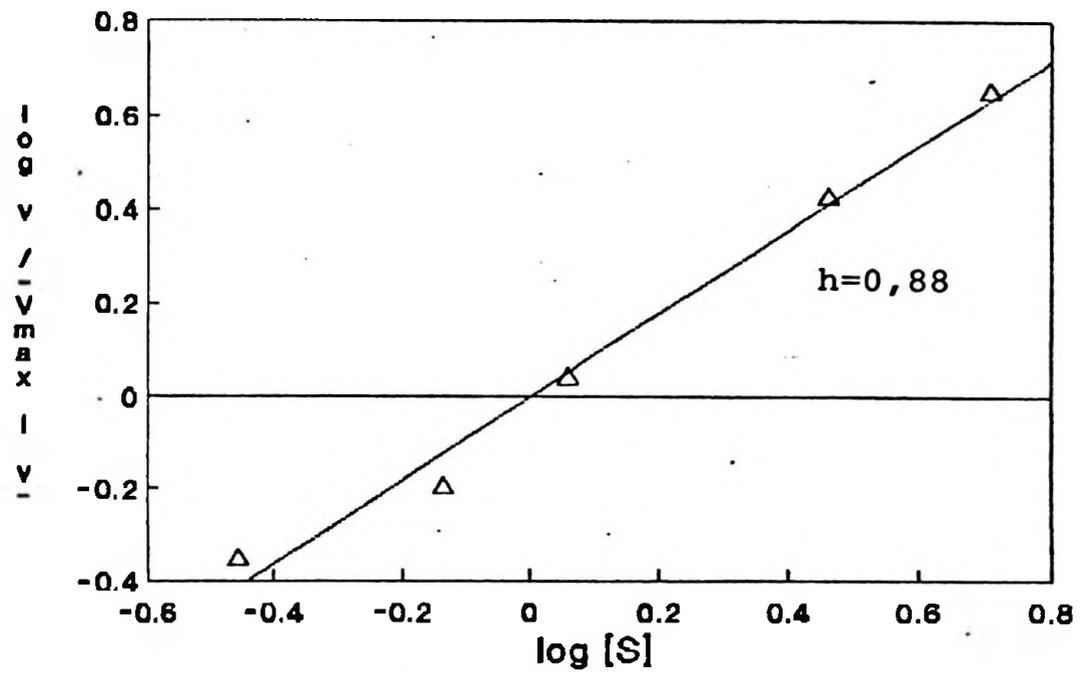


FIGURA 6E - Gráfico de Hill [$\log v / (V_{max} - v)$] vs. \log da concentração inicial de nitrato] para a linhagem ppyN.

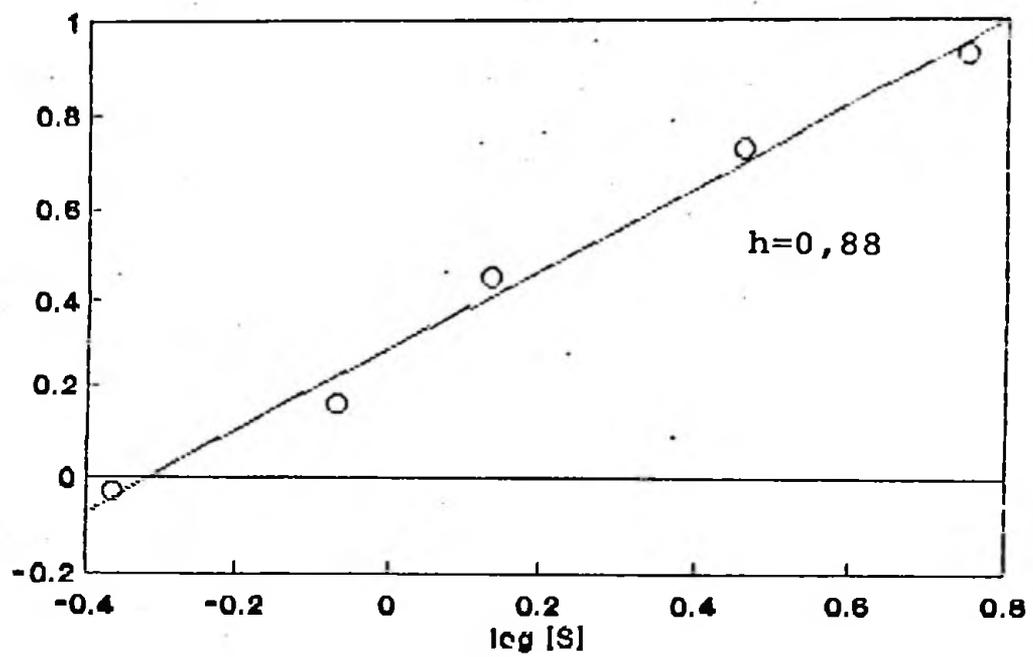


FIGURA 6G - Gráfico de Hill [$\log v / (V_{max} - v)$ vs. \log da concentração inicial de nitrato] para a linhagem CHL-14.

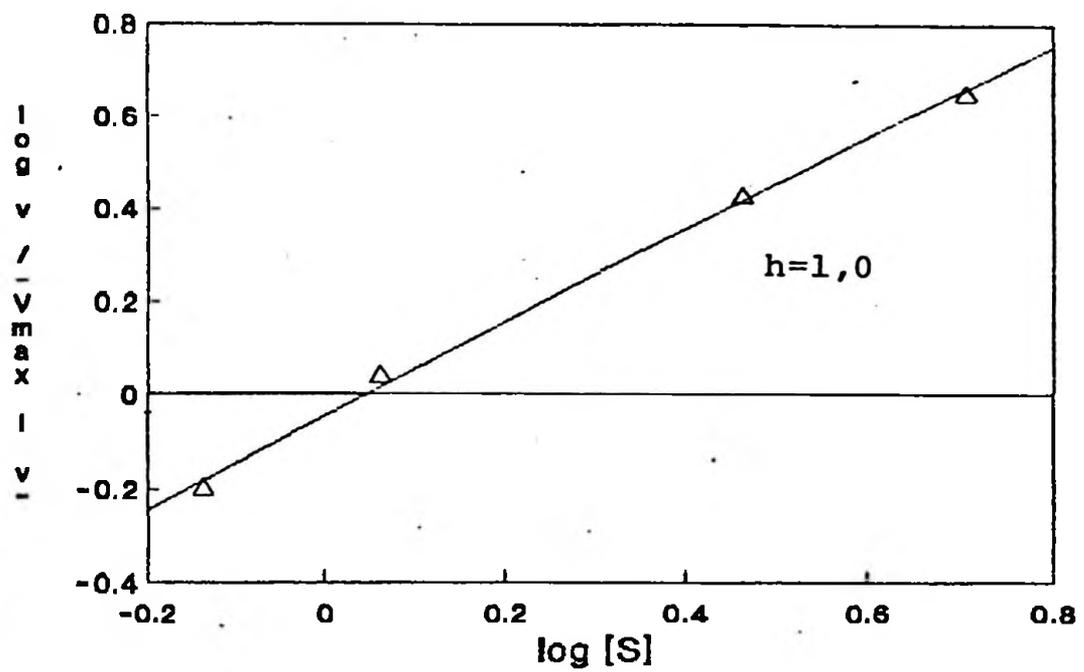


FIGURA 6E' - Gráfico de Hill para a linhagem PPNh (calculado para as concentrações de 0,7 a 5,1 mM).

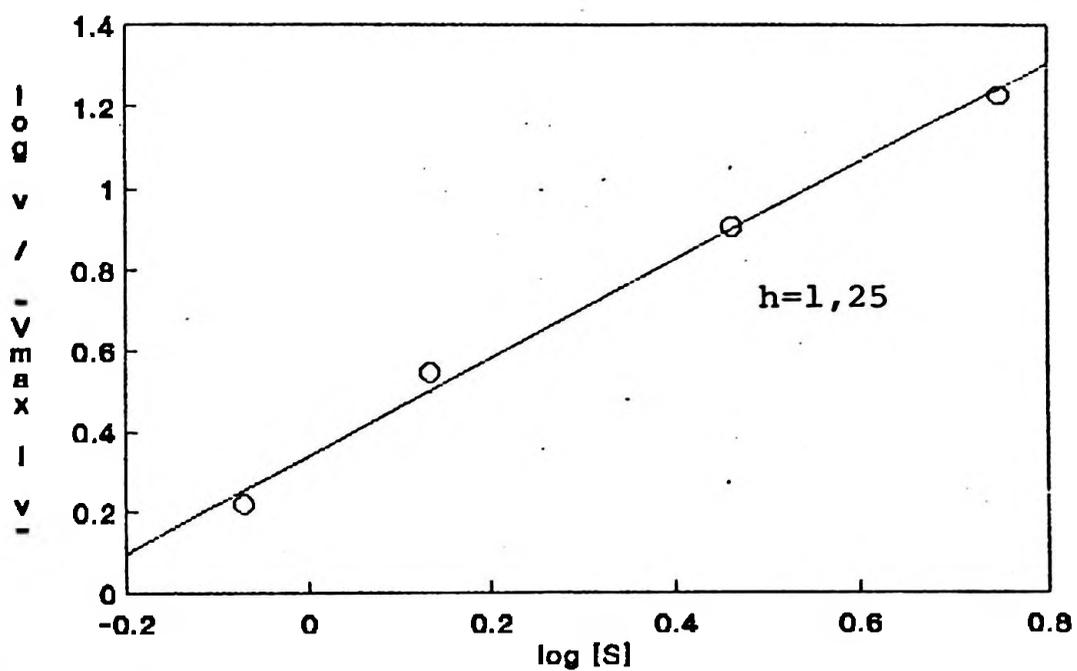
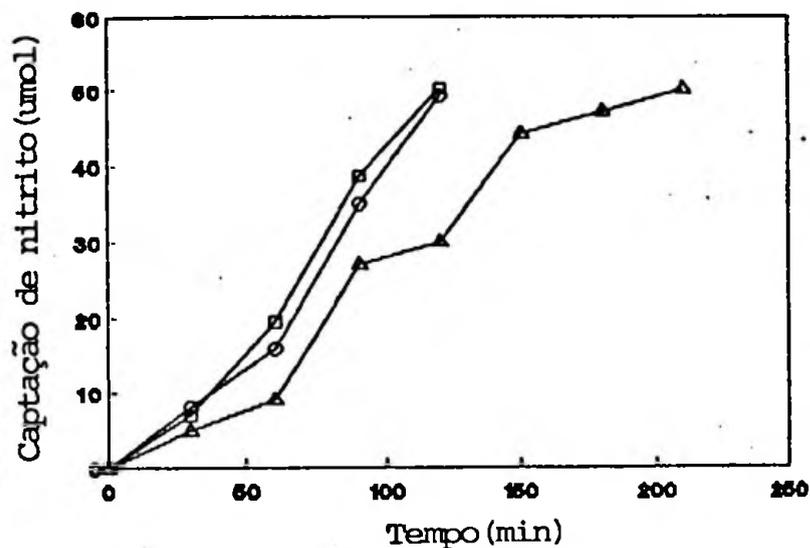
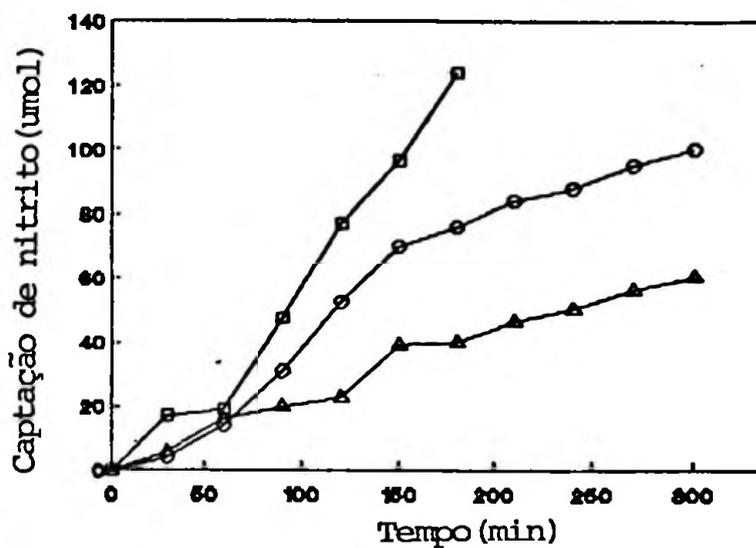


FIGURA 6G' - Gráfico de Hill para a linhagem CHL-14 (calculado para as concentrações de 0,8 a 5,6 mM).

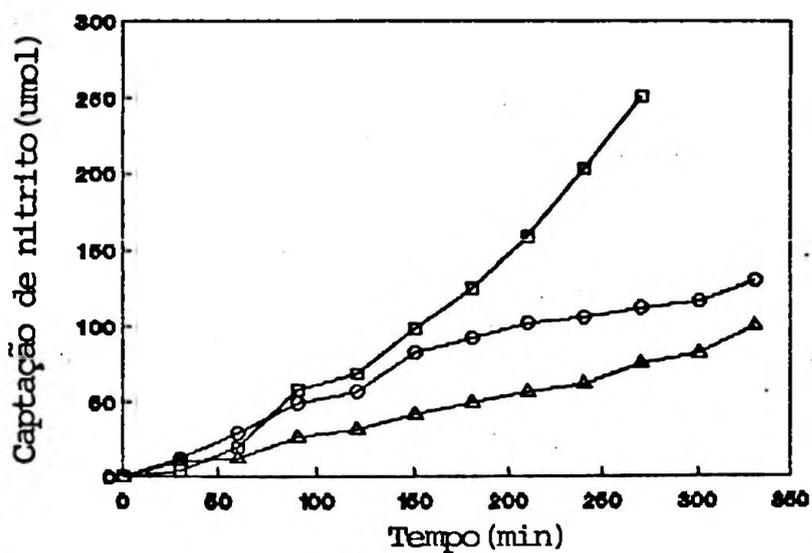
(I)



(II)



(III)



(IV)

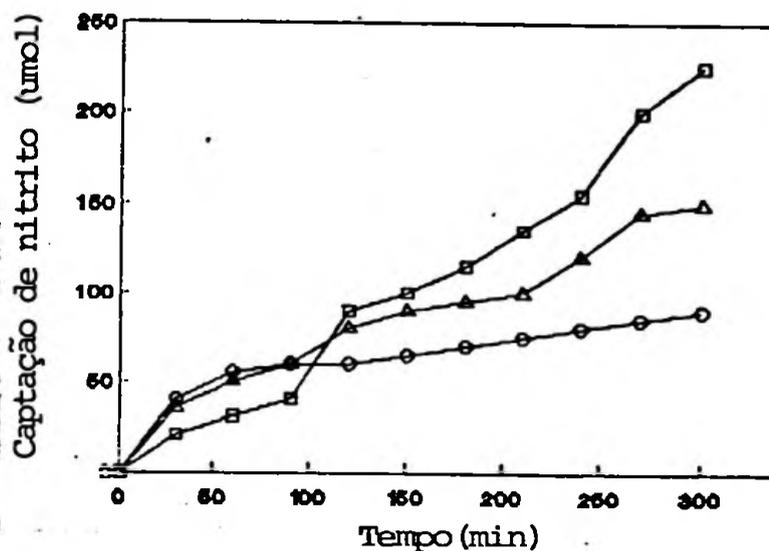


FIGURA 7 - Captação de nitrito pelos conídios das linhagens biAl facA303 (□), ppyn (△) e CHL-14 (○) em função do tempo. As concentrações de nitrito usadas foram: 500 μ M (I), 1000 μ M (II), 2500 μ M (III) e 5000 μ M (IV).

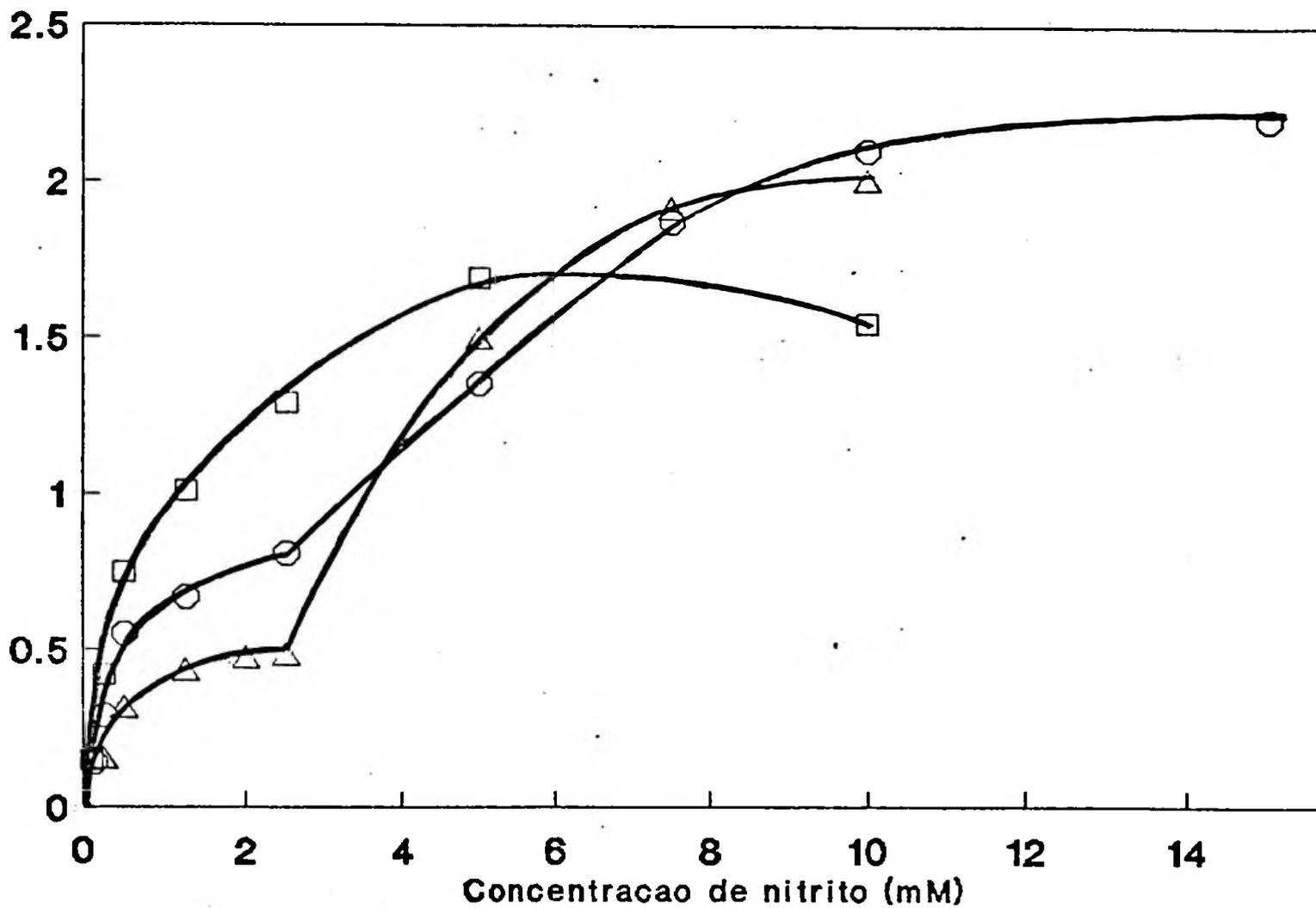


FIGURA 7A - Velocidades iniciais de captação de nitrito, em função da sua concentração, para os conídios das linhagens biA1 facA303 (□), ppyn (△) e CHL-14 (○).

TABELA 11 - Parâmetros cinéticos estimados para o sistema de captação de nitrito em *A. nidulans*.

LINHAGEM	CONCENTRAÇÃO (mM)	Ks (mM)	V _{lin} (μ mol/min)	h
biA1 facA303	0 a 5	0,64	1,7	1,1
ppyn	0 a 2,5	0,23	0,5	1,7
	2,5 a 10	41,0	2,0	3,2
CHL-14	0 a 2,5	0,14	0,82	1,8
	2,5 a 15	23,6	2,2	2,6

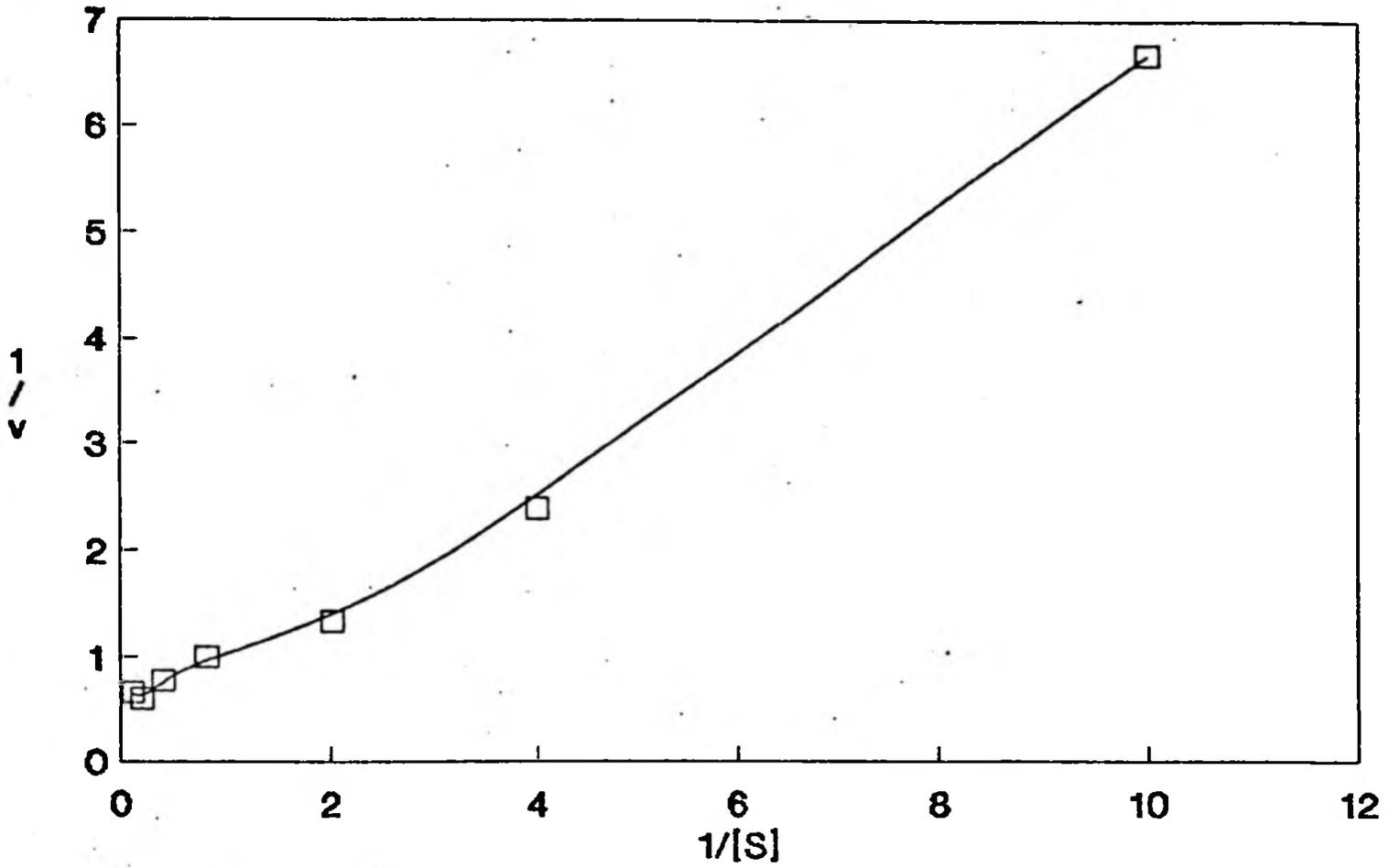


FIGURA 7B - Gráfico duplo-recíproco da velocidade de captação de nitrito, em função da sua concentração inicial, para a linhagem bbAA1 facA303.

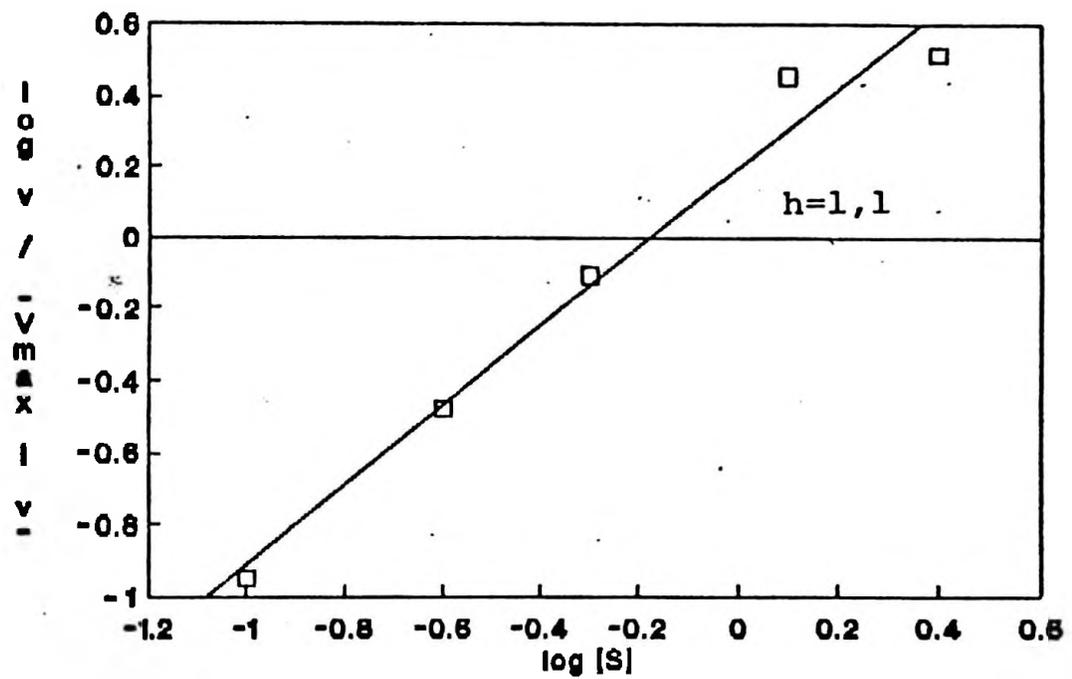


FIGURA 7C - Gráfico de Hill [$\log v / V_{max} - v$] vs. \log da concentração inicial de nitrito] para a linhagem biA1 facA303.

estado estacionário, com cooperatividade positiva. A Figura 7A mostra uma curva bifásica para representação gráfica de v em função da concentração de nitrito mais acentuada para a linhagem ppyn do que para a linhagem CHL-14. Os gráficos dos respectivos duplo-recíprocos para a captação de nitrito também produzem curvas bifásicas para as linhagens ppyn e CHL-14 (Figuras 7D e 7F), cujos valores de K_s foram, respectivamente, iguais a 40,9 e 23,6 mM para o sistema de baixa afinidade e 0,23 e 0,14 mM para o sistema de alta afinidade (Tabela 11). É interessante observar que os gráficos de Hill obtidos para ambas linhagens, também são curvas bifásicas, e os coeficientes obtidos são 0,46 e 3,2 para a linhagem ppyn e 0,61 e 2,6 para a linhagem CHL-14 (Figura 7E, 7E', 7G e 7G'e Tabela 11). Coeficientes de Hill maiores que 1 (respectivamente 1,7 e 1,8) para as concentrações mais baixas de nitrito (Figuras 7E'' e 7G''e Tabela 11), parecem confirmar uma saturação rápida da captação, via uma cinética de estado estacionário com cooperatividade positiva. De qualquer modo, a permease para nitrito parece ser independente da permease para nitrato, pois não foi observada uma redução significativa na captação de nitrito pela linhagem biA1 facA303 na presença de várias concentrações de nitrato (Figura 8).

III.1.2.3. Efeito da amônia na captação de nitrito

A captação de nitrito parece estar, a exemplo da captação de nitrato, sob a ação repressiva da

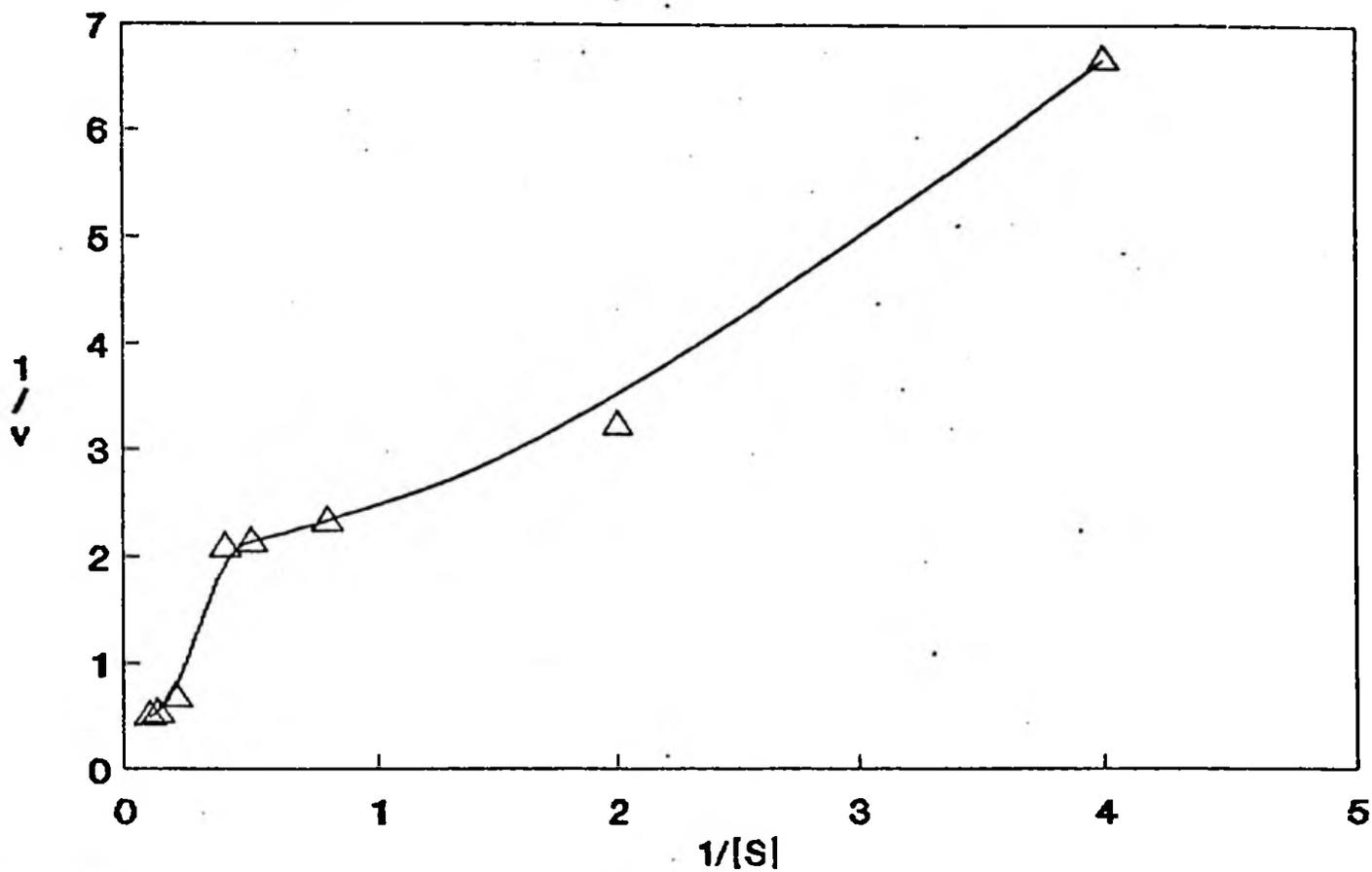


FIGURA 7D - Gráfico duplo-recíproco da velocidade de captação de nitrito, em unção da sua concentração inicial, para linhagem ppyn.

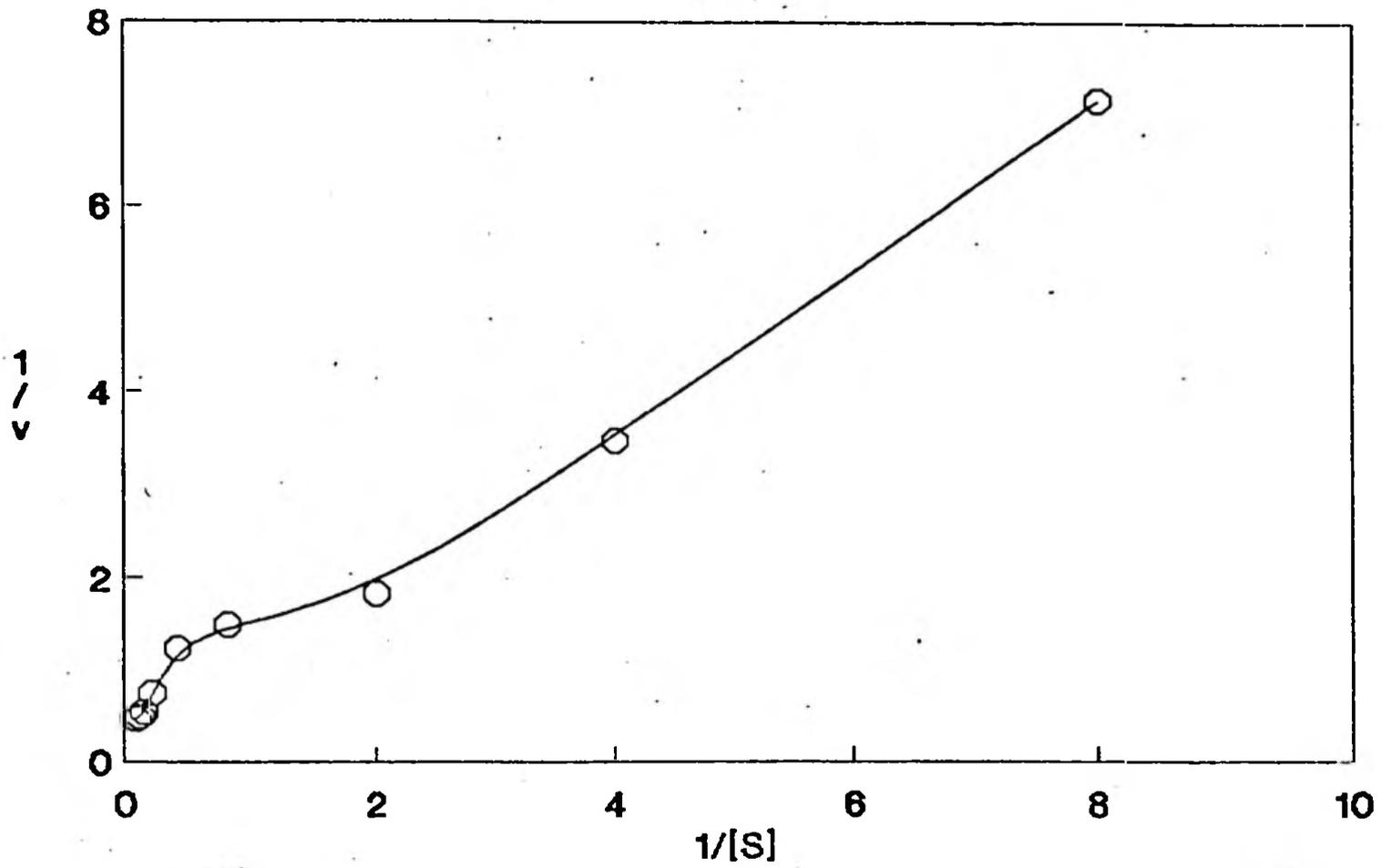


FIGURA 7F - Gráfico duplo-recíproco da velocidade de captação de nitrito, em função da sua concentração inicial, para a linhagem CHL-14.

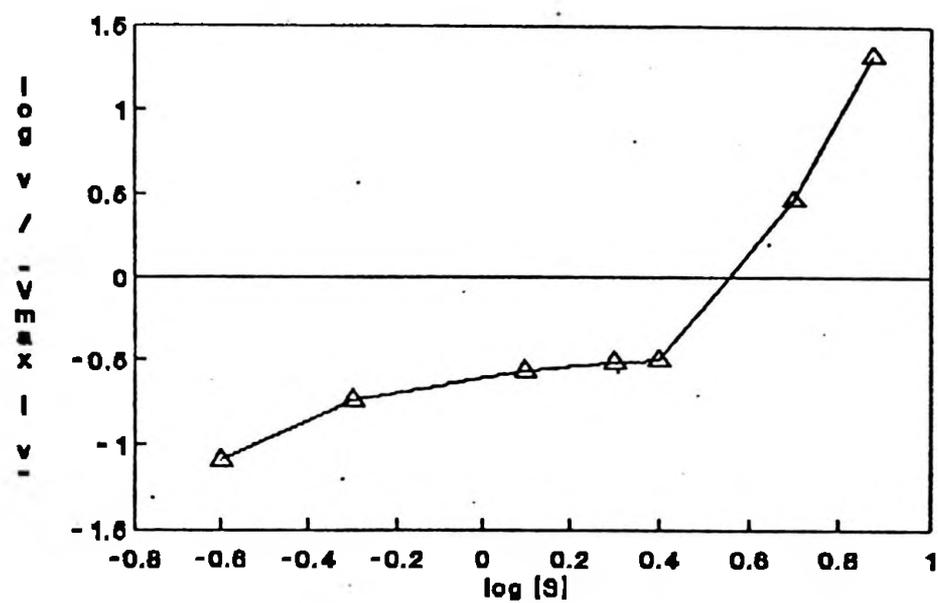


FIGURA 7E - Gráfico de Hill [$\log v / (V_{max} - v)$] vs. \log da concentração inicial de nitrito] para a linhagem ppyn.

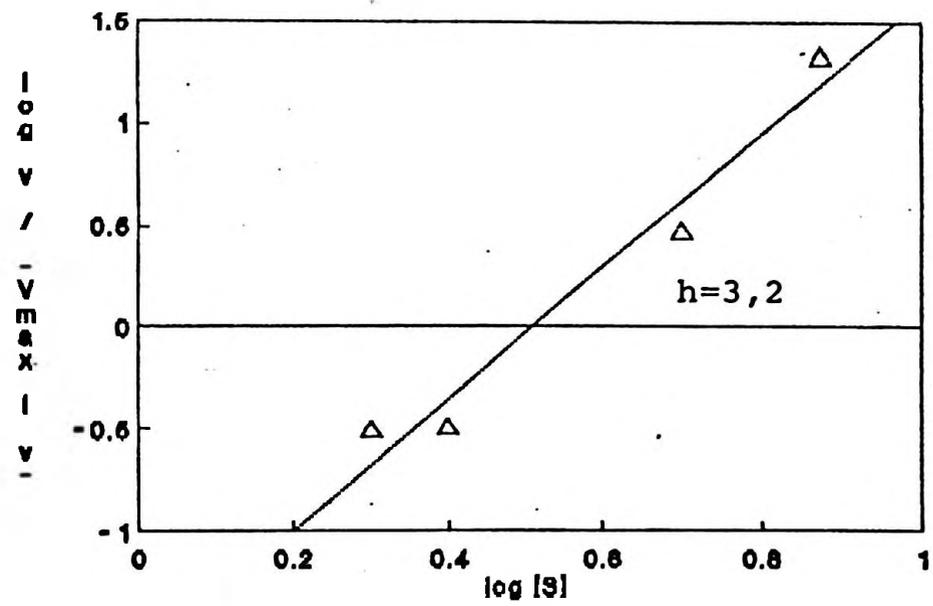


FIGURA 7E' - Gráfico de Hill para a linhagem PFWN (calculado para as concentrações de 2,5 a 10 mM).

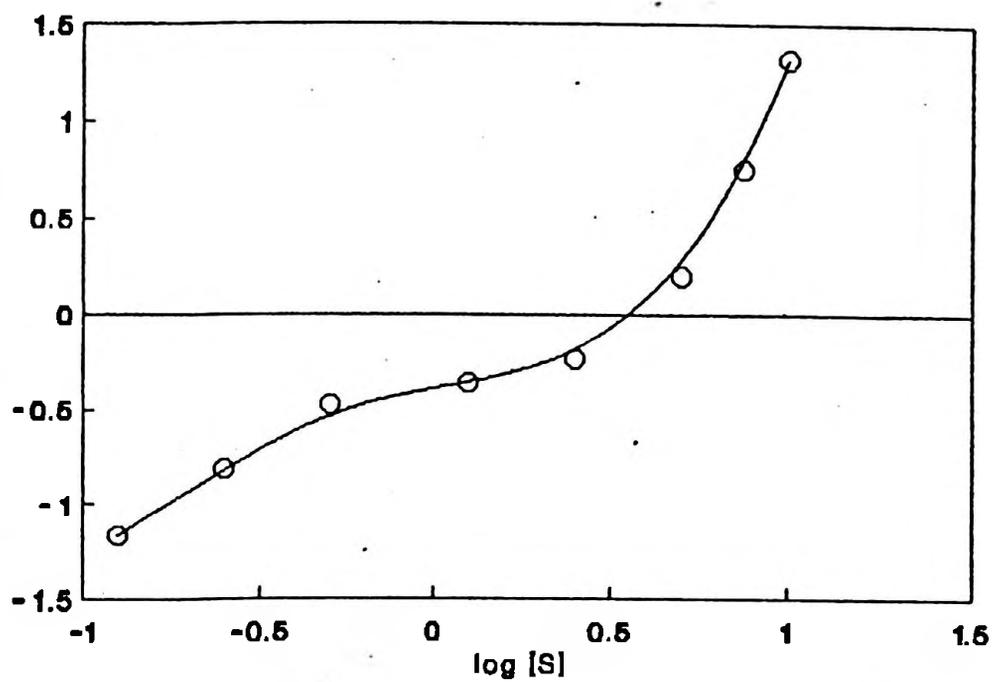


FIGURA 7G - Gráfico de Hill [$\log v / (V_{max} - v)$] vs. \log da concentração inicial de nitrito] para a linhagem CHL-14.

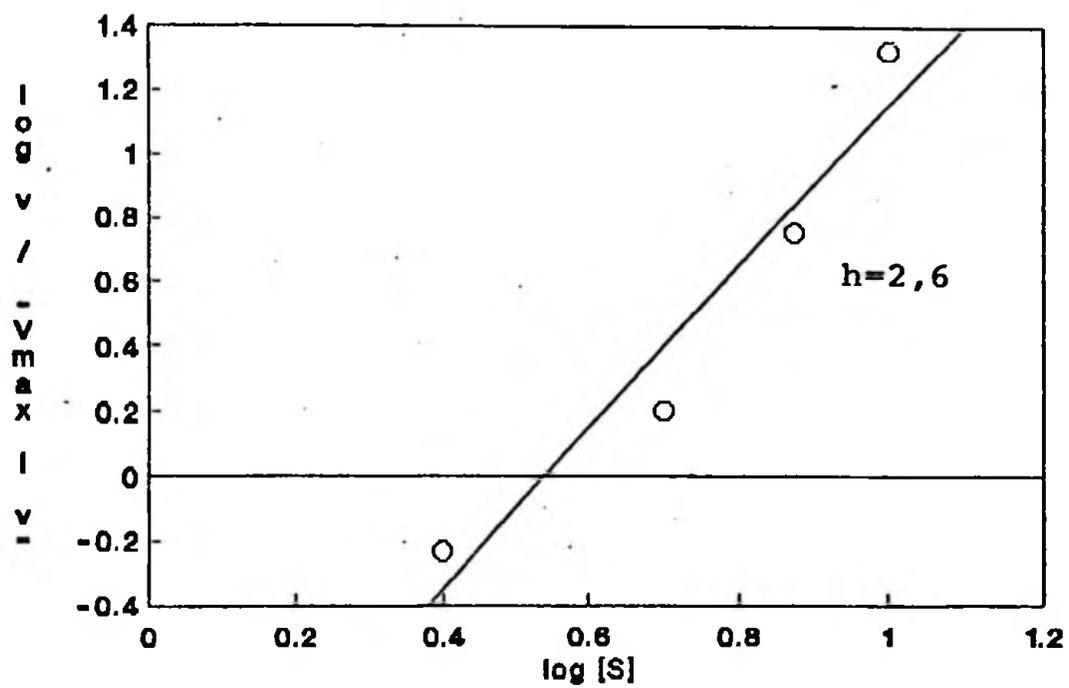


FIGURA 7G' - Gráfico de Hill para a linhagem CHL-14 (calculado para as concentrações de 2,5 a 15 mM).

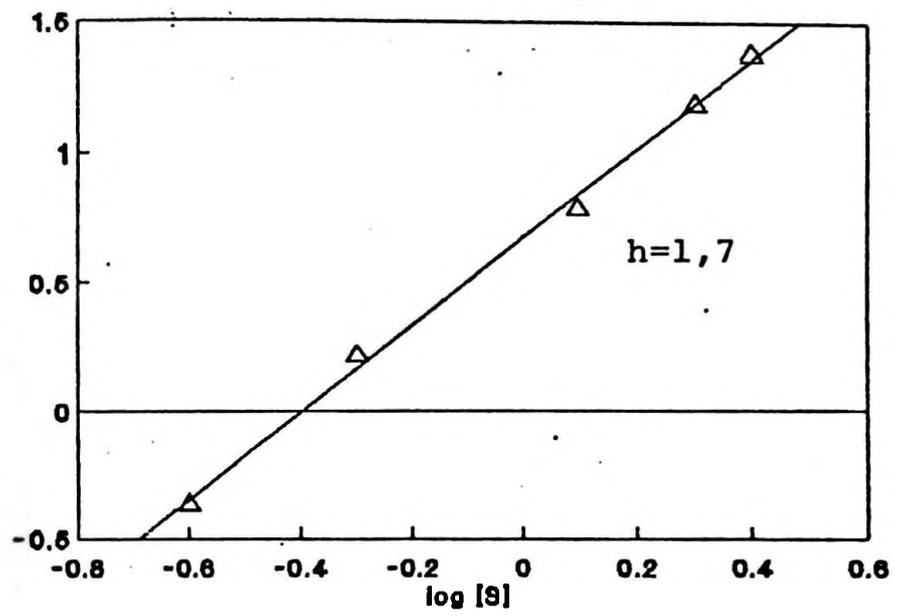


FIGURA 7E'' - Gráfico de Hill para a linhagem ppyn (calculado para as concentrações de 0 a 2,5 mM de nitrito).

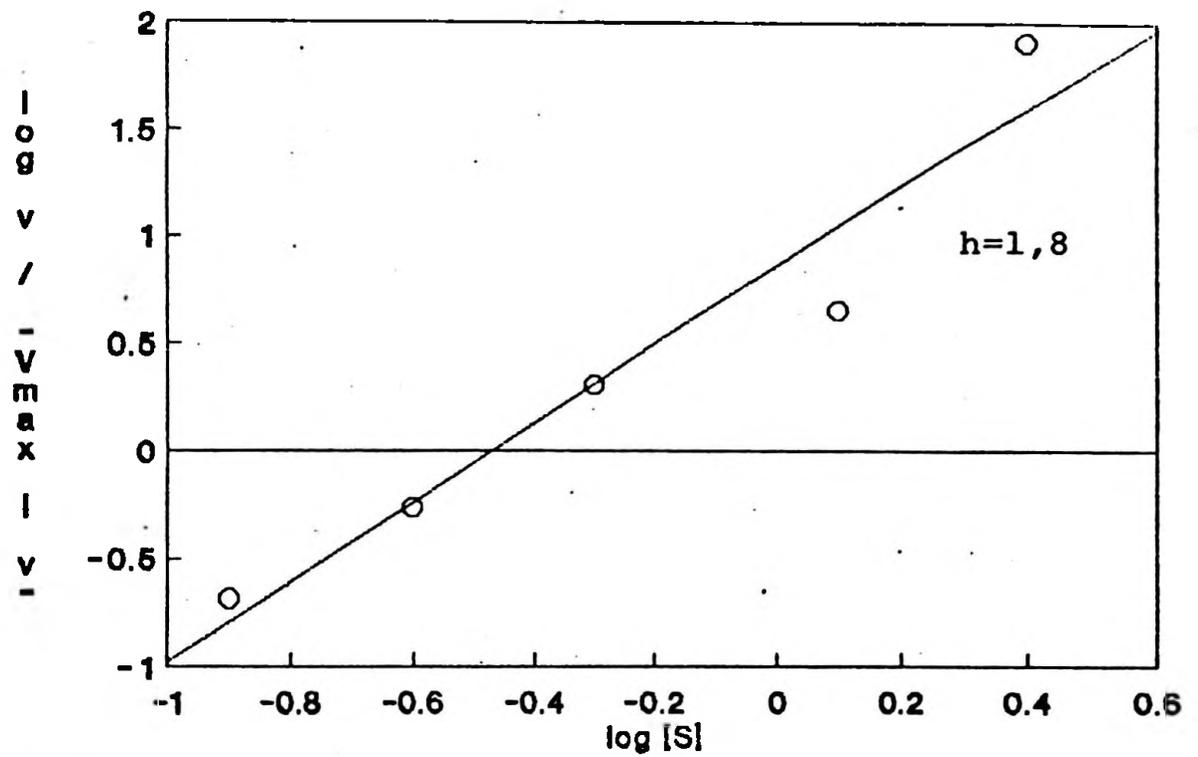


FIGURA 7G''- Gráfico de Hill para a linhagem CHL-14 (calculado para as concentrações de 0 a 2,5 mM de nitrito).

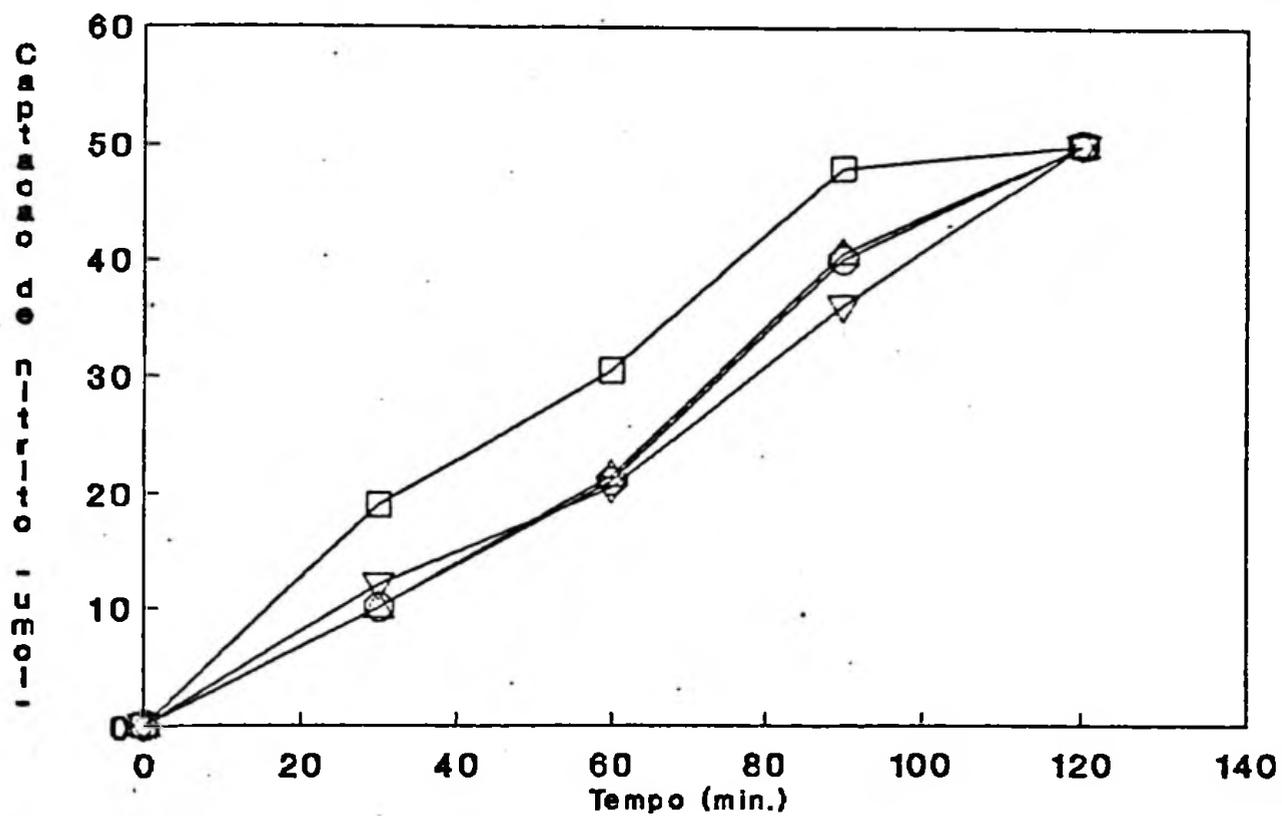


FIGURA 8 - Influência de várias concentrações de nitrato na captação de nitrito pelos conídios da linhagem *biA1 facA303*, em função do tempo. Símbolos: (□) nitrito 500 μ M; (○) nitrito 500 μ M + nitrato 500 μ M; (△) nitrito 500 μ M + nitrato 1000 μ M; (▽) nitrito 500 μ M + nitrato 3000 μ M.

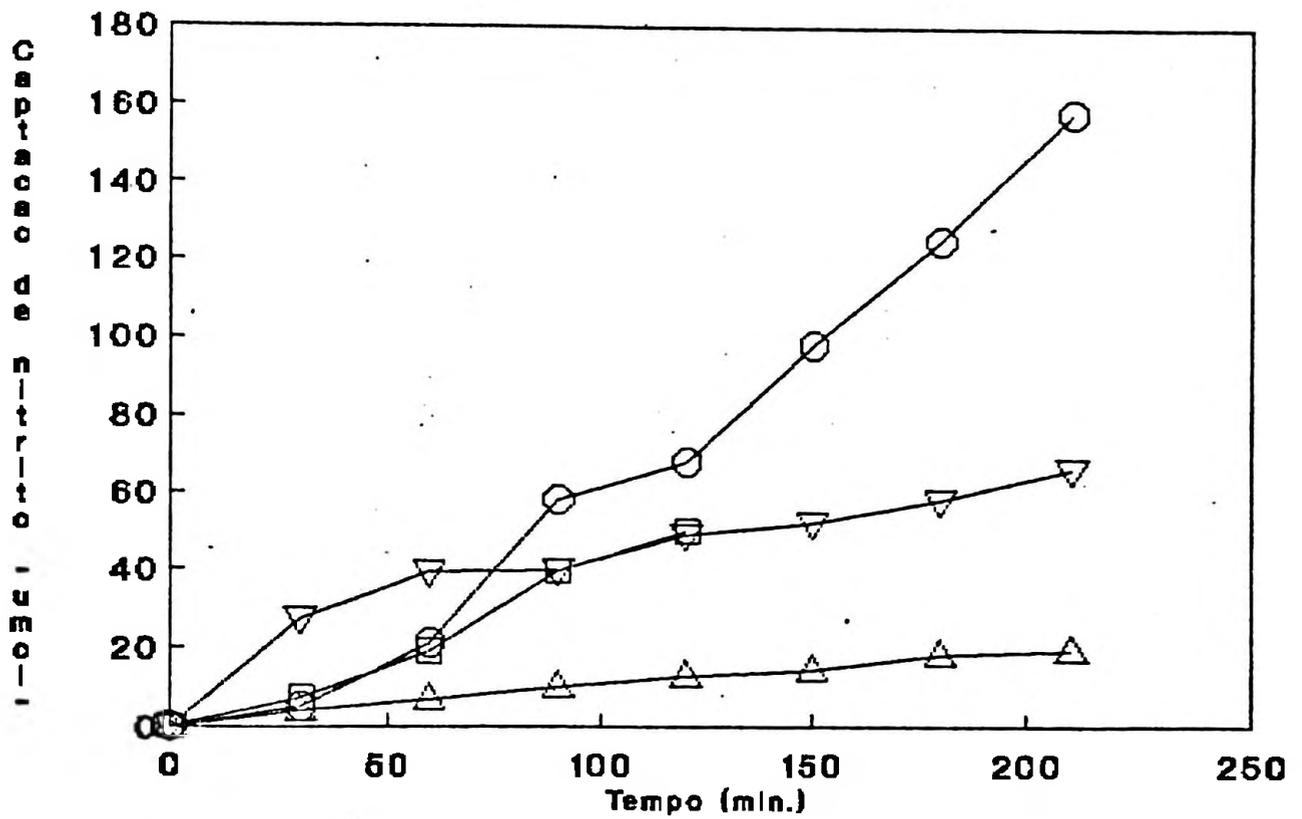


FIGURA 9 - Influência da amônia na captação de nitrito pelos conídios da linhagem biAl facA303, em função do tempo. Símbolos: (□) nitrito 500 µM; (△) nitrito 500 µM + tartarato de amônio 2000 µM; (○) nitrito 2500 µM; (▽) nitrito 2500 µM + tartarato de amônio 2000 µM.

amônia (Figura 9). Mesmo aumentando a concentração de nitrito em relação a quantidade de amônia presente (2 mM), essa repressão ocorreu na linhagem biAl facA303 (Figura 9). Efeito repressivo mais acentuado foi observado para a captação de nitrito pela linhagem ppyn (Figura 10).

III.2. Mutantes com crescimento reduzido na presença de citrato

III.2.1. Caracterização

A linhagem 2 quando crescida a 28°C na ausência de citrato, apresenta crescimento radial restrito e baixa conidiação em todas as fontes de nitrogênio ensaiadas (Tabela 12), exceto em ácido úrico e xantina, onde a conidiação é praticamente normal. Na presença de citrato (20 mM), o crescimento e a conidiação desta linhagem foram severamente afetados em todas as fontes de nitrogênio ensaiadas (Tabela 12 e Figura 11-II). A Tabela 13 mostra que outros ácidos orgânicos afetam menos o crescimento da linhagem 2, quando comparados ao efeito do citrato. Considerando-se o crescimento das linhagens selvagem e mutante individualmente, parece evidente que o mutante é mais resistente ao SDS (0,01%) que o selvagem. Também está mostrado na Tabela 13 que o mutante é hipersensível a canamicina.

A linhagem 2 praticamente recupera o seu crescimento quando incubada a 37 °C (Tabela 14 e Figura 11-I). Este efeito é

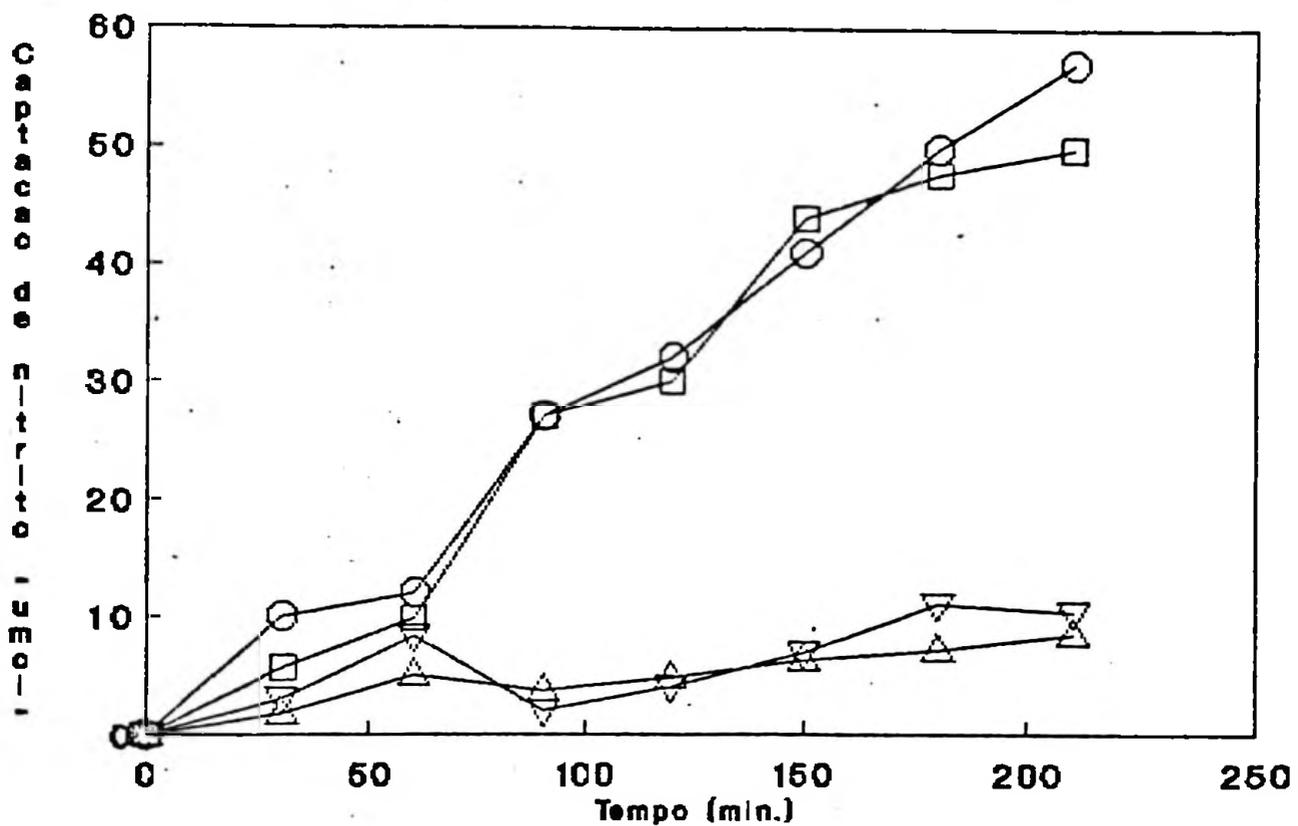


FIGURA 10 - Influência da amônia na captação de nitrito pelos conídios da linhagem ppyn, em função do tempo. Símbolos: (□) nitrito 500 μM ; (▽) nitrito 500 μM + tartarato de amônio 2000 μM ; (○) nitrito 2500 μM ; (△) nitrito 2500 μM + tartarato de amônio 2000 μM .

TABELA 12 - Diâmetro de colônias (em mm) das linhagens inoB2 e 2, após crescimento por 96 horas a 28°C, em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de nitrogênio, na ausência e presença de citrato (20 mM).

FONTE DE NITROGÊNIO	CONCENTRAÇÃO (mM)	___ AUSÊNCIA DE CITRATO ___		___ PRESENÇA DE CITRATO ___	
		inoB2	2	inoB2	2
Cloreto de amônio	10	28,0±0,0	15,0±1,0	n.d.	n.d.
Tartarato de amônio	10	29,5±1,8	12,3±0,6	23,8±1,3	7,0±0,5
Nitrato de sódio	70	32,5±1,4	17,0±1,7	25,5±1,9	8,0±0,7
Nitrito de sódio	10	31,0±0,8	20,0±2,1	24,8±1,2	8,0±1,0
Nitrito de sódio	35	30,3±1,2	21,0±2,6	25,2±0,7	7,0±0,9
Nitrito de sódio	70	26,4±1,4	18,3±0,9	22,2±1,0	7,0±0,4
Xantina	0,7	30,0±0,9	20,0±1,0	23,8±1,9	7,0±0,7
Hipoxantina	0,7	28,7±0,8	18,0±1,0	25,5±0,6	8,0±1,0
Uréia	5	29,8±1,5	18,0±1,0	20,3±1,7	8,0±1,1
Ácido úrico	0,6	29,8±1,1	18,3±1,2	26,3±0,5	7,0±0,3

(a): Os valores do diâmetro são a média ± desvio padrão de pelo menos 4 experimentos

n.d.: não determinado.

(I)

(II)



FIGURA 11 - Crescimento das linhagens inoB2 (A) e 2(B), por 96 horas em meio mínimo contendo ácido úrico (0,6 mM) como fonte de nitrogênio:
I) Crescimento a 37°C na ausência de citrato.
II) Crescimento a 28°C na presença de citrato (20 mM).

TABELA 13 - Caracterização das linhagens inoB2 e 2, após o crescimento a 28 C por 96 horas, em meio mínimo suplementado com ácido úrico (0,6 mM), como fonte de nitrogênio, e vários aditivos.

ADITIVOS (concentração)	(a)	(b)	
	pH	DIÂMETRO	
		inoB2	2
---	7	26,3±0,6	18,7±1,1
Ácido cítrico (20 mM)	7	22,0±1,0	7,1±0,6
Ácido tartárico (20 mM)	7	25,0±1,0	15,0±1,2
Ácido maléico (50 mM)	7	25,0±0,0	13,0±0,0
Ácido succínico (50 mM)	7	29,3±0,6	14,7±1,1
Ácido acético (235 mM)	8	28,0±1,7	14,0±1,0
Dodecil sulfato de sódio (0,01%)	7	14,3±0,6	15,7±1,1
Canamicina (0,5 mg/ml)	7	21,7±1,2	9,3±0,6
Canamicina (1,5 mg/ml)	7	17,7±1,5	8,3±0,6

(a): pH do meio medido após o crescimento da linhagem.

(b): Os valores do diâmetro das colônias (em mm) representam a média ± desvio padrão de pelo menos 4 experimentos independentes.

TABELA 14 - Caracterização das linhagens inoB2 e 2, após o crescimento a 37 C por 72 horas, em meio mínimo suplementado com tartarato de amônio (10 mM) ou cloreto de amônio (10 mM), combinados com vários ácidos orgânicos.

FONTE DE NITROGÊNIO	ÁCIDOS ORGÂNICOS (concentração)	(a)	(b)	
		pH	DIÂMETRO	
			inoB2	2
Tartarato de amônio	---	5	24,5±2,1	25,5±1,4
	Ácido cítrico (20 mM)	7	21,0±1,2	19,0±0,7
	Ácido maléico (50 mM)	7	24,0±0,0	26,0±0,0
	Ácido acético (235 mM)	8	23,0±0,0	33,5±0,7
Cloreto de amônio	---	4	28,0±0,0	24,0±1,4
	Ácido cítrico (20 mM)	7	20,0±0,0	15,0±0,7
	Ácido maléico (50 mM)	7	19,0±1,4	24,5±0,7
	Ácido acético (235 mM)	8	20,0±0,0	31,5±2,1

(a): pH do meio medido após o crescimento da linhagem.

(b): Os valores do diâmetro das colônias (em mm) representam a média ± desvio padrão de pelo menos 4 experimentos independentes.

mais acentuado na presença de acetato, onde ocorre inclusive um estímulo do crescimento radial associado a um aumento do pH extracelular, medido após o crescimento das linhagens (Tabela 14).

III.2.2. Análise genética

O número de locus envolvido na sensibilidade ao citrato foi determinado através da análise dos segregantes meióticos provenientes do cruzamento entre as linhagens 2 e MSE (veja ítem II.7.3). Ascósporos sensíveis e normais segregaram na proporção de 1:1 (Apêndice 4), indicando que um único locus é responsável pela sensibilidade ao citrato na linhagem 2, sendo então denominado *ctsA*. Esta mutação apresentou caráter recessivo em diplóide heterozigoto (*ctsA1 // MSE*).

A análise mitótica dos segregantes haplóides provenientes do diplóide heterozigoto *ctsA1 // MSE* (conforme descrito no ítem II.7.2) mostrou que o locus *ctsA* está localizado no grupo de ligação IV, pois não foi observado segregantes dos tipos $\begin{matrix} + & - & - & + & + & + \\ \text{ino} & \text{cts} & ; & \text{ino} & \text{cts} & ; & \text{pyro} & \text{cts} & \text{ou} & \text{pyro} & \text{cts} \end{matrix}$ (Apêndice 5).

As frequências de recombinação entre *ctsA* e *inoB2* e entre *ctsA* e *pyroA4*, todos presentes no mesmo grupo de ligação, foram superiores a 50% (Apêndice 6), indicando que o locus *ctsA* não se encontra ligado a *inoB2* ou *pyroA4*. A frequência de recombinação entre estes dois últimos marcadores, calculada como controle, foi cerca de 27%.

III.3. Mutante com crescimento ralo e produção de pigmento escuro

III.3.1. Caracterização

A linhagem 3 apresenta conidiação pobre e pigmentação marron escura sob a colônia em todas as fontes de nitrogênio ensaiadas, exceto em tartarato de amônio 10 mM (Figura 12). Além disto, seu crescimento em nitrito de sódio (10mM) na presença de citrato foi restringido quando comparado com a linhagem inoB2 (Tabela 15).

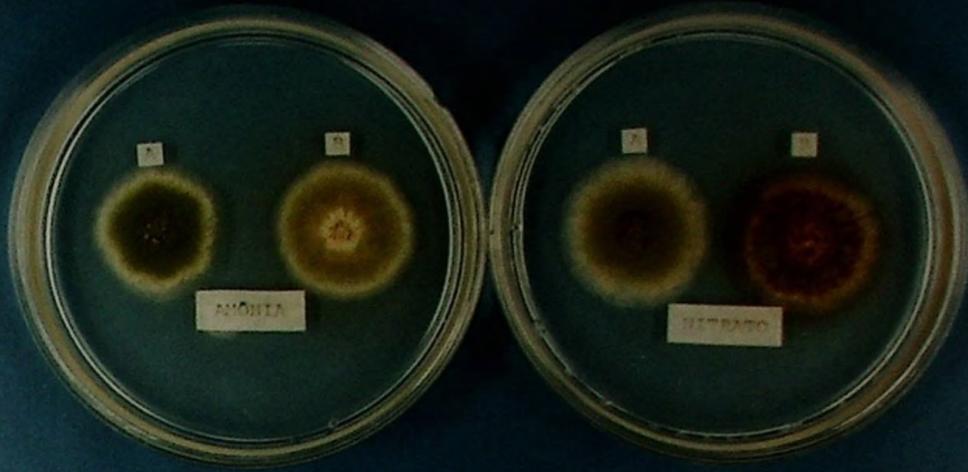
A Tabela 16 mostra que quando o pH do meio se torna ácido, o mutante recupera a morfologia normal e não produz pigmento. Esta acidificação do meio ocorre somente em baixas concentrações de tartarato de amônio como fonte de nitrogênio, sugerindo que a pigmentação é função do pH do meio e não da fonte de nitrogênio utilizada.

As linhagens 3 e inoB2 foram ensaiadas nas temperaturas de 28, 37 e 42 C em meio de cultura contendo tartarato de amônio (10 mM) ou nitrato de sódio (70 mM). Os resultados obtidos mostraram que o padrão de pigmentação da linhagem 3 não foi alterado em função da variação de temperatura.

III.3.2. Análise genética

O número de locus envolvido na pigmentação escura foi determinado através da análise dos segregantes

(I)



(II)

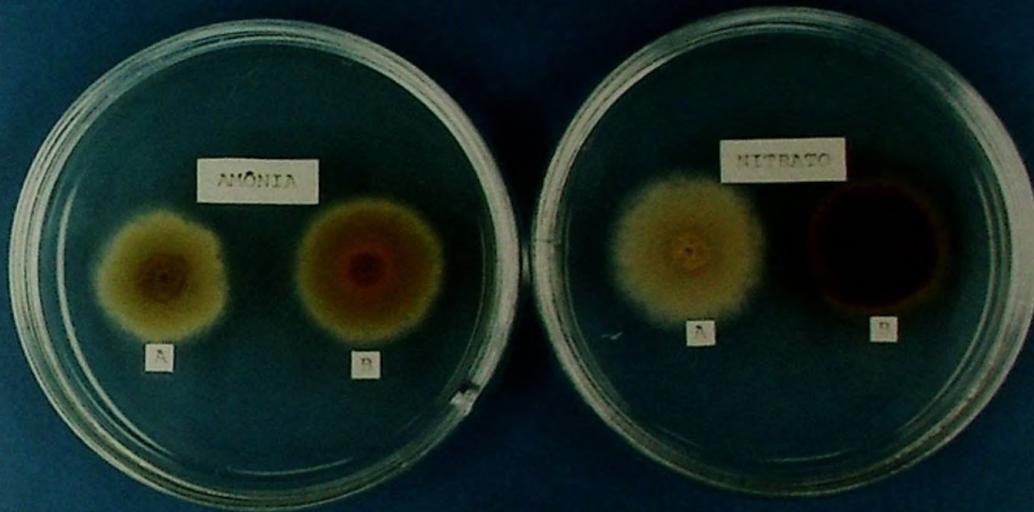


FIGURA 12 - (I): Crescimento das linhagens inoB2 (A) e 3 (B), por 72 horas a 37°C, em meio mínimo contendo tartarato de amônio (10 mM) ou nitrato de sódio (70 mM), como fonte de nitrogênio. (II): As mesmas placas mostrando o reverso das colônias (para melhor visualização do pigmento marron).

TABELA 15 - Diâmetro de colônias (em mm) das linhagens inoB2 e 3, após crescimento por 96 horas a 28°C, em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de nitrogênio, na ausência e presença de citrato (20 mM).

FONTE DE NITROGÊNIO	CONCENTRAÇÃO (mM)	___ AUSÊNCIA DE CITRATO ___		___ PRESENÇA DE CITRATO ___	
		inoB2	3	inoB2	3
Tartarato de amônio	10	29,5±1,8	30,0±1,4	23,8±1,3	23,0±0,4
Nitrato de sódio	70	32,5±1,4	32,8±0,8	25,5±1,9	22,0±0,7
Nitrito de sódio	10	31,0±0,8	30,0±1,7	24,8±1,2	17,7±3,0
Xantina	0,7	30,0±0,9	29,0±0,8	23,8±1,9	24,0±1,0
Hipoxantina	0,7	28,7±0,8	27,7±1,1	25,5±0,6	22,0±0,9
Uréia	5,0	29,8±1,5	28,0±1,0	20,3±1,7	22,0±1,3
Ácido úrico	0,6	29,8±1,1	28,3±0,6	26,3±0,5	24,0±2,2

(a): Os valores do diâmetro são a média ± desvio padrão de pelo menos 4 experimentos

TABELA 16 - Caracterização das linhagens inoB2 e 3, após o crescimento a 28 C por 96 horas, em meio mínimo suplementado com várias fontes de nitrogênio.

FONTE DE NITROGÊNIO	CONCENTRAÇÃO (mM)	(a)		inoB2		3	
		pH	inoB2		3		
			Diâmetro ^(b)	Pigmento ^(c)	Diâmetro ^(b)	Pigmento ^(c)	
Tartarato de amônio	10	5	29,5±1,8	ausente	30,0±1,4	ausente	
	35	8	28,5±0,7	ausente	25,5±0,7	presente	
	70	8	26,0±0,0	ausente	21,0±1,4	presente	
Nitrato de sódio	10	8	33,0±0,8	ausente	31,0±1,2	presente	
	35	8	31,5±0,7	ausente	31,5±2,1	presente	
	70	8	32,5±1,4	ausente	32,8±0,8	presente	
Nitrito de sódio	10	8	31,0±0,8	ausente	30,0±1,7	presente	
	35	8	30,3±1,2	ausente	28,6±2,6	presente	
	70	8	25,4±1,4	ausente	22,2±4,1	presente	

(a): pH do meio medido após o crescimento da linhagem.

(b): Os valores do diâmetro das colônias (em mm) representam a média ± desvio padrão de pelo menos 4 experimentos independentes.

(c): Presença ou ausência do pigmento marron.

meióticos provenientes do cruzamento entre as linhagens 3 e MSF (conforme descrito no ítem II.7.3.). Ascósporos originando colônias com pigmentação escura e colônias normais segregaram na proporção de 1:1 (Apêndice 7), sugerindo que um único locus está envolvido em ambas características, sendo então denominado **mel**. Esta mutação apresentou caráter recessivo em diplóides heterozigotos (**mel // MSF**).

A análise mitótica dos segregantes haplóides provenientes do diplóide heterozigoto **mel//MSF** (conforme descrito no ítem II.7.2.) mostrou que o locus **mel** está localizado no grupo de ligação VII, pois não foi observado segregantes dos tipos nic^+ **mel** ou nic^- **mel** (Apêndice 8).

Para verificar se o gene **mel**, presente na linhagem 3, era alelo ao **melA**, presente na linhagem FGSC no. A657 e também contendo pigmento escuro, estas linhagens foram cruzadas. A análise de um cleistotécio híbrido proveniente deste cruzamento mostrou que apesar de ambos genes estarem no mesmo grupo de ligação, eles não se encontram ligados geneticamente. O novo locus passou a ser denominado **melC** e o mutante aqui descrito **melC1**.

III.4. Mutantes com alteração morfológica em amônia

III.4.1. Caracterização

A linhagem 4 não conidia e apresenta morfologia alterada quando cultivada a 28 °C em meio mínimo contendo tartarato de amônio (10 mM) como fonte de nitrogênio. Quando citrato é adicionado ao meio, esta linhagem se desenvolve como a linhagem selvagem (morfologia e conidiação normais) (Figura 13). Na Tabela 17 pode ser observado o efeito de várias fontes de nitrogênio no diâmetro das linhagens 4 e inoB2. Estes resultados sugerem que citrato afeta a utilização de nitrito pela linhagem 4. Além disto, o mesmo ocorre na ausência de citrato, quando a fonte de nitrogênio utilizada é tartarato de amônio (Tabela 17). De qualquer modo, a morfologia e conidiação anormais da linhagem 4 só são visualizadas na presença de amônia. A Tabela 18 mostra que a morfologia alterada do mutante em meio com amônia é função do pH extracelular. Assim, em altas concentrações de tartarato de amônio, o meio se torna alcalino e a linhagem tem morfologia normal. Em condições onde o meio se torna ácido a morfologia continua alterada (Tabela 18).

Recuperação do crescimento radial da linhagem 4 é observada quando cultivada a 37 °C (Tabela 19). Esta tabela também mostra que outros ácidos orgânicos mantêm a recuperação da morfologia e conidiação da linhagem 4 e estão associados a uma alcalinização do meio de cultura, durante o crescimento do fungo. Existe mesmo um estímulo do crescimento radial da linhagem 4, comparado ao da linhagem selvagem, em meio suplementado com ácido acético, onde o pH do meio atinge 8,0 (Tabela 19).



FIGURA 13 - Crescimento das linhagens inoB2 (A) e 4 (B), por 72 horas a 37°C, em meio mínimo contendo tartarato de amônio (10 mM) ou nitrato de sódio (70 mM), na presença e ausência de citrato (20 mM).

TABELA 17 - Diâmetro^(a) de colônias (em mm) das linhagens inoB2 e 4, após crescimento por 96 horas a 28°C, em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de nitrogênio, na ausência e presença de citrato (20 mM).

FONTE DE NITROGÊNIO	CONCENTRAÇÃO (mM)	--- AUSÊNCIA DE CITRATO ---		--- PRESENÇA DE CITRATO ---	
		inoB2	4	inoB2	4
Tartarato de amônio	10	29,5±1,8	20,0±1,4	23,8±1,3	18,0±0,6
Nitrato de sódio	70	32,5±1,4	29,0±0,8	25,5±1,9	18,0±0,9
Nitrito de sódio	10	31,0±0,8	29,0±1,2	24,8±1,2	17,0±1,0
Nitrito de sódio	35	30,3±1,2	29,7±1,5	25,2±0,7	16,0±1,2
Nitrito de sódio	70	25,4±1,4	27,8±3,7	22,2±1,0	15,0±1,0
Xantina	0,7	30,0±0,9	24,0±1,4	23,8±1,9	19,0±0,7
Hipoxantina	0,7	28,7±0,8	24,0±0,9	25,5±0,6	20,0±0,8
Uréia	5,0	29,8±1,5	25,0±0,8	20,3±1,7	17,0±1,0
Ácido úrico	0,6	29,8±1,1	22,0±1,0	26,3±0,5	20,0±1,0

(a): Os valores do diâmetro são a média ± desvio padrão de pelo menos 4 experimentos

TABELA 18 - Caracterização das linhagens inoB2 e 4, após o crescimento a 28°C por 96 horas, em meio mínimo suplementado com várias fontes de nitrogênio.

FONTE DE NITROGÊNIO	CONCENTRAÇÃO (mM)	(a) pH	inoB2		4	
			Diâmetro ^(b)	Morfologia ^(c)	Diâmetro ^(b)	Morfologia ^(c)
Tartarato de amônio	10	5	25,0±0,0	normal	20,0±1,4	alterada
	35	8	28,5±0,7	normal	21,0±0,7	normal
	70	8	26,0±0,0	normal	19,5±0,7	normal
Cloreto de amônio	10	4	26,0±1,4	normal	17,0±0,4	alterada
	35	4	24,0±0,0	normal	15,0±0,7	alterada
	70	4	28,0±0,0	normal	15,0±0,7	alterada

(a): pH do meio medido após o crescimento da linhagem.

(b): Os valores do diâmetro das colônias (em mm) representam a média ± desvio padrão de pelo menos 4 experimentos independentes.

(c): Morfologia normal: com conidiação característica da linhagem.
Morfologia alterada: sem conidiação.

TABELA 19 - Caracterização das linhagens inoB2 e 4, após o crescimento a 37 C por 72 horas, em meio mínimo suplementado com tartarato de amônio (10 mM) ou cloreto de amônio (10 mM), combinados com vários ácidos orgânicos.

FONTE DE NITROGÊNIO	ÁCIDOS ORGÂNICOS (concentração)	pH	(a)			
			inoB2		4	
			Diâmetro ^(b)	Morfologia ^(c)	Diâmetro ^(b)	Morfologia ^(c)
Tartarato de amônio	---	5	24,5±2,1	normal	22,5±3,5	alterada
	Ácido cítrico (20 mM)	7	21,0±1,2	normal	21,0±0,0	normal
	Ácido maléico (50 mM)	7	24,0±0,0	normal	28,0±0,0	normal
	Ácido acético (235 mM)	8	23,0±0,0	normal	31,0±1,4	normal
Cloreto de amônio	---	4	28,0±0,0	normal	21,5±2,1	alterada
	Ácido cítrico (20 mM)	7	20,0±0,0	normal	23,0±1,4	normal
	Ácido maléico (50 mM)	7	19,0±1,4	normal	27,0±0,0	normal
	Ácido acético (235 mM)	8	20,0±0,0	normal	32,0±0,0	normal

(a): pH do meio medido após o crescimento da linhagem.

(b): Os valores do diâmetro das colônias (em mm) representam a média ± desvio padrão de pelo menos 4 experimentos independentes.

(c): Morfologia normal: com conidiacão característica da linhagem.
Morfologia alterada: sem conidiacão.

A tabela 20 mostra que a linhagem 4 é hipersensível a canamicina e como descrito para a linhagem 3, é também menos sensível ao SDS que a linhagem inoB2.

III.4.2. Análise genética

O número de loci envolvido na alteração morfológica foi determinado através da análise dos segregantes meióticos provenientes do cruzamento entre as linhagens 4 e MSE (veja item II.7.3). Ascósporos originando colônias com morfologia alterada e morfologia normal segregaram na proporção 1:1 (Apêndice 9), indicando que um único locus é responsável pela alteração morfológica da linhagem 4. Além disto, todos os segregantes morfológicos não revelaram fosfatase ácida repressível, e sim um aumento na atividade da fosfatase alcalina repressível (pH 6,5), características da linhagem portando a mutação *pacCl4*. Os segregantes com morfologia normal se comportaram como a linhagem selvagem. Portanto, parece claro que a mutação *pacCl4* seja responsável pela alteração morfológica da linhagem 4 em amônia.

TABELA 20 - Caracterização das linhagens inoB2 e 4, após o crescimento a 28 C por 96 horas, em meio mínimo suplementado com ácido úrico (0,6 mM), como fonte de nitrogênio, e vários aditivos.

ADITIVOS CONCENTRAÇÃO	inoB2		4	
	Diâmetro ^(a)	Morfologia ^(b)	Diâmetro ^(a)	Morfologia ^(b)
---	26,3±0,6	normal	20,7±0,6	normal
Dodecil sulfato de sódio (0,01%)	14,3±0,6	normal	17,3±0,6	normal
Canamicina (1,5 mg/ml)	17,7±1,5	normal	9,5±0,7	normal

(a): Os valores do diâmetro das colônias (em mm) representam a média ± desvio padrão de pelo menos 4 experimentos independentes.

(b): Morfologia normal: com conidiação característica da linhagem.
Morfologia alterada: sem conidiação.

IV. DISCUSSÃO

IV.1. Mutantes com crescimento restrito em elevadas concentrações de nitrito como fonte de nitrogênio

A via de utilização de nitrato pelo fungo *A. nidulans* requer as enzimas nitrato e nitrito redutases, codificadas respectivamente pelos genes *niaD* e *niaA*. O controle desta via é efetuado por pelo menos dois genes de ação positiva: o *nirA* que media a indução específica pelos substratos e o *areA* que media a repressão metabólica pela amônia (ou glutamina). Em comparação ao grande volume de informações sobre a metabolização destes compostos, muito pouco é conhecido sobre os mecanismos de transporte de nitrato e nitrito em *A. nidulans*. O transporte de nitrato parece ser efetuado por pelo menos dois sistemas diferentes (Figura 6A): um de alta e outro de baixa afinidade pelo nitrato (Tabela 10). Mecanismos de transporte envolvendo mais de uma permease para nitrato têm sido observados em plantas (Doddem & Telkamp, 1979; Goyal & Huffaker, 1986), algas (Fuggi et al., 1984) e bactérias (Thayer & Huffaker, 1982). Brownlee e Arst (1983) também sugeriram a existência de mais de um sistema de captação de nitrato em *A. nidulans*, embora tenham demonstrado a existência de apenas um, cujo valor de K_s foi estimado em cerca de 200 μM . As curvas bifásicas para o transporte de nitrato, mostrados no presente trabalho para as linhagens de *A. nidulans*, poderiam pressupor a existência de duas permeases ou duas formas interconvertíveis de uma mesma permease, sendo que esta

interconversão seria função da concentração externa de nitrato. O fato de terem sido identificadas em *S. cerevisiae* mutações não ligadas geneticamente e que alteraram seletivamente essas curvas bifásicas evidenciou a existência de permeases distintas (Dubois & Grenson, 1979). Os valores de K_s para a captação de nitrato pelas linhagem ppyn (Tabela 10) indicam que apenas o sistema de alta afinidade está alterado, sugerindo também a existência de duas permeases para nitrato em *A. nidulans*.

Por outro lado, a captação de nitrito pela linhagem selvagem de *A. nidulans* parece ser mediada por um único sistema de transporte (Figura 7A), cujo perfil de saturação evidencia a existência de uma permease para nitrito. A inibição pelo substrato observada nesta cinética de captação pode sugerir uma forma de regulação do transporte de nitrito. Um único sistema de transporte de nitrito também foi observado em *Rhodopseudomonas capsulata* (Caballero et al., 1986), *N. crassa* (Schloemer & Garrett, 1974b) e sementes de trigo (Goyal & Huffaker, 1986). No entanto, em *A. nidulans* ainda não tinha sido demonstrada formalmente a existência de uma permease para nitrito. Pombeiro et al. (1983) identificaram nesse organismo o locus *niHA*, que confere sensibilidade ao nitrito, quando presente em alta concentração (Tabela 6). Foi sugerido, então, que esta linhagem poderia apresentar uma alteração da captação de nitrito (Pombeiro et al., 1983). Tomsett (1989) sugeriu que o mutante *niC628* descrito por Cove (1979), teria sua hipersensibilidade ao nitrito também devido a uma alteração na sua captação. Para verificar se a alteração causada pela mutação *niHA* estava ou não relacionada a

uma diferença na quantidade de permease e/ou a uma mudança da sua afinidade pelo nitrito foi realizada a análise cinética da captação de nitrito nas linhagens proAl pabaA6 yA2 niHA e CHL-14. Quando a velocidade de captação de nitrito foi plotada contra a concentração de nitrito (variando de 0 a 15 mM) foi observada uma curva bifásica para ambas linhagens, apresentando alta e baixa afinidades em função da concentração de nitrito (Figura 7A e Tabela 11). Algumas hipóteses podem explicar este comportamento cinético: a) a mutação niHA poderia ter alterado a permease de nitrito, de tal modo a permitir uma transição conformacional de alta para baixa afinidade, em função da concentração externa de nitrito ou b) a mutação niHA poderia ter afetado a estrutura da membrana, alterando uma proteína localizada suficientemente próxima da permease de nitrito para influenciar o seu comportamento cinético. Entretanto, embora as linhagens portadoras da mutação niHA apresentem crescimento normal em nitrato (Tabela 6), ainda não se pode descartar a existência de alterações na enzima nitrito redutase destas linhagens.

Parece claro que os sistemas de transporte de nitrato e nitrito em *A. nidulans* têm propriedades cinéticas diferentes (Figuras 6A e 7A e Tabelas 10 e 11). Além disto, a captação de nitrito não foi significativamente afetada pela presença de nitrato no meio (Figura 8), também sugerindo a existência de sistemas distintos para o transporte de nitrato e nitrito. Em outros organismos, como bactérias (Caballero et al., 1986), fungos (Schloemer & Garrett, 1974a,b) e plantas (Jackson et al., 1974), têm sido observado que sistemas independentes estão envolvidos no transporte destas fontes de nitrogênio. Embora

distintos, ambos sistemas podem ser induzidos por um dos substratos. Conídios pré-incubados em nitrato iniciaram a captação de nitrato ou nitrito imediatamente após a adição de um destes substratos (Figura 6 e 7). No entanto, um atraso de 2 a 3 horas foi observado para o início da captação de nitrito ou nitrato pelo micélio da linhagem selvagem crescido em nitrato 1,5 mM (pré-incubação) (Figuras 4 e 5). Este atraso indica que o sistema de captação de nitrato foi desativado após sua exaustão do meio, e que um certo tempo é requerido para que ocorra a reativação do sistema e reinicie a sua captação. Este atraso não foi observado na captação de nitrato ou nitrito pelos conídios pois, neste caso, o sistema estava induzido pela existência de nitrato no meio durante a pré-incubação. Os sistemas de transporte de nitrato e nitrito em *N. crassa* também mostraram-se induzíveis por uma destas fontes de nitrogênio (Schloemer & Garrett, 1974a,b).

A mutação *niHA* parece alterar o perfil de captação de nitrito bem como o tempo de indução de sua desrepressão pois tanto a captação de nitrito (Figura 5) como a de nitrato (Figura 4) pelo micélio da linhagem *proAl pabaA6 ya2 niHA* são iniciados com cerca de uma hora de atraso em relação a linhagem selvagem. É interessante observar que a linhagem *CHL-14*, também portadora da mutação *niHA*, corrige o tempo de indução dos sistemas de captação de nitrato e nitrito e aproxima o perfil de captação de nitrito ao daquele mostrados pela linhagem selvagem (Figuras 4 e 5). Uma possível explicação para estes resultados seria que a mutação *chl14* (responsável pela resistência e parcial dependência ao

fungicida cloroneb) afetou a estrutura da membrana, como uma maneira de impedir a entrada do cloroneb e tornar a linhagem CHL-14 resistente a este fungicida. Se esta alteração ocorreu em uma proteína localizada próxima a permease de nitrito, poder-se-ia ter como consequência uma reversão parcial da alteração causada pela mutação *niHA*. Por outro lado, a velocidade de captação de nitrato pelo micélio da linhagem CHL-14 foi idêntica a da linhagem *proAl pabaA6 yA2 niHA*, as quais parecem ser para a concentração de nitrato ensaiada, duas vezes maior que àquela mostrada pela linhagem selvagem (Figura 4). Este resultado juntamente com as alterações observadas na cinética de captação de nitrato pelo micélio das linhagens *proAl pabaA6 yA2 niHA* e CHL-14 (Figura 6A e Tabela 10), sugerem que a mutação *niHA* também afetou a permease de nitrato e que a mutação no locus *chl14* não tenha corrigido esta alteração. Estes resultados suportam a hipótese de que a mutação *niHA* alterou a permease de nitrito e possivelmente também afetou o transporte de nitrato nestas linhagens. No entanto, não pode ser descartada a hipótese de que a mutação *niHA* alterou a estrutura da membrana (ou uma proteína da membrana) e como consequência afetou indiretamente as permeases de nitrito e nitrato. Em ambas hipóteses supõem-se que as permeases de nitrato e nitrito estejam próximas na membrana.

Desde que o transporte de nitrito é realizado por uma permease específica, o seu controle poderia ser afetado pelos mesmos substratos que regulam outras atividades envolvidas no metabolismo de nitrogênio. Vários estudos têm mostrado que a amônia pode exercer efeitos distintos (repressão ou inibição) na captação de nitrato (Goldsmith et al., 1973; Schloemer & Garrett,

1974a; Doddema & Telkamp, 1979; Thayer & Huffaker, 1982). Em relação a captação de nitrito Schloemer e Garrett (1974b) observaram que em *N. crassa*, este sistema de transporte não é afetado pela amônia. Por outro lado, Caballero et al. (1986) verificaram que a captação de nitrito pela bactéria *Rhodopseudomonas capsulata* é reprimida pela amônia. Os resultados do presente trabalho mostram que a presença de amônia reduziu significativamente a captação de nitrito por linhagens de *A. nidulans* (Figuras 9 e 10). Neste caso, esta redução pode ser devido a uma ação repressora da amônia na síntese "de novo" da permease de nitrito, supondo que esta permease esteja em constante "turnover" na célula. Outra explicação para esta redução seria supor que a amônia exercesse uma ação inibitória indireta, inativando a expressão do gene para a nitrito redutase, e conseqüentemente aumentando a concentração de nitrito intracelular. O fato das linhagens proAl pabaA6 yA2 nihA e CHL-14 apresentarem uma maior inibição de crescimento em meio sólido contendo nitrito e amônia (Tabela 7), poderia ser explicado por um acúmulo de nitrito, resultante da não repressão absoluta da captação e da ausência da enzima nitrito redutase, cuja síntese estaria reprimida pela amônia. As evidências apresentadas neste trabalho parecem indicar que o gene nihA está envolvido no funcionamento do sistema de transporte de nitrito em *A. nidulans*, o qual requer indução por nitrito ou nitrato e é reprimido (ou inibido) por amônia.

Neste trabalho foi identificado um outro gene, denominado nihB, cujo mutante apresenta sensibilidade a elevadas

concentrações de nitrito (Tabela 7) e também parece estar envolvido no seu transporte. Embora o crescimento deste mutante não tenha sido inibido pela presença de nitrito e amônia, como foi observado nas linhagens proAl pabaA6 yA2 nihA e CHL-14, ele também não conseguiu utilizar amônia como fonte de nitrogênio, quando nitrito estava presente na concentração de 140 mM (Tabela 7). Algumas considerações podem ser feitas a partir destes resultados: 1) a mutação nihB parece ter alterado a permease de nitrito de modo menos acentuado que a nihA, pois o mutante nihB apresenta menor sensibilidade ao nitrito, 2) a mutação nihB pode ter afetado a estrutura da membrana desta linhagem, possibilitando o aparecimento de poros que permitiriam a captação passiva de nitrito, quando este estivesse presente em elevadas concentrações e 3) a captação de nitrito em elevadas concentrações parece não ser reprimida por amônia, pois o mutante nihB não cresce em meio sólido contendo 140 mM de nitrito de sódio e 10 mM de tartarato de amônio (Tabela 7). Foi observado por McCusker et al. (1987) que mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* com alteração na ATPase da membrana plasmática respondem diferentemente à presença de íons no meio. Por exemplo, os fenótipos de sensibilidade ao pH e inibição do crescimento por amônia foram suprimidos pela adição de cloreto de potássio (20 mM). Além disto, foi observado que íons cloreto protegem várias espécies de peixe contra a toxicidade ao nitrito (Williams & Eddy, 1986). No entanto, as linhagens nihB, nihA e CHL-14 não mostraram qualquer reversão da toxicidade do nitrito na presença de cloreto de potássio (Tabela 9).

IV.2. Mutante com crescimento reduzido na presença de citrato

A linhagem *inoB2 ctsA1* também foi selecionada por apresentar redução da conidiação e crescimento radial em todas as fontes de nitrogênio ensaiadas neste trabalho, exceto xantina e ácido úrico, onde a conidiação foi praticamente normal (Tabela 12 e Figura 11). Outra característica desta linhagem é uma redução acentuada do seu crescimento na presença de citrato, em todas as fontes de nitrogênio incluindo xantina e ácido úrico (Tabela 12 e Figura 11). Esta sensibilidade ao citrato poderia ser devido a uma alteração na estrutura da membrana celular. Algumas evidências como a hipersensibilidade à canamicina, a criosensibilidade e a resistência ao SDS mostradas pela linhagem *ctsA* suportam esta hipótese (Tabelas 13 e 14). Um aumento da sensibilidade a canamicina pode ser devido a mutações que diminuem o "lag" na captação deste antibiótico, alterando portanto a permeabilidade da membrana celular (Davis et al., 1986).

Além disto, a alteração causada pela mutação *ctsA1* parece ter afetado a captação de citrato, pois a linhagem mutante utiliza citrato como fonte de carbono, melhor que a linhagem selvagem (Pombeiro et al., 1991). Então, a toxicidade do citrato pode ser devido ao seu acúmulo intracelular em meio contendo glicose (uma fonte de carbono preferencial). Portanto, os resultados apresentados suportam a hipótese que a mutação *ctsA* alterou a permeabilidade da membrana, levando a uma toxicidade do citrato. O fato da linhagem *ctsA* não apresentar restrição significativa de crescimento na presença de outros ácidos orgânicos (como ácido maléico, ácido acético, ácido tartárico e

ácido succínico) (Tabela 13) sugere que eles tenham função diferente na fisiologia celular (Pombeiro et al., 1991).

IV.3. Mutante com alteração morfológica em tartarato de amônio 10 mM

A linhagem *pacC14 inoB2 yA2* foi utilizada neste trabalho por apresentar morfologia alterada e ausência de conidiação em meio contendo 10 mM de tartarato de amônio (Figura 13). No entanto, ocorre uma recuperação tanto da morfologia como da conidiação dessa linhagem em meio contendo 35 ou 70 mM de tartarato de amônio (Tabela 18). O fator responsável por esta característica parece ser o pH de crescimento, pois a linhagem *pacC14 inoB2 yA2* apresenta alteração morfológica quando o pH de crescimento é ácido (10 mM de tartarato de amônio) e morfologia normal quando o pH é alcalino (35 ou 70 mM de tartarato de amônio) (Tabela 18). A análise genética desta linhagem mostrou que o gene envolvido na alteração morfológica em amônia (pH baixo) é o próprio locus *pacC*, descrito por Dorn em 1965. Está bem fundamentado que o *pacC* é um gene regulatório de amplo domínio, cujo produto media diretamente a regulação do pH intracelular (ao nível de transcrição gênica) agindo negativa ou positivamente dependendo do gene cuja expressão está sendo controlada (Caddick et al., 1986a; MacRae et al., 1988). Além da redução de fosfatase ácida, a linhagem *pacC* pode apresentar vários fenótipos em pH 6,5 tais como: aumento da atividade de fosfatase alcalina (Dorn, 1965), redução da captação de γ -amino-

butirato (GABA) (Arst et al., 1980), hipersensibilidade a neomicina e p-fluorofenilalanina (Caddick et al., 1986a), resistência a molibdato (Arst & Cove, 1970) e aumento da produção de penicilina (Shah et al., 1991). A ausência da fosfatase ácida repressível neste mutante pode ser responsável por mudanças na estrutura da membrana plasmática, afetando conseqüentemente funções dependentes da sua integridade. Esta suposição está fundamentada no fato desta enzima estar provavelmente localizada na membrana celular do fungo, como uma forma imatura daquela secretada no meio (Caddick & Arst, 1986). Como sugerido para a linhagem *ctsA inoB2*, a hipersensibilidade à canamicina e a resistência ao SDS, também observadas na linhagem *pacCl4 inoB2 yA2* (Tabela 20), podem ser atribuídos a alterações na estrutura da membrana (Davis et al., 1986).

A linhagem *pacCl4 inoB2 yA2* não cresce em pH 4,0 (A. Rossi, comunicação pessoal), tem crescimento reduzido e não conidia em pH 5,0, conidia pouco em pH 6,8 e apresenta crescimento e conidiação normais em pH 8,0 ou acima (Caddick et al., 1986a). Mutantes de *S. cerevisiae* também sensíveis a baixo pH apresentam atividade ATPásica reduzida (Mc Cusker et al., 1987). Então, mutações no gene *pacC* poderiam afetar direta ou indiretamente a ATPase da membrana plasmática, que parece desempenhar uma função importante na regulação do pH citoplasmático (Slayman et al., 1990). A recuperação do crescimento e morfologia normais da linhagem *pacCl4 inoB2 yA2*, quando esta foi cultivada na presença de citrato, maleato e acetato (Tabela 19), não pode ser atribuída ao tamponamento do

meio extracelular, pois este mutante somente mostra um aumento na quantidade de prótons produzido intracelularmente (Caddick et al., 1986a). Na tentativa de explicar esta recuperação é sugerido que estes ácidos orgânicos possam interagir com a membrana celular, restabelecendo a atividade normal de uma H^+ -ATPase ou, serem transportados para o interior da célula e agirem como tampão neutralizando a produção de H^+ pela H^+ -ATPase da membrana vacuolar (Bowman & Bowman, 1986). Uma inibição da produção e/ou extrusão de H^+ por tartarato, ou um metabólito derivado deste, também devem ser consideradas (Pombeiro et al., 1991).

IV.4. Mutante com crescimento ralo e produção de pigmento escuro, exceto em tartarato de amônio 10 mM

A caracterização inicial da linhagem melCl inoB2 mostrou que a sua colônia poderia apresentar um pigmento marron, em função da fonte de nitrogênio presente no meio de cultura (Figura 12 e Tabela 15). No entanto, estudos posteriores mostraram que a produção deste pigmento também estava relacionada ao pH de crescimento (Tabela 16). A produção de melanina, em *A. nidulans*, primeiramente descrita por Bull e Faulkner (1965), parece ocorrer quando a cultura inicia um processo de autólise, que ocasiona um aumento do pH do meio (Pirt & Rowley, 1969; Bull, 1970a,b). De fato a produção de pigmento pela linhagem melCl inoB2 somente ocorre quando o pH de crescimento é alcalino (Tabela 16). Schaeffer (1953) e Prade et al. (1984) verificaram que mutantes de *N. crassa* com produção aumentada de melanina

(pigmentação marron da colônia) apresentavam uma maior atividade da tirosinase, a principal enzima envolvida na biossíntese de melanina (Schaeffer, 1953; Bull & Faulkner, 1965; Bull & Carter, 1973; Korner & Pawalek, 1982; Prade et al., 1984; Polacheck & Kwon-Chung, 1988; Roy et al., 1989). Condições desfavoráveis como exaustão de nutrientes, altas doses de irradiação U.V. ou e outras, promovem o aparecimento de pigmento melanina em algumas espécies de fungos. A função mais provável da melanina parece ser o fortalecimento da parede celular contra a degradação, de modo similar ao escurecimento da cutícula nos insetos ou na maturação do revestimento das sementes. É portanto possível, que a melanização seja um marcador biológico de fungos altamente resistentes, que dominam em condições adversas (Bloomfield & Alexander, 1967; Clutterbuck, 1990; Zhdanova et al., 1990). A análise genética deste mutante mostrou que apenas um gene, denominado *melC*, localizado no grupo de ligação VII, está envolvido nesta característica. Martinelli e Bainbridge (1974) identificaram o gene *mela* como envolvido na produção excessiva de melanina em *A. nidulans*. Embora localizados no mesmo grupo de ligação, estes genes não estão ligados, e portanto *melC* representa um novo locus provavelmente envolvido na via biossintética de melanina no fungo *A. nidulans*.

IV.5. Considerações gerais

Os resultados obtidos e descritos neste trabalho mostram que o fungo *A. nidulans* tem pelo menos uma permease para

nitrito e possivelmente duas permeases para nitrato. Foi mostrado ainda que a desrepressão da captação de nitrito (e nitrato) é induzida pela presença dos substratos e reprimida por amônia. Além desses aspectos, foi mostrado que mutação no gene *nihA* altera o perfil cinético da captação de nitrito em função da sua concentração externa e possivelmente também altera o perfil de captação de nitrato. A mutação *chl14* parece corrigir os efeitos da mutação no gene *nihA*. Ainda foram descritos os genes *nihB*, *ctsA* e *melC*, isolados em função de apresentarem alterações aparentes nos sistemas de captação e/ou metabolização de fontes de nitrogênio. Um aspecto interessante foi mostrar que dependendo do gene mutado, citrato pode ser um estimulador (para o *pacC14*) ou inibidor (para o *ctsA1*) do crescimento radial do fungo *A. nidulans*.

VI. RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o estudo da captação de nitrato e nitrito em *Aspergillus nidulans*. Os resultados obtidos sugerem a existência de pelo menos uma permease para nitrito e possivelmente duas permeases para nitrato. Além disto, estes sistemas de transporte requerem a indução pela presença dos substratos (nitrato ou nitrito) e são reprimidos (ou inibidos) por amônia.

A hipótese do locus *niHA* estar envolvido no transporte de nitrito (Pombeiro et al., 1983) foi reforçada pois, linhagens portadoras desta mutação apresentaram um perfil cinético de captação de nitrito alterado em função da sua concentração externa. Esta alteração parece permitir uma maior captação de nitrito (quando presente em elevadas concentrações), o que explicaria o seu acúmulo intracelular a níveis tóxicos. A mutação *chl14*, que confere resistência e dependência parcial ao fungicida cloroneb, parece influenciar indiretamente o transporte de nitrito, corrigindo parcialmente os efeitos da mutação *niHA*. Um outro mutante (*niHB*) mostrou-se também sensível ao nitrito e incapaz de produzir conídios. Foi discutida a possibilidade desta mutação, identificada no grupo de ligação II, ocasionar o aparecimento de poros na membrana do mutante, o que permitiria a entrada passiva de nitrito quando em altas concentrações. O estudo dos mutantes *inoB2 ctsA1* e *ya2 inoB2 pacC14* parece indicar que alterações na estrutura da membrana podem afetar vários processos fisiológicos, particularmente ao nível do controle do

transporte de compostos para o interior da célula. Um aspecto interessante é que dependendo do gene mutado, citrato pode ser um estimulador (para o *pacCl4*) ou inibidor (para o *ctsA1*) do crescimento radial das linhagens mutantes. O gene *melC*, identificado inicialmente como responsável pela morfologia alterada em determinadas fontes de nitrogênio, está envolvido na produção de pigmento, tipo melanina, que parece conferir às linhagens produtoras resistência à lise, desempenhando um papel importante no desenvolvimento do fungo em condições adversas.

VII. SUMMARY

The objective of the present study was to investigate nitrate and nitrite uptake in *Aspergillus nidulans*. The results obtained suggest the existence of at least one permease for nitrite and possibly two permeases for nitrate. Furthermore, these transport systems require induction by the presence of the substrates (nitrate or nitrite) and are repressed (or inhibited) by ammonia.

The hypothesis that the *nihA* locus is involved in nitrite transport (Pombeiro et al., 1983) was reinforced by the fact that strains carrying this mutation presented a kinetic pattern of nitrite uptake which was altered by external nitrite concentration. This alteration seems to permit greater nitrite uptake (when nitrite is present in high concentrations), thus explaining its intracellular accumulation to toxic levels. The *chl14* mutation, which confers resistance to and partial dependence on the fungicide chloroneb, seems to affect nitrite transport, partially correcting the effects of the *nihA* mutation. Another mutant (*nihB*) also proved to be sensitive to nitrite and unable to produce conidia. We discuss the possibility of this mutation, identified in linkage group II, causes the appearance of pores in the mutant's membrane, a fact that would permit passive nitrite entry when nitrite is present in high concentrations. A study of mutants *inoB2 ctsA1* and *yA2 inoB2 pacC14* appeared to indicate that changes in membrane structure may affect several physiological processes, especially at the level

of control of transport of various compounds into the cell. An interesting feature is that, depending on the mutated gene, citrate may be a stimulator (for *pacC14*) or inhibitor (for *ctsA1*) of radial growth of the mutant strains. The *melC* gene, initially identified as being responsible for the altered morphology in certain nitrogen sources, is involved in the production of a melanin-type pigment which seems to confer resistance to lysis on producing strains, thus playing an important role in fungal development under adverse conditions.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arndt, K. & Fink, G.R. GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5'-TGACTC-3' sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 83:8516-8520, 1986
- Arst, H.N.Jr. The *areA* gene mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. In: "Proceedings of the EMBO-Alko Workshop on Molecular of Filamentous Fungi", H. Nevalainen and M. Penttila eds., Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 6:53-62, 1989
- Arst, H.N.Jr.; Bailey, C.R. & Penfold, H.A. A possible role for acid phosphatase in γ -amino butyrate uptake in *Aspergillus nidulans*. Arch. Microbiol., 125:153-158, 1980
- Arst, H.N.Jr. & Cove, D.J. Molybdate metabolism in *Aspergillus nidulans*. II. Mutations affecting phosphatase activity or galactose utilization. Molec. Gen. Genet., 108:146-153, 1970.
- Arst, H.N.Jr. & Cove, D.J. Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* Molec. Gen. Genet., 126:111-141, 1973
- Arst, H.N.Jr.; Kudla, B.; Martinez-Rossi, N.M.; Caddick, M.X.; Sibley, S. & Davies, R.W. *Aspergillus* and mouse share a new class of "zinc-finger" protein. Trends Genet., 5:291, 1989a
- Arst, H.N.Jr.; Rand, K.N. & Bailey, C.R. Do tightly linked structural genes for nitrate and nitrite reductases in *Aspergillus nidulans* form operon? Evidence from an insertional translocation which separates them. Molec. Gen. Genet., 174:89-100, 1979

- Arst, H.N.Jr. & Scazzocchio, C. Formal Genetics and Molecular Biology of the Control of Gene Expression in *Aspergillus nidulans*. In: "Gene Manipulation in Fungi". Bennett, J.W. and Lasure, L.L. eds. - Academic Press, Inc., 1985
- Arst, H.N.Jr; Tollervey, D. & Caddick, M.X. A translocation associated, loss-of-function mutation in the nitrogen metabolite repression regulatory gene of *Aspergillus nidulans* can revert intracistronically. *Mol. Gen. Genet.*, 215:364-367, 1989b
- Azevedo J.L.; Oliveira, A. & Rocha Campos, A.J. Replicador multifio para transferencia de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytopathologica*, 2:237-241, 1976
- Azevedo, J.L. & Santana, E.P. The use of chloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Lett.*, 13:6, 1975
- Bloomfield, B. & Alexander, M. Melanin and resistance of fungi to lysis. *J. Bacteriol.*, 93:1276-1280, 1967
- Bowman, B.J. & Bowman, E.J. H⁺ - ATPases from mitochondria, plasma membranes and vacuoles of fungal cells. *J. Membr. Biol.*, 94:83-97, 1986
- Brownlee, A.G. & Arst, H.N.Jr Nitrate uptake in *Aspergillus nidulans* and involvement of the third gene of the nitrate assimilation gene cluster. *J. Bacteriol.*, 155:1138-1146, 1983
- Bull, A.T. Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. *J. Gen. Microbiol.*, 63:75-94, 1970a
- Bull, A.T. Inhibition of polysaccharases by melanin. Enzyme inhibition in relation to mycolysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 137:345-356, 1970b

- Bull, A.T. & Carter, B.L.A. The isolation of tyrosinase from *Aspergillus nidulans*, its kinetic and molecular properties and some consideration of its activity in vivo. *J. Gen. Microbiol.*, 75:61-73, 1973
- Bull, A.T. & Faulkner, B.M. Melanin synthesis in wild-type and mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 41:iv, 1965
- Caballero, F.J.; Moreno-Vivian, C.; Catilho, F. & Cardenas J. Nitrite uptake system in photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* ElFl. *Biochim. Biophys. Acta*, 848:16-23, 1986
- Caddick, M.X. & Arst, H.N.Jr. Structural gene for phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res. (Camb.)*, 47:83-91, 1986
- Caddick, M.X. & Arst, H.N.Jr. Nitrogen regulation in *Aspergillus*: are two fingers better than one? *Gene*, 95: 123-127, 1990
- Caddick, M.X.; Arst, H.N.Jr. Taylor, L.H.; Johnson R.I. & Brownlee, A.G. Cloning of the regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.*, 5:1987-1090, 1986b
- Caddick, M.X.; Brownlee, A.G. and Arst, H.N.Jr. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Molec. Gen. Genet.*, 203:346-353, 1986a
- Cardoso, C.O.N.; Cardoso, E.J.B.N.; Toledo, A.C.D.; Kimati, H. & Soave, J. Guia de fungicidas. *Summa Phytopathologica*, pp. 235, 1979
- Cawse, P.A. The determination of nitrate in soil solutions by ultra-violet spectrophotometry. *Analyst (London)*, 92:311-315, 1967

- Clutterbuck, A.J. Loci and linkage map of *Aspergillus nidulans*.
Aspergillus News Letter, 15:58-72, 1981
- Clutterbuck, A. J. The genetics of conidiophore pigmentation in
Aspergillus nidulans. *J. Gen. Microbiol.*, 136:1731-1738, 1990
- Cove, D.J. Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus*
nidulans. *Biol. Rev.*, 54:291-327, 1979
- Cove, D.J. The induction and repression of nitrate reductase in the
fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 113:51-56,
1966
- Cove, D.J. & Pateman, J.A. Independently segregating genetic loci
concerned with nitrate reductase activity in *Aspergillus nidulans*.
Nature (London), 198:262-263, 1963
- Davis, B.D.; Chen, L. & Tai, P.C. Misread protein created
membrane channels: An essential step in the bactericidal action
of aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 83:6164-6168,
1986
- Davis, M.A. & Hynes, M.J. Regulatory genes in *Aspergillus nidulans*.
Trends in Genetics, 5:14-18, 1989
- Davis, M.A. & Hynes, M.J. Complementation of *areA* regulatory gene
mutations of *Aspergillus nidulans* by heterologous regulatory gene
nit-2 of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*,
84:3753-3757, 1987
- Doddema, H. & Telkamp, G.P. Uptake of nitrate by mutants of
Arabidopsis thaliana, disturbed in uptake or reduction of
nitrate. II. Kinetics. *Physiol. Plant.*, 45:332-338, 1979
- Dorn, G. Genetic analysis of the phosphatases in *Aspergillus*
nidulans. *Genet. Res.*, 6:13-2, 1965

- Dubois, E. & Grenson, M. Methylamine/Ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: multiplicity and regulation. *Molec. Gen. Genet.*, 175:67-76, 1979
- Dunn-Coleman, N.S. & Garrett, R.H. The role of glutamine synthetase and glutamine metabolism in nitrogen metabolite repression, a regulatory phenomenon in the lower eukaryote *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.*, 179:25-32, 1980
- Dunn-Coleman, N.S. & Garrett, R.H. Effect of the *gln-1b* mutation on nitrogen metabolite repression in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 145:884-888, 1981
- Dunn-Coleman, N.S.; Smarrelli, J.Jr. & Garrett, R.H. Nitrate assimilation in eukaryotic cells. *Int. Rev. Cytol.*, 92:1-45, 1984
- Fu, Y.-H.; Kneesi, J. & Marzluf, G.A. Isolation of *nit-4*, the minor nitrogen regulatory gene which mediates nitrate induction in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 171:4067-4970, 1979
- Fu, Y.-H. & Marzluf, G.A. *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Molec. Cell. Biol.*, 10(3):1056-1065, 1990
- Fuggi, A.; Vona, V.; Rigano, V.D.M.; Martino, C.D.; Martello, A. & Rigano, C. Evidence for two transport systems for nitrate in the acidophilic thermophilic alga *Cyanidium caldarium*. *Arch. Microbiol.*, 137:281-285, 1984
- Goldsmith, J.; Livoni, J.P.; Norberg, C.L. & Segel, I.H. Regulation of nitrate uptake in *Penicillium chrysogenum* by ammonium ion. *Plant Physiol.*, 52:362-367, 1973

- Goyal, S.S. & Huffaker, R.C. The uptake of NO₃, NO₂ and NH₄ by intact wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiol.*, 82:1051-1056, 1986
- Grove, G. & Marzluf, G.A. Identification of the product of the major regulation gene of the nitrogen control circuit of *Neurospora crassa* as a nuclear DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 256:463-470, 1981
- Han, S.W.; Pombeiro, S.R.C.; Martinez-Rossi, N.M. & Rossi, A. Regulation of inorganic nitrogen uptake in *Aspergillus nidulans*. Abstract Book of 14th International Congress of Biochemistry, 2:80, 1988
- Hastie, A.C. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, 226:771, 1970
- Hynes, M.J. Studies on the role of the *areA* gene in the regulation of nitrogen catabolism in *Aspergillus nidulans*. *Aust. J. Biol. Sci.*, 28:301-313, 1975
- Jackson, W.A.; Johnson, R.E. & Volk, R.J. Nitrite uptake in wheat seedlings as influenced by nitrate and ammonium. *Physiol. Plant.*, 32:108-114, 1974
- Jacob, F. & Monod, F. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Molec. Biol.*, 3:318-356, 1961
- 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. & Innis, M.A. Isolation and characterization of the *crnA-niiA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 90:181-192, 1990
- Kafer, E. The process of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46:1581-1609, 1961

- Kafer, E. The origin of translocation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52:217-232, 1965
- Kinghorn, J.R.; Montague, P. & Unkles, S.E. Regulatory, structural and biotechnological aspects of the *Aspergillus nidulans* gene cluster for nitrate assimilation. In: "Inorganic Nitrogen in Plants and Microorganisms": uptake and metabolism. Ulrich, W.R.; Rigano, C.; Fuggi, A.; Aparicio, P.J. Springer Verlag Press, pp.287-295, 1990
- Korner, A. & Pawalek, J.M. Mammalian tyrosinase catalyses three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science*, 217:1163-1165, 1982
- Kosland, D.E.Jr. The molecular basis for enzyme regulation. In: "The Enzymes", P.D. Boyer ed., Academic Press, New York, vol. I, pp. 342-395, 1970
- Kudla, B.; Caddick, M.X.; Langdon, T.; Martinez-Rossi, N.M.; Bennett, C.F.; Sibley, S.; Davies, R.W. & Arst, H.N.Jr. 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, 1990
- Lineweaver, H. & Burk, D. The determinations of the enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56:658-666, 1934
- MacDonald, D.W. A single mutation leads to loss of glutamine synthetase and relief of ammonium repression in *Aspergillus*. *Curr. Genet.*, 6:203-208, 1982
- MacRae, W.D.; Buxton, F.P. Sibley, S.; Garven, S.; Gwynne, D.I.; Davies, R.W. & Arst, H.N.Jr. A phosphate-repressible acid phosphatase gene from *Aspergillus niger*: its cloning, sequencing and transcriptional analysis. *Gene*, 71:339-348, 1988
- Martinelli, S.D. & Bainbridge, B.W. Phenoloxidases of *Aspergillus nidulans*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 63:361-370, 1974

- Martinez-Rossi, N.M. & Azevedo, J.L. Two-way selection of mutants and revertents to chloroneb resistance in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 96:31-39, 1982
- Marzluf, G.A. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiol. Rev.*, 45:437-461, 1981
- Marzluf, G.A.; Perrine, K.G. & Nahm, B.H. Genetic regulation of nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*. In: *Molecular Genetics of Filamentous Fungi*. Alan R. Liss, Inc. pp. 83-94, 1985
- McCully, K.S. & Forbes, E. The use of p-fluorophenylalanine with "Master Strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning to linkage groups. *Genet. Res.*, 6:352-359, 1965
- McCusker, J.M.; Perlin, D.S. & Haber, J.E. Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Cell. Biol.*, 7:4082-4088, 1987
- Nicolas, D.J. & Nason, A. Mechanism of action of nitrate reductase from *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, 211:183-197, 1954
- Pateman, J.A. & Cove, D.J. Regulation of nitrate reduction in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 215:1234-1237, 1967
- Pateman, J.A.; Cove, D.J.; Rever, B.M. & Roberts, D.B. A common cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature (London)*, 201:58-60, 1964
- Pateman, J.A.; Rever, B.M. & Cove, D.J. Genetic and biochemical studies of nitrate reduction in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J.*, 104:103-111, 1967
- Pirt, S.J. & Rowley, B.I. Melanin production in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J.*, 114:9p, 1969

- Polacheck, I. & Kwon-Chung, K.J. Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *J. Gen. Microbiol.*, 134:1037-1041, 1988
- Pombeiro, S.R.C.; Martinez-Rossi, N.M. & Rossi, A. Nitrite toxicity in *Aspergillus nidulans*: a new locus in a proAl pabaA6 yA2 strain. *Genet. Res.*, 41:203-207, 1983
- Pombeiro, S.R.C.; Martinez-Rossi, N.M. & Rossi, A. Effect of citrate on radial growth and conidiation of the mould *Aspergillus nidulans*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*: in press, 1991
- Pontecorvo, G. & Roper, J.A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of poliploid in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 6:VII, 1952
- Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hemmons, L.M.; MacDonald, K.D. & Bufton, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, 5:141-238, 1953
- Prade, R.A.; Cruz, A.K. & Terenzi, H.F. Regulation of tyrosinase during the vegetative and sexual life cycles of *Neurospora crassa*. *Arch. Microbiol.*, 140:236-242, 1984
- Rand, K.N. & Arst, H.N.Jr. A mutation in *Aspergillus nidulans* which affects the regulation of nitrite reductase and is tightly to its structural gene. *Molec. Gen. Genet.*, 155:67-75, 1977
- Rand, K.N. & Arst, H.N.Jr. Mutations in nira gene of *Aspergillus nidulans* and nitrogen metabolism. *Nature* (London), 272:732-734, 1978
- Rossi, A. & Arst, H.N.Jr. Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely acidic pH acidify the medium less than wild type when grow at more moderate pH. *FEMS Microbiol. Lett.*, 66:51-54, 1990

- Roy, P.; Nayak, K.K. Pandey, N.K. Characterization of a novel yeast synthesizing melanin-like pigment. *J. Gen. Microbiol.*, 135:3385-3391, 1989
- Schaeffer, P. A black mutant of *Neurospora crassa*. Mode of action of the mutant allele and action of light on melanogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 47:359-379, 1953
- Schloemer, R.H. & Garrett, R.H. Uptake of nitrite by *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 118:270-274, 1974b
- Schloemer, R.H. & Garrett, R.H. Nitrate transport system in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 118:259-269, 1974a
- Shah, A.J.; Tilburn, J.; Adlard, M.W. & Arst, H.N.Jr. pH regulation of penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 77:209-212, 1991
- Slayman, C.L.; Kaminski, P. & Stetson, D. Structure and function of fungal plasma-membrane ATPases. In: "Biochemistry of cell walls and membranes in Fungi", P.J. Kuhn, A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goosey and L.G. Copping eds., Springer-Verlag, Germany, pp. 294-316, 1990
- Snell, F.D. & Snell, C.T. *Colorimetric Methods of Analysis*, van Nostand, New York, vol. 2, pp. 804-805, 1949
- Sorger, G.J. & Giles, N.H. Genetic control of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 52:777-788, 1965
- Thayer, J.R. & Huffaker, R.C. Kinetic evaluation, using ¹³N, reveals two assimilatory nitrate transport systems in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 149:198-202, 1982

- Tollervey, D.W. & Arst, H.N.Jr. Mutations to constitutivity and derepression are separate and separable in a regulatory gene of *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.*, 4:63-68, 1981
- Tollervey, D.W. & Arst, H.N.Jr. Domain-wide, locus-specific suppression of nitrogen metabolite repressed mutations in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.*, 6:79-85, 1982
- Tomsett, A.B. The genetics and biochemistry of nitrate assimilation in ascomycete fungi. In: "Nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi". Boddy, L.; Marchant, R. & Read, D.J. eds., Cambridge University Press, Cambridge. pp. 33-58, 1989
- Tomsett, A.B. & Garrett, R.H. The isolation and characterization of mutants defective in nitrate assimilation in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 95:649-660, 1980
- Unkles, S.E.; Hawker, K.L.; Grieve, C.; Campbell, E.I.; Montague, P. & Kinghorn, J.R. *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88:204-208, 1991
- Wiame, J.M.; Grenson, M. & Arst, H.N.Jr. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv. Microb. Physiol.*, 26:2-88, 1985
- Williams, E.M. & Eddy, F.B. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *J. Comp. Physiol. B*, 156:867-872, 1986
- Zhdanova, N.N.; Borisjuk, L.G. & Artzatbanov, V.Y. Occurrence of the K type of life strategy in some melanin-containing fungi under experimental conditions. *Folia Microbiol.*, 35:423-430, 1990

VIII. APÉNDICES

APÊNDICE 1 - Análise do teste X (qui-quadrado) dos segregantes meióticos provenientes do cruzamento entre as linhagens 1 e MSF.

(a)		TOTAL	2 X	SIGNIFICÂNCIA
SEGREGANTES MEIÓTICOS				
nih +	nih -			
70	69	139	0,007	(b) n.s.

H₀: a segregação dos dois grupos estão de acordo com a herança mendeliana simples (1:1).
 H₁: a segregação dos dois grupos não está de acordo com a herança Mendeliana simples (1:1).
 Grau de significância = 0,05 (5 %)

(a): nih +: crescimento em 140 mM de nitrito de sódio
 nih -: não crescimento em 140 mM de nitrito de sódio

(b): n.s.: não significativo

APÊNDICE 2 - Análise mitótica dos segregantes haplóides obtidos do diplóide heterocigoto 1 // MSF, usando benlate (0,63 ug/ ml de meio) como agente naploidizante.

GRUPO DE LIGAÇÃO	MARCADORES GENÉTICOS	(a) SEGREGANTES MITÓTICOS	
		nih +	nih -
I	y +	18	5
	y -	35	0
(b)			
II	acr s	0	5
	acr r	53	0
III	gal +	34	1
	gal -	19	4
IV	pyro +	5	1
	pyro -	48	4
IV	ino +	30	0
	ino -	23	5
V	fac +	20	1
	fac -	33	4
VI	s +	29	2
	s -	24	3
VII	nic +	33	4
	nic -	20	1
VIII	ribo +	48	4
	ribo -	5	1

(a) nih + : crescimento em 140 mM de nitrito de sódio
 nih - : não crescimento em 140 mM de nitrito de sódio

(b): grupo de ligação onde foi localizada a mutação nihB.

APÊNDICE 3 - Análise meiótica dos cruzamentos entre as linhagens 1 e MSF.

MARCADORES GENÉTICOS	GRUPO DE LIGAÇÃO	(a)		(b)		LIGAÇÃO GENÉTICA (Z)
		SEGREGANTES		TIPOS		
		nih+	nih-	P	R	
acr s	II	58	76	143	105	42,3
acr r		67	47			

(a): nih +: crescimento em 140 mM de nitrito de sódio
 nih -: não crescimento em 140 mM de nitrito de sódio

(b): P: parentais
 R: recombinantes

APÊNDICE 4 - Análise do teste X (qui-quadrado) dos segregantes meióticos provenientes do cruzamento entre as linhagens 2 e MSE.

(a)				
SEGREGANTES MEIÓTICOS				
cts +	cts -	TOTAL	χ^2	SIGNIFICÂNCIA
99	83	182	1,4	(b) n.s.

H₀: a segregação dos dois grupos estão de acordo com a herança Mendeliana simples (1:1).
 H₁: a segregação dos dois grupos não está de acordo com a herança Mendeliana simples (1:1).
 Grau de significância = 0,05 (5 %)

(a): cts +: crescimento normal em citrato (20 mM).
 cts -: crescimento reduzido em citrato (20 mM).

(b): n.s.: não significativo

APÊNDICE 5 - Análise mitótica dos segregantes haplóides obtidos do diplóide heterozigoto 2 // MSE, usando chloroneb (20 ug/ ml de meio) como agente haploidizante.

GRUPO DE LIGAÇÃO	MARCADORES GENÉTICOS	(a)	
		SEGREGANTES MITÓTICOS cts +	cts -
II	w +	12	0
	w -	15	1
III	gal +	10	1
	gal -	17	0
(b)			
IV	pyro +	0	1
	pyro -	27	0
(b)			
IV	ino +	27	0
	ino -	0	1
V	fac +	27	1
	fac -	0	0
VI	s +	17	1
	s -	10	0
VII	nic +	16	1
	nic -	11	0
VIII	ribo +	18	1
	ribo -	9	0

(a) cts + : crescimento normal em citrato (20 mM).

cts - : crescimento reduzido em citrato (20 mM).

(b): grupo de ligação onde foi localizada a mutação ctsA.

APÊNDICE 6 - Análise meiótica dos cruzamentos entre as linhagens 2 e MSE.

MARCADORES GENÉTICOS	GRUPO DE LIGAÇÃO	(a)		(b)		LIGAÇÃO GENÉTICA (Z)
		SEGREGANTES		TIPOS		
		cts+	cts-	P	R	
ino+	IV	36	52	80	102	56
ino-		50	44			
pyro+	IV	57	33	74	108	59
pyro-		41	51			

(a): cts + : crescimento normal em citrato (20 mM).
 cts - : crescimento reduzido em citrato (20 mM).

(b): P: parentais
 R: recombinantes

2

APÊNDICE 7 - Análise do teste X (qui-quadrado) dos segregantes meióticos provenientes do cruzamento entre as linhagens 3 e NSF.

(a)		TOTAL	2 X	SIGNIFICÂNCIA
me1 -	me1 +			
109	104	213	0,117	(b) n.s.

H₀: a segregação dos dois grupos estão de acordo com a herança Mendeliana simples (1:1).

H₁: a segregação dos dois grupos não está de acordo com a herança Mendeliana simples (1:1).

Grau de significância = 0,05 (5 %)

(a): me1 - : presença de pigmento escuro

me1 + : ausência de pigmento escuro

(b): n.s.: não significativo

APENDICE B - Análise mitótica dos segregantes haplóides obtidos do diplóide heterozigoto 3 // MSF, usando chloroneb (20 ug/ ml de meio) como agente haploidizante.

GRUPO DE LIGAÇÃO	MARCADORES GENÉTICOS	(a) SEGREGANTES MITÓTICOS	
		mel -	mel +
I	y +	1	3
	y -	1	10
II	acr s	2	10
	acr r	0	3
III	gal +	1	9
	gal -	1	4
IV	pyro +	1	2
	pyro -	1	11
IV	ino +	1	8
	ino -	1	5
V	fac +	2	8
	fac -	0	5
VI	s +	2	8
	s -	0	5
(b) VII	nic +	2	0
	nic -	0	13
VIII	ribo +	0	5
	ribo -	2	8

(a) mel- : presença de pigmento escuro.
mel+ : ausência de pigmento escuro.

(b): grupo de ligação onde foi localizada a mutação melC.

APÊNDICE 9 - Análise do teste X(qui-quadrado) dos segregantes meióticos provenientes do cruzamento entre as linhagens 4 e MSE.

(a)				
SEGREGANTES MEIÓTICOS				
morf.normal	morf.alterada	TOTAL	χ^2	SIGNIFICANCIA
87	97	184	0,54	(b) n.s.

H₀: a segregação dos dois grupos estão de acordo com a herança Mendeliana simples (1:1).

H₁: a segregação dos dois grupos não está de acordo com a herança Mendeliana simples (1:1).

Grau de significância = 0,05 (5 %)

(a): morf. normal: conidiacão característica da linhagem.

morf. alterada: sem conidiacão.

(b): n.s.: não significativo