

SUPRESSORES DO MUTANTE *nic* 8 EM
Aspergillus nidulans

José Branco de Miranda Filho

Engenheiro - Agrônomo

Auxiliar de Ensino do Departamento e Instituto de Genética da
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de S. Paulo

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz" da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Mestre.

PIRACICABA
São Paulo - Brasil
1972

À
minha mãe
e
à
tia Olinda,

D E D I C O

A G R A D E C I M E N T O S

Desejamos dirigir nossos sinceros agradecimentos a :

Professor Dr. João Lúcio de Azevedo , pelo estímulo e valiosa orientação na realização deste trabalho;

Professor Dr. Almiro Blumenschein , pela orientação profissional e pelas facilidades concedidas como Diretor do Instituto de Genética;

Professor Dr. José Theophilo do Amaral Gurgel , pela revisão cuidadosa do manuscrito e pelas valiosas críticas apresentadas;

Professor Dr. Roland Vencovsky , pelas sugestões e críticas na análise estatística;

Professora Dr.^a Nelly Rahame Neder , pela orientação nos estágios iniciais da realização deste trabalho;

Queremos agradecer também ao CONSELHO NACIONAL DE PESQUISAS (CNPq) , pela Bolsa de Estudos concedida para realização do Curso de Pós Graduação, e a FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E AGRONOMIA DE JABOTI CABAL , pela oportunidade de aperfeiçoamento concedida.

Finalmente, agradecemos a todos que direta ou indiretamente prestaram sua colaboração para esta realização.

ÍNDICE

	Página
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 - Referências Gerais	3
2.1 - Referências Específicas	6
3 - MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 - Símbolo e Fenótipo dos Mutantes Usados	14
3.2 - Suplementos Adicionados ao Meio Mínimo	15
3.3 - Linhagens Utilizadas	15
3.4 - Meios de Cultura e Soluções Usadas	16
3.4.1 - Meio mínimo	16
3.4.2 - Meio completo	17
3.4.3 - Meio de acetato de amônio	17
3.4.4 - Meio mínimo de galactose	17
3.4.5 - Ácido nucléico de leveduras hidrolisado	17
3.4.6 - Solução de vitaminas	18
3.4.7 - Solução salina 0,15 M	18
3.4.8 - Solução de "Tween"	18
3.4.9 - Meio mínimo líquido + 2% de meio completo	18
3.4.10 - Placas de análise	18
3.5 - Curva de Sobrevivência	19
3.6 - Obtenção dos Supressores	19
3.7 - Semeadura e Incubação	20

	Página
3.8 - Técnicas de Análise Genética	21
3.8.1 - Obtenção de heterocários	21
3.8.2 - Análise meiótica	21
3.8.3 - Análise mitótica	22
3.8.4 - Teste de três pontos	24
3.8.5 - Teste de dominância e recessividade	24
3.8.6 - Teste de alelismo	25
3.9 - Teste de Resistência à <u>p</u> -Fluorofenilalanina	26
3.10 - Capacidade de Crescimento das Linhagens <u>MSE su</u> <u>nic 8</u>	26
4 - RESULTADOS OBTIDOS	28
4.1 - Curva de Sobrevivência	28
4.2 - Obtenção dos Supressores	28
4.3 - Análise Genética	29
4.3.1 - Análise mitótica	29
4.3.2 - Análise meiótica e teste de três pontos	30
4.4 - Teste de Dominância e Recessividade	47
4.5 - Resistência à <u>p</u> -Fluorofenilalanina	48
4.6 - Capacidade de Crescimento das Linhagens <u>MSE</u> e <u>MSE su nic 8</u>	50
4.7 - Teste de Alelismo	53
5 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	56
5.1 - Obtenção dos Supressores	56
5.2 - Análise Mitótica	56

	Página
5.3 - Análise Meiótica e Teste de Três Pontos	58
5.4 - Dominância e Recessividade em Heterocários e Di- plóides e Relações com o Modo de Ação Gênica	60
5.5 - Resistência à p ⁺ Fluorofenilalanina	64
5.6 - Taxa de Crescimento, Eficiência e Diferenciação das Linhagens	65
5.7 - Alelismo	67
5.8 - Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros	67
6 - RESUMO	72
7 - SUMMARY	74
8 - BIBLIOGRAFIA	76

1 - INTRODUÇÃO

O conhecimento da existência de supressores no sistema genético dos seres vivos abriu novos campos no estudo da hereditariedade. O termo "supressão" já foi utilizado por Sturtevant em 1920, (apud GORINI & BECKWITH, 1966) referindo-se ao desaparecimento do fenótipo mutante através de mutação em loco distinto do loco da mutação original. Segundo este conceito, a mutação original pode ser recuperada na descendência de um cruzamento entre um tipo selvagem e aquele que sofreu reversão. Supressores desse tipo são chamados de intergênicos. GORINI & BECKWITH (1966) classificaram os supressores em diretos e indiretos. Supressores indiretos são do tipo intergênico, não alterando a mutação original ou o mecanismo de sua ação gênica; agem de maneira a suprimir a deficiência, mas sem interferir com a respectiva mutação. Supressores diretos podem ser de dois tipos: 1) Intragênicos, relacionados a alterações no cistron da mutação original e 2) de Informação (informational suppressors), de ação intergênica, que atuam no mecanismo de transferência da informação genética na síntese de proteínas. Estes últimos incluem supressores de mutantes "non sense" (sem sentido) e de mutantes de substituição (mis-sense").

O conceito de supressores também inclui casos em que o supressor impede a manifestação de outros genes. Este tipo de ação supressora pode explicar certos casos de diferenciação sexual e diferenciação celular nos processos de desenvolvimento dos organismos superiores.

Depreende-se, portanto, que os supressores desempenham papel importante na atividade biológica dos organismos. Sua importância estende-se, ainda, como uma das causas de variabilidade genética. Nos microrganismos, por exemplo, a supressão de genes pode causar variações de maior valor adaptativo; em se tratando de microrganismos patogênicos, tal processo pode resultar em consequências de importância.

Entretanto, o estudo de supressores é um campo da Genética relativamente pouco explorado e, certamente, o seu desenvolvimento trará grandes contribuições na elucidação de problemas genéticos ou biológicos.

A finalidade do presente trabalho foi a de, utilizando-se o fungo filamentosso Aspergillus nidulans (Eidam) Winter, estudar o sistema de supressão da deficiência para o ácido nicotínico, visando oferecer uma contribuição aos estudos de supressores em genética. Escolheu-se o Aspergillus nidulans pelo facto de ser este um organismo bem estudado geneticamente e por apresentar um sistema biológico com uma série de vantagens para estudos genéticos (PONTECORVO e col., 1953): apresenta uma fase vegetativa haplóide, com formação de conídios uninucleados que permitem a obtenção de colônias isoladas, geneticamente puras; apresenta um ciclo parasexual (ROPER, 1952) com formação de conídios diplóides que por haploidização através de aneuploidia (KAFFER, 1961), dão formação a setos haplóides com segregação cromossômica que permite uma análise mitótica normal; além disso, através do ciclo sexual, este fungo dá origem a peritécios com produção de ascosporos (haplóides), através de cariogamia e meiose (ELLIOTT, 1960) que permitem a análise meiótica. Assim, pode-se ter uma análise genética completa. A formação de núcleos diplóides (parasexualidade) e a possibilidade de obtenção de heterocários também permitem estudos de complementação e alelismo, dominância e recessividade, bem como sobre comportamento de genes alelos no mesmo núcleo (diplóide) ou em núcleos diferentes (heterocário).

Mutantes auxotróficos têm sido largamente usados em genética de microrganismos e para estudos de supressores constituem, sem dúvida, um bom material. No presente trabalho foi utilizado um mutante deficiente para a síntese de ácido nicotínico que, sendo auxotrófico, permite o isolamento e estudo de respectivos supressores por um método seletivo relativamente simples.

O estudo dos supressores foi feito sob diversos aspectos, salientando-se sua localização no mapa genético, suas relações de dominância ou recessividade em diplóides e heterocários e seu modo de ação gênica.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - REFERÊNCIAS GERAIS

Um dos primeiros trabalhos referentes a genes supressores é o de Beadle & Ephrussi (1936) , apud GORINI & BECKWITH (1966), que demonstraram que um supressor recessivo do gene y (côr "vermillion" do olho de drosófila) era capaz de restaurar parcialmente a capacidade do indivíduo mutante em produzir cinurenina, uma substância exigida para desenvolvimento da coloração tipo selvagem do olho.

Posteriormente, muitos trabalhos foram realizados com supressores, principalmente em microrganismos. Nesse particular, foram muito úteis os mutantes auxotróficos. Os supressores indiretos foram relatados com frequência em diversos organismos.

Com relação aos supressores diretos os mais frequentemente estudados foram os de mutantes "amber" e "ochre" como se pode depreender pelas recentes revisões de YANOFSKY & ST. LAWRENCE (1960); BRENNER & BECKWITH (1965); GORINI & BECKWITH (1966); SADGOPAL (1968) e de GORINI (1970) .

Com menor frequência outros tipos de supressores diretos foram também estudados (BRODY & YANOFSKY, 1965 ; CARBON, BERG & YANOFSKY, 1966 ; GUPTA & KHORANA, 1966 ; BERG, YANOFSKY & CARBON, 1967 ; CARBON & CURRY, 1968; HILL e col. 1969 ; WITKIN, 1969) . Aliás, foi com um tipo de supressor direto, os intragênicos, que CRICK e col. (1961) efetuaram estudos com mutantes induzidos por acridinas em seu trabalho clássico com bacteriófago T_4 de Escherichia coli, que vieram esclarecer diversas das propriedades do código genético.

No que diz respeito à natureza dos organismos estudados, a literatura mostra que os microrganismos foram os preferidos em estudos de supressores, embora alguns trabalhos tenham sido realizados em organismos superiores.

Em fungos, especificamente os filamentosos e os basidiomicetos, os trabalhos mais importantes que tratam de supressores são discutidos com mais de talhe no ítem seguinte, visto que são os mais estritamente relacionados com o presente trabalho.

Referências a respeito de supressores em leveduras são encontradas principalmente, nos trabalhos de HAWTHORNE & MORTIMER (1963) ; COX (1965) ; GILMORE & MORTIMER (1966) ; OSHIMA & OSHIMA (1966) ; GILMORE (1967) ; GILMORE, STEWART & SHERMAN (1968) ; HAWTHORNE (1969) e de COX (1971) . Dentre os diversos trabalhos conhecidos, destaca-se o de CLARKE (1963) que, estudando o efeito da metionina como responsável pela inibição de reversões de mutantes deficientes para adenina (ad⁻) em Schizosaccharomyces pombe , constatou que muitas das reversões eram devidas a supressores e que a metionina somente inibe a expressão de reversões verdadeiras (com rápido crescimento em meio mínimo) mas não inibe o crescimento de reversões devidas a supressores.

Em bactérias, inúmeros trabalhos são conhecidos com referência a todos os tipos de supressores, os quais são citados nas revisões mencionadas anteriormente. Alguns, entretanto são destacados como exemplo. HOWART (1958) , detectou vários supressores do mutante cys (deficiência para cistina) em Salmonella typhimurium . Verificou que todos os supressores eram não específicos, capazes de suprimir diversos mutantes. O mecanismo de ação dos supressores não foi estudado bioquimicamente, mas o autor considera que eles agem, provavelmente, pela introdução de um processo metabólico alternativo, capaz de compensar o bloqueio da via metabólica no mutante original. CHILDS (1967), utilizando linhagens deficientes para metionina em Salmonella typhimurium, constatou a presença de supressores entre vários mutantes capazes de crescer em meio mínimo não suplementado com aquêl aminoácido; diferenciou supressores com e sem especificidade para determinadas mutações met B . Finalmente, concluiu que as mutações eram do tipo que resulta na substituição de um aminoácido por outro na cadeia polipeptídica e que o mecanismo de supressão devia estar relacionado

com uma alteração na tradução do codon alterado. KEMPER & MARGOLIN (1969) relataram a ocorrência de um supressor indireto (su_{Q₁}) do gene leu D em Salmonella typhimurium. Determinaram a posição relativa do loco supressor e propuseram um esquema para explicar o mecanismo de supressão, o qual deve ser ao nível de interação proteína - proteína, uma vez que leu C e leu D interagem para formar um complexo que leva à produção de isopropilmalato isomerase na biosíntese de leucina. O su_{Q₁} seria, portanto, um substituto do gene leu D, cujo produto é capaz de interagir com leu C para dar um complexo com atividade enzimática. SOLL & BERG (1969) demonstraram a existência de uma nova classe de supressores em Escherichia coli, os supressores recessivos letais. Verificaram que a bactéria somente sobrevive quando, juntamente com o supressor, também estiver presente o seu alelo selvagem, ou seja, quando a célula for heterogota su⁺/su⁻. Provavelmente, a mutação causa alteração em um componente celular essencial, cuja ausência total pode ser letal.

Em organismos superiores, alguns trabalhos foram realizados demonstrando a existência de supressores. Em plantas, por exemplo, JAIN (1966), em estudos de mutantes para pigmentação ("yellow virescent" e "light green") em cevada, constatou que a reversão dos mutantes para verde normal era devida a supressores localizados em um loco diferente da mutação original e que, enquanto o mutante apresentava apenas 15% do conteúdo de clorofila em relação ao tipo selvagem, o mesmo mutante, em presença do supressor, exibia cerca de 65% de clorofila também em relação ao tipo selvagem.

Em animais, o efeito de supressão de genes é citado por diversos autores. WAGNER & MITCHELL (1955) apresentaram uma lista de diversos supressores estudados em Drosophila melanogaster. Lyon e col. e Russel (1964, apud BAKER, 1968) apresentaram resultados de estudos de supressão envolvendo translocação de autosomas com o cromossoma X de rato. RIZKI e col. (1970) apresentaram resultados de um estudo minucioso de supressores do mutante y (côr "vermillion" do olho) em drosófila.

Finalmente, a influência de supressores no processo de diferenciação sexual e diferenciação celular é citada por alguns autores, onde a supressão é interpretada sob um conceito diferente daquele já discutido. WESTGAARD (1958) propôs um mecanismo envolvendo supressores de genes determinadores do sexo para explicar a diferenciação sexual em alguns gêneros de plantas diólicas (Ecballium, Carica e Melandrium). BARTH (1964) referiu-se à influência de supressores no processo de diferenciação celular, como atuando à semelhança dos genes reguladores propostos por JACOB & MONOD (1961); BAKER (1968) discutiu a importância da supressão gênica no processo de desenvolvimento em drosófila.

2.2 - REFERÊNCIAS ESPECÍFICAS: Ascomicetos (filamentosos) e Basidiomicetos

HOULAHAN & MITCHELL (1947) demonstraram, pela primeira vez, a ocorrência de supressores em Neurospora crassa. Utilizaram mutantes deficientes para pirimidina (mutantes pyr 3) e concluíram que a hipótese da supressão pela existência de uma duplicação do loco pyr — que, de uma forma inativa, passaria a uma forma ativa por mutação — não é válida, uma vez que o supressor é inibido por arginina, o que não ocorre com o loco pyr no tipo selvagem. Preconizaram também a existência de alelos múltiplos neste fungo, com base nas interações do supressor com diversos mutantes pyr. Posteriormente (MITCHELL & MITCHELL, 1952), publicaram uma série de informações adicionais sobre o loco pyr, principalmente sobre a influência do supressor de pyr em outros mutantes nutricionais. Confirmaram também a invalidez da hipótese de alelos múltiplos anteriormente mencionada, desde que ficou provada a existência de supressores atuando tanto em locos diferentes da mesma deficiência, como em mutantes de efeitos fenotípicos não relacionados.

BONNER (1951) relatou a existência de alguns supressores da deficiência para triptofano, em Neurospora, referindo-se, especialmente, ao supressor do mutante 2198. Este revelou-se específico em seu efeito, visto que não foi capaz de suprir deficiência para triptofano em outras linhagens. O mutante

2198 caracterizou-se pela sua incapacidade de converter ácido antranílico em indol na biosíntese de triptofano e a sua supressão resulta em restauração da atividade de uma enzima específica, à semelhança do supressor do mutante S-1952 descrito por YANOFSKY (1952) .

GILES (1951) e GILES & PARTRIDGE (1953) relataram a ocorrência de supressores de mutantes deficientes para metionina e para inositol em Neurospora. Os mais frequentes foram os supressores de met. Um deles revelou-se não específico, uma vez que foi capaz de agir sobre um outro mutante deficiente em metionina, com bloqueio metabólico em uma reação subsequente à bloqueada pelo mutante original (met 4894) .

LEIN & LEIN (1952) utilizaram três diferentes linhagens de Neurospora, deficientes para acetato, visando demonstrar o efeito de um mesmo supressor em genes não alelos. O supressor foi obtido em uma das linhagens e comprovaram o seu efeito supressor nas duas outras. Sugeriram que o supressor age, provavelmente, pela introdução de um mecanismo metabólico secundário na produção de acetato, o qual normalmente é inoperante, devido a um fenômeno de inibição.

YANOFSKY (1952) estudou as relações gene - enzima em Neurospora utilizando mutantes incapazes de formar triptofano sintetase, a enzima responsável pelo acoplamento de indol e serina na biosíntese de triptofano. Os dois mutantes estudados, C-83 (ou td-1) e S-1952 (ou td-2), acumulavam indol e não foi detectada a presença de triptofano sintetase em extrato livre de células. Constatou a ocorrência, em outro loco, de um supressor parcial específico para td-2 e sem ação sobre o mutante td-1. Constatou, ainda, que a triptofano sintase não apresentou diferenças quando produzida por linhagens selvagens ou por linhagens td-2 com supressor. Em estudos subsequentes (YANOFSKY & BONNER, 1955.a, 1955.b) trabalhando com outros mutantes td verificaram também a ocorrência de supressores, sendo que muitos deles não eram alelos. Das observações de interações desses mutantes com os supressores, concluíram que, em

bora os mutantes td apresentem similaridades genéticas e bioquímicas, há diferenças marcantes entre muitos deles, visto que reagiram diferentemente em presença dos diversos supressores.

Supressores de mutantes td (deficientes para triptofano) em Neurospora crassa também foram estudados por outros autores. SUSKIND & KUREK (1959), estudando estes mutantes, concluíram que a ação do supressor está relacionada com a expressão da atividade da enzima triptofano sintetase e não com a formação da mesma, provavelmente pelo controle de determinados fatores, como disponibilidade de metais e coenzimas ou a concentração de agentes quelantes; é o caso, por exemplo, do mutante td 24 que forma uma enzima metal-sensível (inativa) e o supressor su 24 que é capaz de transformá-la numa forma ativa sem alterar a estrutura da mesma. YOURNO & SUSKIND (1963, 1964.a e 1964.b) estudaram detalhadamente o mutante td 201 e seus supressores. Verificaram a alta especificidade daqueles supressores, visto que não exerceram ação em outros mutantes de triptofano sintetase, inclusive o td 141, um mutante fenotipicamente semelhante ao td 201. Concluíram que os mutantes td 201 com supressor produzem pequenas quantidades de enzima, dada a baixa taxa de transformação de indolglicerolfosfato na produção de indol ou diretamente de triptofano, e que triptofano sintetase produzida é muito semelhante àquela do tipo selvagem. Além disso, a capacidade dos mutantes td 201 de formar CRM ("cross reacting material") normal levou-os à conclusão de que não se tratava de um mutante do tipo sem sentido ("non sense") e que o supressor desse mutante age de alguma forma capaz de restituir, em uma certa fração das moléculas da enzima alterada, a sua estrutura original. TERRY (1966) demonstrou pela primeira vez que mutantes CRM⁻ do loco td podem reverter para prototrofia por ação de supressores à semelhança de mutantes CRM⁻ em outros organismos. Constatou que existem pelo menos dois locos supressores do mutante CRM⁻ do loco td 140 e que este mais se assemelha a um mutante do tipo sem sentido. Foi eliminada a hipótese de que o supressor age por ativação de um processo biossintético alternati-

vo, pois não foi possível obter reversão para td 120, que é um mutante por deleção.

Supressores de outros mutantes foram também estudados, não só em Neurospora, mas também em outros fungos.

REISSIG (1959, 1960, 1963.a e 1963.b), em Neurospora, verificou que mutantes pyr 3 (deficientes para pirimidina) agem como supressores de mutantes cit (deficientes para citrulina) e de mutantes arg 2 (deficientes para arginina). Linhagens de genótipo cit pyr 3⁺ requeriam somente citrulina, enquanto que linhagens cit pyr 3 requeriam somente pirimidina para crescimento. Do mesmo modo, duplos mutantes arg pyr eram deficientes para pirimidina, mas prototróficas para arginina. Verificou também a ocorrência de um terceiro alelo no loco pyr, o mutante pyr (su arg), de atividade intermediária, supressor de arg mas não deficiente para pirimidina. Com base nestas observações, propôs um método para isolamento e identificação de mutantes de uma maneira indireta. Além disso, apresentou uma série de evidências que esclarecem o mecanismo de supressão de pyr sobre cit ou arg: o mutante arg causa um bloqueio parcial na síntese de carbamil fosfato, um precursor comum de arginina e pirimidina; de carbamil fosfato em diante, a biossíntese de arginina é catalizada por ornitina transcarbamilase (OTC) e a de pirimidina é catalizada por aspartato transcarbamilase (ATC), onde ATC e OTC competem por carbamil fosfato. O mutante pyr 3 d causa uma deficiência em ATC, diminuindo o seu poder de competição com OTC por carbamil fosfato; o alelo pyr (su arg), causa supressão parcial de arg, provavelmente como resultado do menor decréscimo na atividade de ATC.

STRAUSS & PIEROG (1954) estudaram supressores de mutantes deficientes para acetato em Neurospora e descreveram o mecanismo de supressão. Os mutantes ac causam bloqueio no passo metabólico entre ácido pirúvico e ácido acético. Tais mutantes se caracterizam por sofrer inibição do crescimento em presença de glucose. Os supressores car e sp, não alelos, exibem baixa ati-

vidade de carboxilase do ácido pirúvico, diminuindo, deste modo, a formação de acetaldeído. A produção de etanol, a partir de acetaldeído, também é diminuída. Portanto, linhagens de genótipo ac sp ou ac car seriam incapazes de produzir acetato diretamente (ácido pirúvico - ácido acético) ou via acetaldeído (ácido pirúvico - acetaldeído - ácido acético), forçando a utilização de glucose para síntese de acetato, sem formação de acetaldeído, o responsável pela inibição.

MORGAN (1961 , 1965) constatou que supressores eram capazes de restaurar o fenótipo selvagem em mutantes do gene pur (pigmentação púrpura) no fungo Coprinus lagopus. Verificou ligação entre os supressores e o gene pur , com valores de recombinação variando de 0 a 20 por cento.

LEWIS (1961) estudou supressores do mutante met 1 (deficiência para metionina) no fungo Coprinus lagopus. Verificou que os supressores pertenciam a cinco diferentes locos e que todos eram recessivos em relação ao alelo selvagem.

DAVIS (1961 , 1962) verificou que, em Neurospora, o mutante arg 12-s (deficiente para arginina) age como supressor de mutantes deficientes para pirimidina (pyr 3-a) . Concluiu que pyr 3-a bloqueia a síntese de pirimidina pela não formação de aspartato transcarbamilase (ATC) e que o mutante arg 12-s diminui drasticamente o nível de ornitina transcarbamilase, a enzima que atua sobre carbamil fosfato na síntese de arginina. O aumento da atividade de ATC em duplos mutantes pyr 3-a arg 12-s seria devida, portanto, à não competição com OTC na utilização de carbamil fosfato.

LUIG (1962) isolou supressores recessivos de mutantes meth.2 (deficientes para metionina) e de paba 22 (deficientes para ácido p-aminobenzóico) em Aspergillus nidulans. Análises de ascósporos revelaram ligação dos locos meth 2 e paba 22 com seus respectivos supressores. Estudos de diplóides heterozigotos para os supressores e homozigotos para o mutante, eliminaram a hipótese da reversão.

LILLY (1963) verificou que mutantes deficientes para metionina (meth 1) em Aspergillus nidulans eram capazes de recuperar a prototrofia por ação de supressores específicos e não ligados àquele loco.

WARR & ROPER (1965), estudando mutantes que conferem resistência a diversas substâncias, em Aspergillus nidulans, constataram que o mutante pf 21 (resistente à p-fluorofenilalanina) também confere resistência a iodoacetato e age como um supressor de nic 8 (deficiente para ácido nicotínico). Com base em conhecimentos da biosíntese de ácido nicotínico e fenilalanina, sugeriram um possível mecanismo para explicar a supressão de nic 8: um supressor específico seria o responsável pelo aumento de produção de ácido shiquímico, um precursor comum de ambas as substâncias, causando um aumento no nível de fenilalanina — aumentando o seu poder de competição com p-fluorofenilalanina — e no de ácido nicotínico, conferindo prototrofia ao mutante original.

Supressores da deficiência para prolina em Aspergillus nidulans foram intensamente estudados por WEGLENSKI (1966, 1967) e por PIOTROWSKA, SA WICKI & WEGLENSKI (1969). Estudaram e mapearam três supressores (su 2, su 6 e su 19) e verificaram que todos são do tipo intergênico. Cada um, entretanto, exibiu um modo específico de ação, apesar da particularidade comum de que todos afetam a síntese ou degradação de arginina de modo a permitir a síntese de prolina através de um processo alternativo diferente do usual (ácido glutâmico - semialdeído glutâmico - prolina). O mutante pro bloqueia a transformação de ácido glutâmico em semialdeído glutâmico. O supressor su 6 causa redução na atividade da ornitina transcarbamilase, diminuindo a síntese de arginina a partir de ornitina e o acúmulo desta torna possível a sua transmutação em semialdeído glutâmico, um precursor de prolina. O supressor su 2 aumenta a atividade enzimática tanto da arginase quanto da ornitina transaminase (OTA): a primeira causa degradação de arginina em ornitina e a OTA dirige a utilização de ornitina para a síntese de prolina. O supressor su 19, in-

dependentemente da presença do mutante pro, causa aumento na síntese de arginase e OTA (ornitina transaminase). Além do efeito da arginase, a OTA desvia a ornitina do processo normal da síntese de arginina para a síntese de prolina via GSA (semialdeído glutâmico). Verificaram que estas duas enzimas são controladas pelo mesmo sistema de regulação e que o mutante ota (deficiência em ornitina transaminase) elimina o efeito do supressor. Concluíram que o su 19 pode ser considerado como um gene regulador — segundo a teoria de JACOB & MOND (1961) — e que ota é o gene estrutural de ornitina transaminase. Finalmente, sugeriram que, além desse mecanismo alternativo da síntese de prolina, devem existir outros, conforme sugerem os resultados de estudos com supressores capazes de agir em duplos mutantes (pro 6 ota 1) com bloqueio nos processos principal e alternativo de síntese.

BALL (1967) verificou que a supressão do mutante meth 1 (deficiente para metionina), em Aspergillus nidulans era devida a uma translocação de parte do cromossomo IV para o cromossomo V. A translocação, ocasionando quebra e fusão de dois cistrons de cromossomos diferentes, daria formação a um novo cistron que determinaria a síntese de uma proteína capaz de suprir a deficiência para metionina. Verificou também que o segmento translocado continha o mutante arg 2 (deficiente para arginina), e que também ocorria supressão desse mutante, em consequência, talvez, de um efeito de posição.

GAJEWSKI & LITWINSKA (1967) verificaram que reversões espontâneas de alguns mutantes meth (deficientes para metionina) em Aspergillus nidulans, eram resultantes da ação de supressores parcial ou totalmente recessivos. O supressor r 2 revelou não especificidade, enquanto o supressor r 3 foi altamente específico em sua ação, capaz de suprimir somente mutantes meth B.

STADLER (1967) realizou estudos com mutantes mtr (resistentes a metil-triptofano e a p-fluorofenilalanina) em Neurospora e verificou que tais mutantes resultam de alteração no sistema normal de utilização de triptofano, fenilalanina e outros aminoácidos. A análise de reversões de mtr re-

velou a existência de supressores não específicos (capazes de suprimir qualquer mutante mtr) que agem por alteração de um segundo sistema de utilização de aminoácidos. Posteriormente, BRINK, KARIYA & STADLER (1969), estudando o efeito de luz ultra violeta e de mutagênicos químicos em mutantes mtr e hist (deficiente para histidina) detectaram a presença de supressores de mtr, além de mutações reversas naqueles dois locos.

SEALE (1968), estudando reversões de mutantes am (loco responsável pela produção da enzima glutamato desidrogenase - GDH) em Neurospora, constatou que dois alelos CRM^- , am 17 e am 5, voltavam a exibir o fenótipo selvagem por ação de supressores específicos. Verificou ainda que extratos de linhagens am 17 com supressor exibiam uma atividade de GDH qualitativamente diferente do tipo selvagem ou de um segundo tipo de reversão do loco am. Posteriormente, (SEALE, 1970), constatou que supersupressores eram capazes de suprimir, ao mesmo tempo, duplos mutantes (am 17 tryp 3). O supersupressor foi capaz de restaurar, no mutante, a enzima glutamato desidrogenase, qualitativamente distinguível daquela produzida pelo tipo selvagem.

AYLING (1969), estudando reversões de mutantes meth B3 em Aspergillus nidulans, constatou a presença de seis locos supressores daquele mutante, dos quais alguns foram dominantes no heterocáριο, mas recessivos no diplóide. O grande número de supressores detectados sugere que o sistema de supressão de meth B3 seja bastante complexo.

CHALMER & SEALE (1971), em Neurospora, estudaram mutantes em dois locos (tryp 1 e tryp 2) responsáveis pela organização de um complexo multienzimático (antranilato sintetase, antranilato isomerase e indolglicerolfosfato sintetase) envolvido na síntese de triptofano. Alguns desses mutantes responderam à presença de supersupressores, onde foi possível detectar a atividade de enzimas, embora a baixos níveis.

3 - MATERIALE MÉTODOS

3.1 - SÍMBOLO E FENÓTIPO DOS MUTANTES USADOS

<u>Símbolo</u>	<u>Fenótipo</u>
<u>ad 20</u>	requerimento para adenina
<u>bi 1</u>	requerimento para biotina
<u>fac 303</u>	não crescimento em meio contendo acetado como única fonte de carbono
<u>fl 1</u>	colônias com micélio aéreo abundante ("fluffy")
<u>gal 1</u>	não crescimento em meio contendo galactose como única fonte de nitrogênio
<u>ni 103</u>	não crescimento em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio
<u>nic 8</u>	requerimento para ácido nicotínico
<u>paba 6</u>	requerimento para ácido p - aminobenzóico
<u>pro 1</u>	requerimento para prolina
<u>pyro 4</u>	requerimento para pirodoxina
<u>ribo 2</u>	requerimento para riboflavina
<u>s 3</u>	requerimento para tiosulfato
<u>su 1 ad 20</u>	supressor do mutante <u>ad 20</u>
<u>su nic 8</u>	supressor do mutante <u>nic 8</u>
<u>v 10</u>	variante deteriorado (aspecto morfológico anormal)
<u>v 29</u>	variante deteriorado
<u>y</u>	conídios amarelos
<u>w 3</u>	conídios brancos

A origem dos mutantes utilizados, sua descrição e localização podem ser encontrados em DORN (1967) , BARRAT , JOHNSON & OGATA (1965) , BALL & AZEVEDO (1964) e AZEVEDO & ROPER (1970) .

3.2 - SUPLEMENTOS ADICIONADOS AO MEIO MÍNIMO

<u>Substância</u>	<u>Concentração</u>
Biotina	0,20 μ g/ml
Ácido nicotínico	0,50 μ g/ml
Piridoxina	0,05 μ g/ml
Riboflavina	0,05 μ g/ml
Ácido p - aminobenzóico	0,7 μ g/ml
Prolina	50 μ g/ml
Lisina	50 μ g/ml
Fenilalanina	50 μ g/ml
p - fluorofenilalanina	20 a 40 μ g/ml
Adenina	70 μ g/ml
Tiosulfato de sódio	200 μ g/ml
Cloreto de amônio	6 mg/ml

3.3 - LINHAGENS UTILIZADAS

a) Linhagem MSE ("master strain E"), originária da Universidade Glasgow (Escócia) e que encerra uma marca genética em cada um dos oito cromossomos do Aspergillus nidulans

Cromossomo I	:	<u>su 1 ad 20</u>	<u>y</u>	<u>ad 20</u>
Cromossomo II	:	<u>w 3</u>		
Cromossomo III	:	<u>gal 1</u>		
Cromossomo IV	:	<u>pyro 4</u>		
Cromossomo V	:	<u>facA 303</u>		
Cromossomo VI	:	<u>s 3</u>		
Cromossomo VII	:	<u>nic 8</u>		
Cromossomo VIII	:	<u>ribo 2</u>		

- b) Linhagem B : bi 1 ; ni 103
- c) Linhagem C : pro 1 ; paba 6 ; v 10
- d) Linhagem D : bil 1 ; w 3 ; fl 1
- e) Linhagem E : pro 1 ; paba 6 ; w 3 ; pyro 4 ; fac 303 ; s 3 ; nic 8 ;
v 29
- f) Linhagem F : su 1 ad 20 ; y ; ad 20 ; phen 2 ; pyro 4 ; lys 5 ; s 3 ;
nic 8 ; ni 103

As linhagens utilizadas foram obtidas a partir de estoques existentes no Setor de Genética de Microorganismos do Instituto de Genética, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, foram mantidas em meio completo em ágar inclinado, à temperatura ambiente, com repurificação a intervalos de 4 a 6 meses.

A linhagem MSE foi utilizada para obtenção de genes supressores do mutante nic 8. As linhagens obtidas, contendo supressores, foram mantidas da mesma maneira.

Os diplóides usados, obtidos dos cruzamentos entre as linhagens MSE su nic 8 e as linhagens (b) ou (f) também foram mantidos em estoque, utilizando-se, no entanto, meio mínimo, em lugar de meio completo.

3.4 - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES USADAS

3.4.1 - Meio mínimo (PONTECORVO e col., 1953)

Nitrato de sódio	6	gramas
Cloreto de potássio	0,52	gramas
Sulfato de Magnésio 7 H ₂ O	0,52	gramas
Fosfato dihidrogenado de potássio	1,52	gramas
Sulfato de ferro e sulfato de zinco		traços
Glucose	10	gramas
Agar (Oxoid - n.º 3)	15	gramas
Água	1	litro
pH ajustado para 6,5		

3.4.2 - Meio completo (PONTECORVO e col., 1953)

Foi preparado adicionando-se ao meio mínimo:

Peptona (Oxoid)	2	gramas
Extrato de leveduras	0,5	gramas
Caseína hidrolisada (Oxoid)	1,5	gramas
Ácido nucléico de leveduras hidrolisado	2,5	ml
Solução de vitaminas	1	ml

3.4.3 - Meio de acetato de amônio (APIRION, 1962)

Acetato de amônio	12	gramas
Cloreto de sódio	2	gramas
Sulfato de magnésio 7 H ₂ O	0,5	gramas
Fosfato dihidrogenado de potássio	3	gramas
Sulfato de ferro e sulfato de zinco		traços
Agar (Oxoid n.º 3)	15	gramas
Água	1	litro
pH	6,5	

3.4.4 - Meio mínimo de galactose

Preparado da mesma forma que o meio mínimo comum apenas substituindo-se a glucose pela galactose, como fonte de carbono.

3.4.5 - Ácido nucléico de leveduras hidrolisado

Ácido nucléico de leveduras (Oxoid)	2 gramas de 15 ml de so- lução normal de ácido clorídrico
Ácido nucléico de leveduras (Oxoid)	2 gramas de 15 ml de so- lução normal de hidróci- do de sódio

Ambas as soluções foram aquecidas por 20 minutos a 100 °C .
Em seguida foram misturadas, e o pH foi ajustado a 6,0
filtrando-se em seguida. O volume foi completado para
40 ml e a preparação foi guardada em refrigerador sob
clorofórmio.

3.4.6 - Solução de vitaminas

Piridoxina	50	mg
Ácido nicotínico	100	mg
Riboflavina	100	mg
Ácido p - aminobenzóico	10	mg
Aneurina	50	mg
Biotina	0,2	mg
Água destilada	100	ml

A solução foi esterilizada em banho-maria por 15 minutos, e guardada em frasco escuro no refrigerador.

3.4.7 - Solução salina 0,15 M

Uma solução de cloreto de sódio 0,89% foi obtida dissolvendo-se o sal em água destilada. A solução foi autoclavada e guardada em frascos com 9 ml.

3.4.8 - Solução de Tween

Tween 80 foi adicionado em água destilada à concentração de 0,1% (V/V). A solução foi colocada em tubos com 2,5 ml, autoclavada, e conservada em refrigerador.

3.4.9 - Meio mínimo líquido + 2% de meio completo

Ao meio mínimo comum foi adicionado 2% de meio completo, distribuídos em tubos com 2,5 ml e conservados em refrigerador.

3.4.10 - Placas de análise

Para análise genética, utilizou-se placas de petri com meio completo e placas com meio mínimo suplementado com diversos requerimentos nutricionais.

Para a determinação dos requerimentos nutricionais das colônias analisadas, utilizaram-se placas, cada uma com meio mínimo suplementado com todos os requerimentos envolvidos no cruzamento, exceto um deles que estava sendo analisado. Em casos especiais utilizaram-se placas com meio mínimo com a

suplementação adequada e estes casos serão explicados na apresentação dos resultados.

3.5 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

Determinou-se uma curva de sobrevivência de linhagem MSE do Aspergillus nidulans sob várias doses de luz ultra violeta (UV) . Tal determinação foi necessária a fim de se obter a dosagem suficiente de UV para produzir de 1 a 5% de sobreviventes, que é o limite de sobrevivência que apresenta maior taxa de mutação.

Conídios da linhagem MSE foram transferidos para solução "tween", estimando-se a sua concentração através de hematímetro ao microscópio. A suspensão de conídios foi diluída em salina (1:10) , colocada em placa de petri esterilizada e irradiada com várias doses de UV . Da suspensão irradiada, 0,1 ml foi semeado em cada placa contendo meio completo, fazendo-se diversas diluições. Depois de dois dias de incubação procedeu-se a contagem das colônias e, considerando-se as diluições feitas, estimou-se a porcentagem de sobrevivência relativamente à suspensão não irradiada.

3.6 - OBTENÇÃO DOS SUPRESSORES

Conídios da linhagem MSE foram colocados em "tween" dando uma suspensão com aproximadamente 10^6 conídios por ml. A estimativa do número de conídios por ml foi feita em hematímetro. A suspensão foi diluída (1:10) em salina e irradiada durante um minuto com luz ultra violeta. A suspensão irradiada foi semeada (0,1 ml por placa) em placas de petri contendo meio mínimo suplementado com riboflavina, tiosulfato de sódio e piridoxina. Depois de dois dias verificou-se o crescimento das colônias, as quais deveriam ser prototróficas para ácido nicotínico, pois somente estas são capazes de se desenvolver em meio não suplementado com esta vitamina.

As linhagens com supressores, assim obtidas, foram purificadas e mantidas em tubos com meio completo em ágar inclinado.

3.7 - SEMEADURA E INCUBAÇÃO

Durante todo o trabalho utilizaram-se placas de petri esterilizadas de 9 cm de diâmetro na base, com um papel de filtro colocado sob a tampa para absorver o excesso de umidade. Em geral, foram usados 20 a 25 ml de meio de cultura por placa.

Para obtenção de colônias isoladas, os conídios foram transferidos para uma solução esterilizada de "tween", através de um fio de platina. Por agitação, as cadeias de conídios foram desagregadas. Quando necessário, foram feitas diluições, pipetando-se 1 ml da suspensão em 9 ml de solução salina. Suspensões de conídios assim obtidas foram semeadas em placas (0,1 ml por placa) contendo meios de cultura, utilizando-se, em seguida, um espalhador de vidro esterilizado em álcool e flambado. A purificação de colônias foi feita, em muitos casos, utilizando-se apenas o fio de platina pelo método de estrias de conídios no meio de cultura.

Para obtenção de colônias isoladas a partir de ascosporos, peritécios maduros foram transferidos para solução "tween"; liberados os seus ascosporos, a suspensão foi semeada em placas contendo meio de cultura.

Na análise mitótica foram feitas inoculações de colônias puras em pontos fixos de placas contendo meios de cultura com diferentes suplementações. A inoculação foi feita simplesmente tocando-se a superfície do meio com o fio de platina contendo conídios na extremidade. Em cada placa foram inoculadas 26 colônias para análise.

Na análise meiótica, onde maior número de colônias foram analisadas, utilizou-se um replicador de 26 pontas, com o qual, de uma só vez, 26 colônias foram transferidas de placas mestras ("master plates") para as placas de análise.

Durante todo o experimento a temperatura usual de incubação foi de 37 °C .

3.8 - TÉCNICAS DE ANÁLISE GENÉTICA

3.8.1 - Obtenção de heterocários

A heterocariose em Aspergillus nidulans já é conhecida desde há algum tempo (PONTECORVO e col., 1953) . A técnica de obtenção de heterocários , utilizada no presente trabalho foi a seguintes: conídios de duas linhagens requerendo diferentes fatores de crescimento foram colocados em 2,5 ml de meio mínimo líquido suplementado com 2% de meio completo líquido, o que permite apenas pequena germinação dos conídios. Depois de 2 a 3 dias de incubação, formou-se uma película na superfície do meio a qual, transferida para placas com meio mínimo sólido, deu formação a setores tipicamente heterocarióticos, pois somente estes, contendo núcleos geneticamente diferentes na mesma hifa, conseguem se desenvolver em meio mínimo não suplementado.

3.8.2 - Análise meiótica

A análise meiótica baseia-se no ciclo sexual do fungo, através da análise de ascosporos produzidos em peritécios, segundo o método descrito por PONTECORVO e col. (1953) . A análise exige a ocorrência de peritécios híbridos contendo ascosporos segregantes, resultantes da meiose de zigotos formados pela cariogamia de núcleos geneticamente diferentes, os quais ocorrem nos heterocários.

Os heterocários foram obtidos da maneira usual e transferidos para placas de petri contendo meio mínimo, as quais foram vedadas com fitas celulósicas, procedimento este que favorece a formação de peritécios, provavelmente devido à anaerobiose parcial. Peritécios maduros formaram-se após 8 a 10 dias de incubação. Transferidos para placas com ágar a 3% , com o auxílio do fio de platina, os peritécios foram rolados na superfície do ágar a

fim de se eliminar o material aderente (conídios e células de hulle) . Peritécios limpos, assim obtidos, foram transferidos, individualmente, para tubos com "tween". Foram esmagados contra a parede do tubo, utilizando-se uma pipeta de 1 ml , em seguida lavando-se a parede do tubo utilizando-se a mesma pipeta. Os ascosporos liberados dos peritécios formaram uma suspensão no "tween", da qual alíquotas de 0,1 ml foram semeadas em placas contendo meio completo. A suspensão remanescente foi conservada em refrigerador. Depois de dois dias de incubação das placas, foi possível verificar se os peritécios isolados eram híbridos ou não, sendo que os híbridos apresentavam segregação de ascosporos. Também pelo exame das placas foi possível verificar a densidade de ascosporos na suspensão mantida no refrigerador e se os peritécios híbridos eram normais ou gêmeos ("twins").

Ascosporos de peritécios híbridos foram utilizados para análise. Colônias isoladas, obtidas da germinação dos ascosporos, foram transferidas para placas mestras com meio completo e, depois de alguns dias, foram transferidas para as placas de análise (ítem 3.4.10) utilizando-se um replicador de 26 agulhas de platina, obedecendo a disposição (5 x 5) + 1 das colônias nas placas mestras. As leituras foram feitas com 24 e com 48 horas após a inoculação.

3.8.3 - Análise mitótica

Esta análise foi desenvolvida através do ciclo parasexual , segundo o método descrito por ROOPER (1952) . O primeiro passo do método consiste na obtenção de heterocário e deixá-lo desenvolver em placa com meio mínimo , onde há produção de conídios; estes são incapazes de se desenvolver em meio mínimo por serem haplóides. Entretanto, na hifa heterocariótica pode ocorrer fusão, rara mas regular, de núcleos haplóides, dando formação a núcleos diplóides heterozigotos. Estes dão origem a conídios diplóides capazes de crescer em meio mínimo. Semeadando-se grande quantidade de conídios (10^6 a 10^8), pro

duzidos no heterocário e previamente suspensos em "tween", em placas com meio mínimo, foi possível o isolamento de colônias diplóides heterozigotas.

Os heterocários para análise mitótica foram obtidos do cruzamento das linhagens MSE su nic 8 com a linhagem bi 1 ni 103, a primeira de conídios brancos (genótipo w y) e a segunda de conídios verdes (genótipo w⁺ y⁺). O reconhecimento dos diplóides se fêz pela coloração (verde escuro) dos conídios, pelo seu crescimento em meio mínimo e pelo tamanho dos conídios, que são cerca de 1,5 vezes maiores que os haplóides. As medidas de diâmetro dos conídios, foram feitas ao microscópio com ocular graduada, medindo-se cadeias de cinco conídios em lâminas com lisol diluído, que favorece a conservação dos conídios em cadeias. (PONTECORVO, TARR - GLOOR & FORBES, 1954).

Os diplóides, assim obtidos, foram purificados e conservados em estoque. Em seguida, foram induzidos à haploidização pela técnica da p-fluoro fenilalanina (pFA), um análogo da fenilalanina que tem a propriedade de inibir o crescimento de linhagens diplóides, mas que permite o crescimento de setores haplóides que surgem como segregantes. Este fenômeno foi verificado e descrito por MORPURGO (1961) em Aspergillus nidulans e por LHOAS (1961) em Aspergillus niger. A haploidização ocorre espontaneamente através de aneuploidia com perda sucessiva de cromossomo, segundo KAFER (1961). A técnica consiste em se adicionar pFA diretamente ao meio de cultura. Como é conhecido, que a concentração de pFA no meio de cultura depende da linhagem diplóide em estudo, utilizou-se, no presente trabalho, concentrações variáveis, adicionando-se cerca de 0,1 ml de solução a 1% de pFA por placa com 20 a 30 ml de meio de cultura. Isto permite, na série de placas, uma certa variação na concentração de pFA, com rendimento satisfatório na produção de setores haplóides.

Os setores haplóides, de coloração verde, amarela ou branca, foram isolados e purificados em meio completo, obtendo-se colônias isoladas geneticamente puras para análise.

A análise dos setores haplóides consistiu na inoculação de cada colônia, uma a uma, em pontos fixos das placas de análise (ítem 3.4.10) . Utilizou-se, para êsse fim, um fio de platina, fazendo-se as inoculações com a placa invertida. Os setores amarelos e brancos foram os analisados em maior número, visto que os de coloração verde se confundem com o diplóide, o que dificulta o isolamento. As leituras de análise foram, também, feitas com 24 e 48 horas após a inoculação.

3.8.4 - Testes de três pontos

Uma vez determinado o grupo de ligação dos supressores, através da análise mitótica, passou-se à determinação de sua posição relativa no mapa genético. Para êsse fim, utilizou-se linhagens com marcas genéticas do mesmo grupo de ligação dos supressores (linhagens C e D , ítem 3.3) . Heterocários entre estas linhagens e as linhagens MSE su nic 8 foram obtidos e induzidos ao ciclo sexual para formação de peritécios. Colônias provenientes de ascospores de peritécios híbridos foram analisadas em placas com meios de cultura apropriados segundo a mesma metodologia descrita para a análise meiótica.

3.8.5- Teste de dominância - recessividade

A fim de se verificar a dominância ou recessividade dos supressores, observou-se o comportamento de cada supressor (su nic 8) e seu alelo selvagem (su⁺ nic 8) em heterocários e em diplóides, sendo ambos homozigotos para o mutante nic 8 . Para êsse fim utilizou-se a linhagem F (ítem 3.3) , obtendo-se heterocários entre esta e as linhagens MSE su nic 8 . Os heterocários foram transferidos para placas com meios de cultura apropriados, (um deles contendo ácido nicotínico e outro não contendo esta vitamina) , e verificou-se o crescimento nas duas placas. De cada heterocário desenvolvido em meio contendo ácido nicotínico isolou-se um diplóide, que foi purificado e semeado em placas com os mesmos meios de cultura acima citados.

O não crescimento do diplóide ou do heterocáριο em meio mínimo não suplementado com ácido nicotínico, foi interpretado como sendo devido à recessividade do supressor ou dominância de seu alelo selvagem.

3.8.6 - Testes de alelismo

Este "teste" foi feito a fim de se verificar se os supressores, que foram mapeados no mesmo grupo de ligação eram ou não alelos.

A técnica consistiu em se obter um heterocáριο entre duas linhagens, cada uma com um supressor obtido independentemente. A análise de ascospores de peritécios híbridos, obtidos deste heterocáριο, fornece evidências suficientes a respeito do alelismo dos supressores. Em meio mínimo não suplementado com ácido nicotínico todos os ascospores de um peritécio híbrido devem apresentar crescimento se os supressores envolvidos no cruzamento forem alelos. Contudo, se não forem alelos, a análise deverá revelar a presença de recombinantes deficientes para ácido nicotínico.

Para obtenção do heterocáριο mencionado, é necessário dispor-se de linhagens com requerimentos nutricionais diferentes. A dificuldade, no entanto, é o reconhecimento de colônias que encerram supressor juntamente com o mutante nic 8. Isto decorre do fato de seu fenótipo se confundir com o de colônias de genótipo su⁺ nic 8, nic 8⁺, no que diz respeito à prototrofia para ácido nicotínico.

As linhagens su nic 8, nic 8 foram obtidas do cruzamento entre as linhagens MSE su nic 8 e a linhagem E (ítem 3.3), a qual também encerra nic 8. Dos heterocárrios respectivos foram isolados peritécios híbridos, dos quais foram obtidas linhagens contendo supressor e outras marcas genéticas diferentes daquelas da linhagem MSE. A presença do supressor foi detectada pela prototrofia das colônias uma vez que ambas as linhagens envolvidas no cruzamento encerravam nic 8.

Obtidas as linhagens com supressor e diferentes requerimentos nutricionais, iniciou-se o cruzamento destas com as MSE su nic 8 originais. A análise de ascosporos resultantes desses cruzamentos forneceu evidências suficientes para as conclusões finais.

3.9 - TESTE DE RESISTÊNCIA À p-florofenilalanina (pFA)

A finalidade deste teste foi a de verificar se os diversos supressores apresentam diferenças quanto à resistência à pFA, ou, se o mecanismo de supressão interfere na produção de fenilalanina, o aminoácido que, quando produzido normalmente, impede por competição a utilização de seu análogo (pFA)

As diversas linhagens MSE su nic 8 foram inoculadas em placas contendo meio completo e pFA em diversas concentrações (50, 125, 250, 500 e 1.000 µg/ml). A incubação foi feita a 37 °C. Mediu-se o diâmetro e observou-se o crescimento das colônias após 72 horas. A linhagem MSE foi tomada como controle.

3.10 - CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS MSE su nic 8

A capacidade de crescimento das referidas linhagens foi estudada sob diversos aspectos: determinando-se a taxa de crescimento através de variação no diâmetro da colônia por unidade de tempo; efetuando-se a análise estatística da variação do diâmetro; e determinando-se a eficiência dos diversos supressores, definida pela capacidade do supressor em substituir a suplementação de ácido nicotínico.

Neste série de estudos utilizaram-se três diferentes meios de cultura (meio completo, meio mínimo (MM) suplementado com todos os requerimentos e MM com todas as suplementações exceto ácido nicotínico) e três diferentes tempos de incubação (48, 72 e 96 horas). Utilizaram-se placas padronizadas (forma e diâmetro contendo 20 ml de meio de cultura. As inoculações foram feitas

no centro de cada placa. A incubação foi feita a 37 °C, medindo-se os diâmetros das colônias naqueles tempos determinados. Foram utilizadas duas séries de placas.

A taxa de crescimento foi determinada pela variação do diâmetro em micras/hora de incubação, para os três tempos, em duas repetições.

A análise estatística dos dados foi conduzida segundo um fatorial em delineamento inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas no tempo ("split plot in time"), segundo adaptação à metodologia fornecida por STEEL & TORRIE (1960). As informações de maior importância desta análise foram as referentes a diferença entre linhagens e a diferenças das reações das mesmas perante diversos meios de cultura e diversos tempos de incubação. (Interações L x M e L x T, respectivamente).

A eficiência de cada supressor foi determinada através do diâmetro da respectiva linhagem em meio sem suplementação com ácido nicotínico, em porcentagem do diâmetro da linhagem MSE original em meio suplementado com aquela vitamina. A significância dos desvios da eficiência em relação ao valor 100% é dada, indiretamente, pela significância das diferenças das médias envolvidas no cálculo da eficiência. Tal determinação foi feita pelo teste t , onde a variância da diferença é dada por $2 \frac{E_t}{r}$, sendo E_t o quadrado médio residual para cada tempo e r o número de repetições, segundo STEEL & TORRIE (1960).

Todos os cálculos referentes à medida de crescimento das colônias foram feitos com dados transformados, utilizando-se a raiz quadrada dos valores observados (\sqrt{x}), conforme recomenda a teoria estatística para análise desse tipo de dados.

4 - RESULTADOS OBTIDOS

4.1 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

Uma suspensão de conídios da linhagem MSE , submetida à irradiação por diversas doses de luz ultra violeta (UV) , forneceu os resultados que constam na Tabela I .

Tabela I - Número de conídios sobreviventes na suspensão submetida a diversas doses de luz ultra violeta (UV)

Tempo de irradiação com UV (minutos)	Número de conídios por ml	%
0	$3,2 \times 10^6$	100
1	$2,4 \times 10^5$	7,5
2	$7,6 \times 10^3$	0,237
3	$3,6 \times 10^2$	0,0112
4	$3,2 \times 10^2$	0,0100
5	$2,3 \times 10^2$	0,0072

Com os dados da Tabela I , construiu-se uma curva de sobrevivência a qual está representada graficamente na Figura I .

4.2 - OBTENÇÃO DOS SUPRESSORES

Por meio de indução com luz ultra violeta, foram isoladas e purificadas onze linhagens prototróficas para ácido nicotínico, a partir da linhagem MSE , deficiente para esta vitamina.

As linhagens assim obtidas, receberam as seguintes designações:

MSE su 1 nic 8

MSE su 2 nic 8

MSE su 3 nic 8

MSE su 4 nic 8

MSE su 5 nic 8

MSE su 6 nic 8

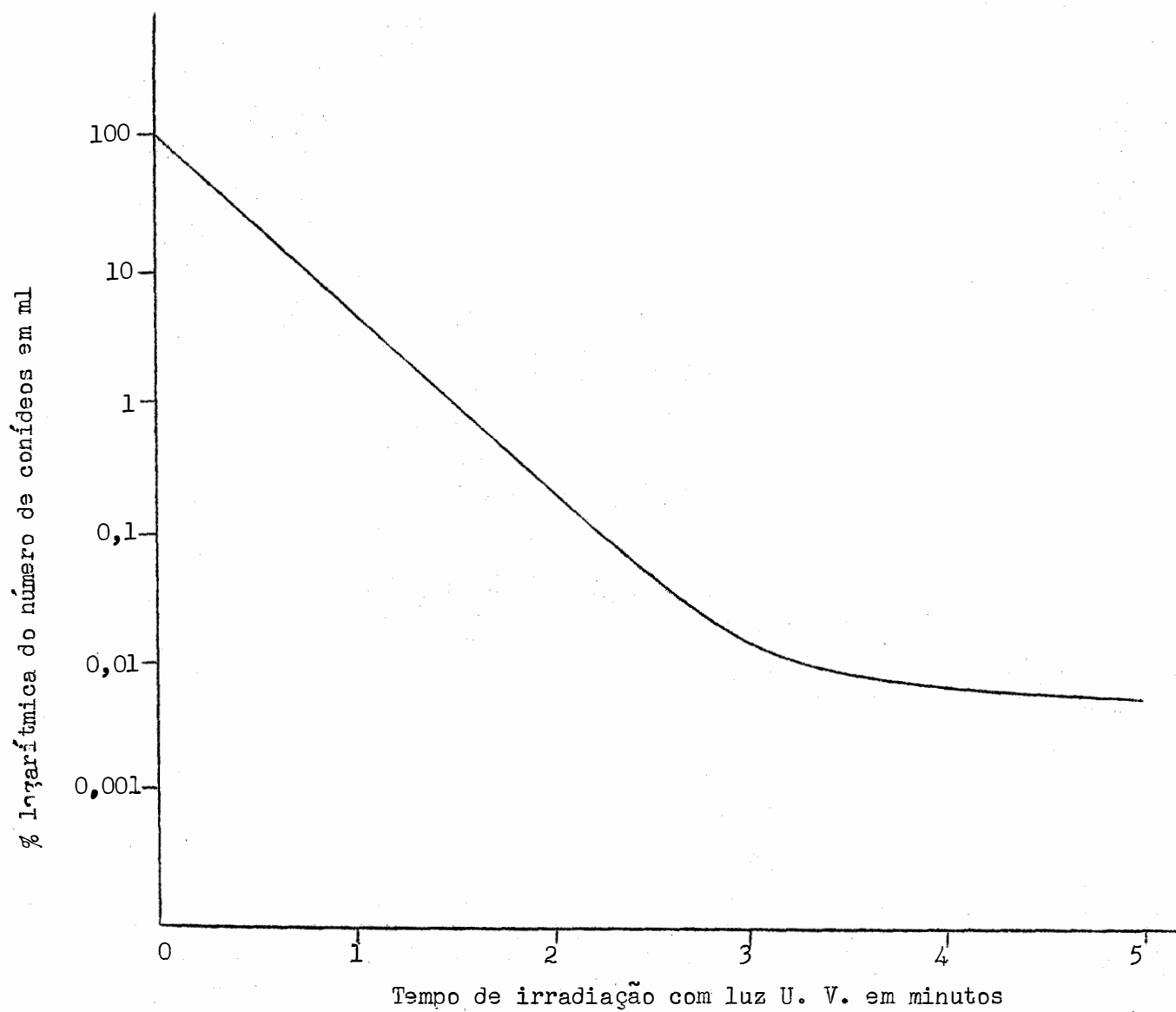


FIGURA 1 - Curva de sobrevivência do Aspergillus nidulans - linhagem MSE , sob ação de luz ultra-violeta

MSE su 7 nic 8

MSE su 8 nic 8

MSE su 9 nic 8

MSE su 10 nic 8

MSE su 11 nic 8

Estas linhagens foram, em seguida, analisadas sob diversos aspectos, com exceção das linhagens MSE su 10 nic 8 e MSE su 11 nic 8, que foram analisadas apenas mitoticamente.

4.3 - ANÁLISE GENÉTICA

4.3.1 - Análise Mitótica

Setores haplóides, de coloração verde, amarela ou branca, foram isolados a partir de diplóides obtidos nos heterocários das linhagens MSE su nic 8 com a linhagem B. Analisados mitoticamente, forneceram os resultados que constam na Tabela II. Estes são um resumo dos dados obtidos de leituras feitas de maneira convencional, como a que consta na Tabela III.

Tabela II - Análise mitótica de setores haplóides obtidos de diplóides MSE su nic 8 // bi 1 ni 103

Requerimento analisado	Supressor de <u>nic 8</u> analisado										
	su 1	su 2	su 3	su 4	su 5	su 6	su 7	su 8	su 9	su 10	su 11
gal +	24	45	34	28	15	70	15	11	16	39	11
gal -	30	47	26	34	26	61	10	10	19	11	15
pyro +	27	38	36	30	24	51	16	8	21	26	10
pyro -	27	17	24	32	17	80	9	13	14	24	16
fac +	22	45	46	35	26	28	4	0	2	31	16
fac -	32	47	14	27	15	103	21	21	33	19	10
s +	24	44	23	22	14	78	14	8	21	28	10
s -	30	48	37	40	27	53	11	13	14	22	16
nic +	54	92	60	62	41	131	25	21	35	50	26
nic -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ribo +	44	62	43	41	26	108	16	18	34	35	15
ribo -	10	30	17	21	15	23	9	3	1	15	11
Total	54	92	60	62	41	131	25	21	35	50	26

Tabela III - Resultado parcial da leitura da análise mitótica de setores haplóides isolados do diplóide MSE.su 1 nic 8 // bi 1 ni 103.

Côr (2)		Meio de cultura (1)								
		MC	MM	T	T ^P	T ^R	T ^S	T ^h	Ac	Ga
1	w	+	-	+	+	+	+	+	+	-
2	y	+	-	+	+	+	+	+	+	-
3	y	+	-	+	+	+	-	+	-	+
4	y	+	-	+	+	+	-	+	-	-
5	y	+	-	+	+	-	-	+	-	+
6	y	+	-	+	+	+	-	+	+	-
7	y	+	-	+	+	+	+	+	-	+
8	y	+	-	+	+	-	-	+	+	-
9	y	+	-	+	+	+	+	+	+	-
10	y	+	-	+	+	-	-	+	-	+

(1) MC = meio completo ; MM = meio mínimo ; os demais são encontrados na Tabela II .

T = meio mínimo + todos os requerimentos envolvidos no cruzamento.

T^P = ídem a T , menos piridoxina ; T^S = ídem a T , menos tiosulfato ;

T^R = ídem a T , menos riboflavina; T^h = ídem a T , menos ácido nicotí

nico ; Ac e Ga = meio de acetato e de galactose, respectivamente, suplementados com todos os requerimentos.

(2) Coloração dos conídios: branco (w) ; amarelo (y) e verde (v) .

4.3.2 - Análise Meiótica e Teste de Três Pontos

4.3.2.1 - Análise do su 1 nic 8

Do heterocário MSE su 1 nic 8 x bi 1 ni 103 foram isolados peritécios híbridos e as colônias obtidas da germinação dos ascósporos, foram analisadas quanto aos seus requerimentos nutricionais. O resultado da análise consta na Tabela IV .

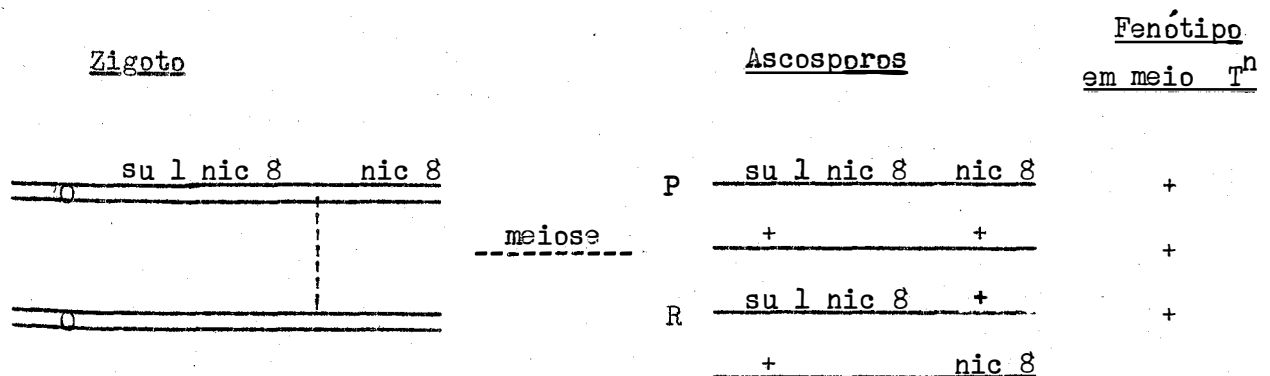
Tabela IV - Resultado (1) da análise meiótica de colônias obtidas de peritécios híbridos MSE sul nic 8 x bi 1 ni 103

Meio de cultura (2)	Coooração das colônias			Total		Proporção esperada	X ²
	w	y	v	(+)	(-)		
T	208	104	104	416	0	416 : 0	0,0 ns
T ^D	109	54	55	218	198	1 : 1	0,96 ns
T ^R	85	47	42	174	138	1 : 1	4,15 *
T ^S	116	49	57	222	194	1 : 1	1,88 ns
T ^N	144	82	78	304	112	3 : 1	0,83 ns
Ac	126	65	62	253	163	1 : 1	19,47 *
Ga	108	45	63	216	200	1 : 1	0,62 ns

(1) Os dados da tabela referem-se ao número de colônias capazes de crescer nos diversos meios de cultura

(2) Para os meios de cultura, consultar a Tabela III .

O valor de recombinação entre, su 1 nic 8 e nic 8 foi calculado através do número de recombinantes observados na análise; estes foram reconhecidos pelo seu fenótipo em meio não suplementado com ácido nicotínico. Tal conhecimento baseou-se no esquema abaixo.



Verifica-se, pois, que existem quatro genótipos possíveis dos ascospores e que somente um é reconhecível pelo seu fenótipo, que é aquele incapaz de crescer em meio mínimo não suplementado com ácido nicotínico e que cor-

responde a um dos tipos recombinantes. Pelos dados da Tabela IV verifica-se que ocorreram 112 recombinantes reconhecíveis. Assumindo-se os recombinantes recíprocos devem ocorrer com igual frequência, esta classe perfaz um total de 224 .

O valor de recombinação entre su 1 nic 8 e nic 8 é dado por

$$c = \frac{\text{número de recombinantes}}{\text{número total de ascosporos}} = \frac{224}{416} = 0,5384 \quad \text{ou} \quad 53,84\% ,$$

o que indica a não ligação dos dois genes.

A fim de se determinar a posição relativa do su 1 nic 8 , utilizou-se a linhagem c (prol ; paba 6 ; v 10) - sendo v 10 ligado ao loco nic 8 no grupo de ligação VII) . Do cruzamento desta com a linhagem MSE su 1 nic 8 , foram obtidos peritécios híbridos que forneceram ascosporos para análise. O resultado da análise consta na Tabela V .

Tabela V - Fenótipos possíveis e frequência observada de colônias obtidas de ascosporos de peritécios híbridos (MSE su 1 nic 8 x prol ; paba 6 ; v 10) .

Aspecto	Prototrofia para ácido nicotínico	Frequência observada
Normal (<u>v 10⁻</u>)	+	118
Deteriorado (<u>v 10</u>)	+	122
Normal (<u>v 10⁻</u>)	-	38
Deteriorado (<u>v 10</u>)	-	34
Total		312

Os dados da Tabela V foram interpretados com base no esquema representado na Figura 2 .

Figura 2 - Resultado do teste de três pontos considerando as posições possíveis do supressor (su) com relação às outras duas marcas (nic 8 e v 10).

Posições possíveis	Genótipos dos ascosporos	Fenótipo
1.		
$\frac{\text{nic}^{\text{I}} + \text{II}}{\text{su}}$	(a) nic + su + v +	N (+) V (+)
$\frac{\quad \quad \quad}{+ \quad v \quad +}$	(b) nic v + + + su	V (-) N (+)
	(c) nic + su + + v su	N (-) V (+)
	(d) nic v su + + +	V (+) V (+)
2.		
$\frac{\text{nic}^{\text{I}} \quad \text{su}^{\text{II}}}{+}$	(a) nic su + + + v	N (+) V (+)
$\frac{\quad \quad \quad}{+ \quad + \quad v}$	(b) nic + v + su +	V (-) N (+)
	(c) nic su v + + +	V (+) N (+)
	(d) nic + + + su v	N (-) V (+)
3.		
$\frac{\text{su} \quad \text{nic}}{+}$	(a) su nic + + + v	N (+) V (+)
$\frac{\quad \quad \quad}{+ \quad + \quad v}$	(b) su + v + nic +	V (+) N (-)
	(c) su nic v + + +	V (+) N (+)
	(d) su + + + nic v	N (+) V (-)

O sinal (+) no genótipo indica o alelo selvagem, enquanto que o mesmo sinal no fenótipo, indica crescimento em meio não suplementado com ácido nicotínico. As letras N e V representam colônias normal e deteriorada, respectivamente. Os mutantes nic 8, su nic 8 e v 10 foram representados abreviadamente por nic, su e v. A letra (a) refere-se a ascosporos do tipo paternal; (b) e (c) a recombinantes simples nas regiões I e II, respectivamente; (d) a duplos recombinantes.

Pelos dados da Tabela V , verifica-se que os dados melhor se adaptam a possibilidade 1 da Figura 2 , onde os recombinantes reconhecíveis resultam de permutas simples. Logo, a ordem dos três genes no grupo de ligação VII é nic 8 - v 10 - su 1 nic 8 . Os valores de recombinação entre eles foram calculados pelos dados da Tabela V , reorganizados na Tabela VI .

Tabela VI - Frequência observada de ascosporos recombinantes resultantes de permutas nas regiões I e II do Grupo de ligação VII

Permuta	Número de recombinantes	Frequência
Simples em I	68	0,2179
Simples em II	76	0,2436
Duplas (I e II)	-	0,0531 (*)

(*) Corresponde a frequência esperada, visto que o fenótipo dos duplos recombinantes se confunde com o dos paternos.

As distâncias aproximadas entre os genes no grupo de ligação VII , foram calculadas de maneira convencional, somando-se a frequência de simples e de duplos recombinantes. Os resultados, juntamente com os respectivos desvios padrões, encontram-se na Tabela VII .

Tabela VII - Distâncias aproximadas entre os genes nic 8 , v 10 e su 1 nic 8 e seus respectivos desvios padrões

Região	Distância aproximada	Desvio padrão (*)
<u>nic 8 - v 10</u>	27,1	2,5
<u>v 10 - su 1 nic 8</u>	29,7	2,6

(*) O desvio padrão foi calculado pela fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{p(1-p)}{N}}$$

onde p = frequência de recombinantes e N = número de ascosporos analisados.

Ainda com a linhagem MSE su 1 nic 8 foi feito um segundo teste de três pontos, em cruzamento com a linhagem bi 1 w 3 fl 1, de aspecto micelial e que apresenta a marca fl ("fluffy") no grupo de ligação VII a cerca de 30 unidades de nic 8. Do heterocáριο obtido, os peritécios híbridos foram tomados para análise de seus ascósporos. O resultado da análise consta na tabela VIII.

Tabela VIII - Fenótipos possíveis e frequência observada de colônias obtidas de ascósporos de peritécios híbridos (MSE su 1 nic 8 x bi 1 w 3 fl 1)

Aspecto	Prototrofia para ácido nicotínico	Frequência observada
Normal (<u>fl</u> ⁺)	+	38
Micelial (<u>fl</u>)	+	46
Normal (<u>fl</u> ⁺)	-	20
Micelial (<u>fl</u>)	-	12
Total		116

Os dados da Tabela VIII foram também interpretados com base na Figura 2, apenas substituindo-se a marca v 10 por fl 1. Da mesma maneira que no caso anterior, os dados indicam a seguinte ordem dos genes no grupo de ligação VII: nic 8 - fl 1 - su 1 nic 8

Os valores de recombinação foram calculados da mesma maneira que no caso anterior e os resultados constam na Tabela IX.

Tabela IX - Distâncias aproximadas entre os genes nic 8, fl 1 e su 1 nic 8 e seus respectivos desvios padrões

Região	Distância aproximada	Desvio padrão
<u>nic 8</u> - <u>fl 1</u>	27,8	4,2
<u>fl 1</u> - <u>su 1 nic 8</u>	41,5	4,6

4.3.2.2 - Análise do su 2 nic 8

Ascosporos de peritécios híbridos obtidos do cruzamento MSE su 2 nic 8 x bi 1 ni 103 foram analisados quanto aos seus requerimentos nutricionais. O resultado da análise consta na Tabela X.

Tabela X - Resultado da análise meiótica de colônias obtidas de peritécios híbridos (MSE su 2 nic 8 x bi 1 ni 103)

Meio de cultura	Coloração das colônias			Total		Proporção esperada	χ^2
	w	y	v	(+)	(-)		
T	52	26	26	104	0	104 : 0	
T ^p	32	15	16	62	142	1 : 1	3,84
T ^r	40	22	19	81	23	1 : 1	32,34
T ^s	27	17	16	60	44	1 : 1	2,46
T ^h	43	22	21	86	18	3 : 1	3,28
Ac	32	14	12	58	46	1 : 1	0,62
Ga	25	8	12	45	59	1 : 1	1,88

O valor de recombinação entre su 2 nic 8 e nic 8 foi calculado como em 4.3.2.1, obtendo-se o valor $c = 34,6 \pm 4,7 \%$, o que pode ser indicação de não ligação entre os dois genes, visto que a proporção fenotípica observada não diferiu significativamente daquela esperada por segregação independente.

O teste de três pontos foi realizado pela análise de ascósporos de peritécios híbridos obtidos do cruzamento MSE su 2 nic 8 x pro 1 paba 6 v 10 . O resultado da análise encontra-se na Tabela XI .

Tabela XI - Fenótipos possíveis e frequências observadas de colônias obtidas de ascósporos de peritécios híbridos (MSE su 2 nic 8 x pro 1 paba 6 v 10) .

Aspecto	Prototrofia para ácido nicotínico	Frequência observada
Normal (<u>v 10</u> ⁺)	+	37
Deteriorado (<u>v 10</u>)	+	48
Normal (<u>v 10</u> ⁺)	-	15
Deteriorado (<u>v 10</u>)	-	4
Total		104

Por observação da Figura 2 , verifica-se que os dados da Tabela XI melhor se adaptam a possibilidade 3 , onde um dos recombinantes reconhecíveis resulta de permuta dupla ocorrendo, portanto, com frequência muito menor que os demais tipos. Logo, a ordem dos genes no grupo de ligação VII é su 2 nic 8 - nic 8 - v 10 . Os valores de recombinação foram calculados como em 4.3.2.1 , e são apresentados na Tabela XII .

Tabela XII - Distâncias aproximadas entre os genes su 2 nic 8 , nic 8 e v 10 e seus respectivos desvios padrões

Região	Distância aproximada	Desvio padrão
<u>su 2 nic 8 - nic 8</u>	36,5	7,8
<u>nic 8 - v 10</u>	indeterminado (*)	-

(*) Indeterminada com os dados disponíveis, uma vez que os recombinantes entre nic 8 e v 10 não são distinguíveis, fenotipicamente, da classe paternal.

4.3.2.3 - Análise do su 3 nic 8

Devido a dificuldades de obtenção de peritécios híbridos em cruzamento envolvendo a linhagem bi 1 ni 103, a análise do su 2 nic 8 consistiu somente do teste de três pontos envolvendo a linhagem pro 1 paba 6 v 10. A análise de ascosporos de peritécios híbridos forneceu o resultado que consta na Tabela XIII.

Tabela XIII - Fenótipos possíveis e frequência observada de colônias obtidas de ascosporos de peritécios híbridos (MSE su 3 nic 8 x pro 1 paba 6 v 10)

Aspecto	Prototrofia para ácido nicotínico	Frequência observada
Normal (<u>v 10⁺</u>)	+	41
Deteriorado (<u>v 10</u>)	+	42
Normal (<u>v 10⁺</u>)	-	11
Deteriorado (<u>v 10</u>)	-	10
Total		104

Os dados da Tabela XII melhor se adaptam à possibilidade 1, da Figura 2, que indica a seguinte ordem dos genes: nic 8 - v 10 - su 3 nic 8. Os valores de recombinação foram calculados como em 4.3.2.1, e são apresentados na Tabela XIV.

Tabela XIV - Distâncias aproximadas entre os genes nic 8, v 10 e su 3 nic 8 e seus respectivos desvios padrões

Região	Distância aproximada	Desvio padrão
<u>nic 8 - v 10</u>	23,3	4,1
<u>v 10 - su 3 nic 8</u>	25,2	4,3

4.3.2.4 - Análise do su 4 nic 8

Pelas mesmas razões citadas em 4. 3. 2.3, a análise do su 4 nic 8 constou somente do teste de três pontos envolvendo a linhagem pro 1 paba 6 v 10, cujo resultado é apresentado na Tabela XV .

Tabela XV - Fenótipos possíveis e frequências observadas de colônias obtidas de ascósporos de peritécios híbridos (MSE su 4 nic 8 x pro 1 paba 6 v 10)

Aspecto	Prototrofia para ácido nicotínico	Frequência observada
Normal (<u>v 10</u> ⁺)	+	41
Deteriorado (<u>v 10</u>)	+	52
Normal (<u>v 10</u> ⁺)	-	11
Deteriorado (<u>v 10</u>)	-	0
Total		104

Os dados da Tabela XV melhor se adaptam a possibilidade 3 , da Figura 2 , onde um dos recombinantes reconhecíveis resulta de permuta dupla, a semelhança do que foi verificado na análise do su 2 nic 8 . Portanto, a ordem dos genes é: su 4 nic 8 - nic 8 - v 10 . Os valores de recombinação entre eles foram calculados como em 4. 3.2.1, e constam na Tabela XVI .

Tabela XVI - Distâncias aproximadas entre os genes su 4 nic 8 , nic 8 e v 10 e seus respectivos desvios padrões

Região	Distância aproximada	Desvio padrão
<u>su 4 nic 8 - nic 8</u>	25,5	4, 3
<u>nic 8 - v 10</u>	indeterminado (*)	-

(*) Consultar a Tabela XII

Como foi nula a frequência observada de duplos recombinantes, nos cálculos utilizou-se o valor da frequência esperada, admitindo-se que a distância entre nic 8 e v 10 é de 21 unidades, segundo AZEVEDO & ROPER (1970).

4.3.2.5 - Análise do su 5 nic 8

Do heterocário MSE su 5 nic 8 x bi 1 ni 103, peritécios híbridos foram isolados para análise de seus ascósporos. O resultado da análise meiótica encontra-se na Tabela XVII.

Tabela XVII (*) Resultado da análise meiótica de colônias obtidas de peritécios híbridos (MSE su 5 nic 8 x bi 1 ni 103)

Meio de cultura	Coloração das colônias			Total		Proporção esperada	X ²
	w	y	v	(+)	(-)		
T	104	52	52	208	0	280 : 0	
T ^P	56	26	26	108	100	1 : 1	0,31
T ^R	58	30	26	114	94	1 : 1	1,92
T ^S	58	32	26	116	92	1 : 1	2,77
T ^N	87	45	22	154	54	3 : 1	0,10
Ac	62	27	25	114	94	1 : 1	1,92
Ga	55	26	26	107	101	1 : 1	0,17

(*) Para interpretação, consultar a Tabela IV .

O valor de recombinação entre su 5 nic 8 e nic 8 foi calculado como em 4.3.2.1 , obtendo-se o valor $c = 51,9 \pm 3,5 \%$, o que indica independência de segregação dos dois genes.

Pelo teste de três pontos em cruzamento envolvendo a linhagem pro 1 paba 6 v 10 , obteve-se o resultado que é apresentado na Tabela XVIII.

Tabela XVIII - Fenótipos possíveis e frequências observadas de colônias obtidas de ascósporos de peritécios híbridos (MSE su 5 nic 8 x pro 1 paba 6 v 10)

Aspecto	Prototrofia para ácido nicotínico	Frequência observada
Normal (<u>v 10</u> ⁺)	+	42
Deteriorado (<u>v 10</u>)	+	43
Normal (<u>v 10</u> ⁺)	-	10
Deteriorado (<u>v 10</u>)	-	9
Total		104

Os dados da Tabela XVIII melhor se adaptam a possibilidade 1, da Figura 2, que indica a seguinte ordem dos genes: nic 8 - v 10 - su 5 nic 8. Os valores de recombinação, calculados como em 4.3.2.1, encontram-se na Tabela XIX.

Tabela XIX - Distâncias aproximadas entre os genes nic 8, v 10 e su 5 nic 8 e os respectivos desvios padrões

Região	Distância aproximada	Desvio padrão
<u>nic 8 - v 10</u>	20,6	4,0
<u>v 10 - su 5 nic 8</u>	22,6	4,1

4.3.2.6 - Análise do su 6 nic 8

Devido a dificuldades citadas em 4.3.2.3, a análise do su 6 nic 8 limitou-se somente ao teste de três pontos em cruzamento com a linhagem pro 1 paba 6 v 10. O resultado encontra-se na Tabela XX.

Tabela XX - Fenótipos possíveis e frequências observadas de colônias obtidas de ascósporos de peritécios híbridos (MSE su 6 nic 8 x pro 1 paba 6 v 10)

Aspecto	Prototrofia para ácido nicotínico	Frequência observada
Normal (<u>v 10⁺</u>)	+	51
Deteriorado (<u>v 10</u>)	+	52
Normal (<u>v 10⁺</u>)	-	1
Deteriorado (<u>v 10</u>)	-	0
Total		104

Dada a baixa frequência de ocorrência de recombinantes, pode-se concluir que se trata de um supressor fortemente ligado a nic 8. Entretanto, segundo evidências posteriores, concluiu-se que se trata de um supressor do tipo intragênico, resultante de alteração no próprio cistron de nic 8, razão pela qual ficam sem efeito as demais informações fornecidas pelo teste de três pontos.

4.3.2.7 - Análise do su 7 nic 8

Ascósporos de peritécios híbridos (MSE su 7 nic 8 x pro 1 paba 6 v 10) foram analisados quanto à deficiência para ácido nicotínico. Entre as colônias analisadas, verificou-se a presença de algumas compactas ("crinkled") cujo aspecto morfológico é característico de duplicação cromossômica; a qual deve ter ocorrido na linhagem MSE su 7 nic 8, pois esta também apresentava aspecto anormal.

Observações que evidenciaram a presença da duplicação, foram feitas em colônias compactas crescendo em meio completo, onde o aparecimento de

setores morfológicamente normais foi, sem dúvida, indício da perda do segmento duplicado.

Na análise, verificou-se que todas as colônias compactas (com duplicação) foram capazes de crescer em meio mínimo não suplementado com ácido nicotínico, o que não ocorreu com as colônias normais (não duplicadas), conforme se pode verificar pelos dados da Tabela XXI.

Tabela XXI - Análise de colônias normais (amarelas, brancas e verdes), deterioradas e compactas em meio mínimo não suplementado com ácido nicotínico. Peritécios híbridos: MSE su 7 nic 8 x pro 1 paba 6 v 10

Aspecto morfológico	Prototrofia para ácido nicotínico	Frequência observada
<u>Não compactas</u>		
Normal (v 10 ⁻⁷)	+	25
Deteriorado (v 10 ⁻⁷)	+	60
Normal (v 10 ⁻⁷)	-	39
Deteriorado (v 10 ⁻⁷)	-	4
Total		128
<u>Compactas ("crinkled")</u>		
	+	18
	-	0
Total		18

Os resultados sugerem que a duplicação esteja associada com a supressão de nic 8. Se assim fôr, a duplicação ocorreu no grupo de ligação VII, conforme revelou a análise mitótica, mas não ligada a nic 8 ou v 10, conforme indica o valor de recombinação entre estas marcas. Os recombinan-

tes entre nic 8 e v 10 podem ser reconhecidos pelo seu fenótipo, conforme indica o esquema

Figura 3 - Genótipos e fenótipos dos ascósporos resultantes de permuta entre nic 8 e v 10

Zigoto	Ascósporos		
	Genótipo	Aspecto	Prototrofia para ácido nicotínico
<u>nic 8</u> v 10 ⁺ meiose nic 8 ⁺ v 10	<u>nic 8</u> v 10 ⁺	Normal	-
	<u>nic 8⁺</u> v 10	Deteriorado	+
	<u>nic 8</u> v 10	Deteriorado	-
	<u>nic 8⁺</u> v 10 ⁺	Normal	+

Pela Tabela XXI, verifica-se que os recombinantes perfazem um total de 29 em 128 colônias analisadas ou $21,19 \pm 3,6 \%$ que é o valor de recombinação entre nic 8 e v 10.

Resta acrescentar que a duplicação, cuja presença está relacionada com a supressão de nic 8, pode estar numa posição distal com relação a nic 8 e v 10, a mais de 50 unidades no mapa genético, ou então, no braço oposto do cromossomo.

4.3.2.8 - Análise do su 8 nic 8

A análise de colônias obtidas de ascósporos de peritécios híbridos (MSE su 8 nic 8 x pro 1 paba 6 v 10) apresentou o resultado que consta na Tabela XXII.

Tabela XXII - Fenótipos possíveis e número observado de colônias obtidas de ascósporos de peritécios híbridos (MSE su 8 nic 8 x pro 1 paba 6 v 10)

Aspecto	Prototrofia para ácido nicotínico	Frequência observada
Normal (<u>v 10</u> ⁺)	+	81
Deteriorado (<u>v 10</u>)	+	85
Normal (<u>v 10</u> ⁺)	-	23
Deteriorado (<u>v 10</u>)	-	19
Total		208

Os dados da Tabela XXII melhor se adaptam a possibilidade 1, da Figura 2, onde a ordem dos genes é nic 8 - v 10 - su 8 nic 8. Os valores de recombinação entre eles foram calculados como em 4.3.2.1, e constam na tabela XXIII.

Tabela XXIII - Distâncias aproximadas entre os genes nic 8, v 10 e su 8 nic 8 e seus respectivos desvios padrões

Região	Distância aproximada	Desvio padrão
<u>nic 8 - v 10</u>	22,3	2,9
<u>v 10 - su 8 nic 8</u>	26,3	3,0

4.3.2.9 - Análise do su 9 nic 8

Ascósporos de peritécios híbridos (MSE su 9 nic 8 x pro 1 paba 6 v 10) foram analisados de maneira já descrita, e os resultados são apresentados na Tabela XXIV.

Tabela XXIV Fenótipos possíveis e número observado de colônias obtidas de ascosporos híbridos (MSE su 9 nic 8 x pro 1 paba 6 v 10)

Aspecto	Prototrofia para ácido nicotínico	Frequência observada
Normal (<u>v 10</u> ⁺)	+	54
Deteriorado (<u>v 10</u>)	+	70
Normal (<u>v 10</u> ⁺)	-	24
Deteriorado (<u>v 10</u>)	-	8
Total		156

Os dados da Tabela XXIV melhor se adaptam a possibilidade 3, da Figura 2, onde a ordem dos genes é: su 9 nic 8 - nic 8 - v 10. Os valores de recombinação foram calculados e são apresentados na Tabela XXV.

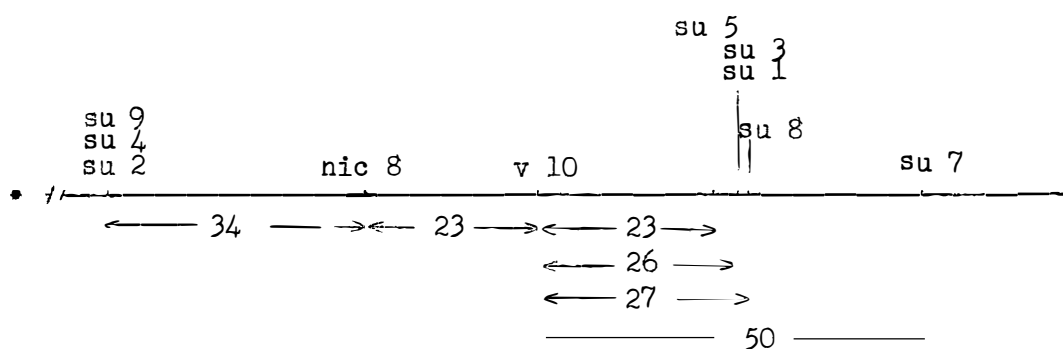
Tabela XXV - Distâncias aproximadas entre os genes su 9 nic 8, nic 8 e v 10 e seus respectivos desvios padrões

Região	Distância aproximada	Desvio padrão
<u>su 9 nic 8 - nic 8</u>	41,01	3,94
<u>nic 8 - v 10</u>	indeterminado (*)	-

(*) Consultar a tabela XII.

Os resultados da análise meiótica e do teste de três pontos, que forneceram informações a respeito das posições relativas dos supressores de nic 8, são apresentados resumidamente na Figura 4, onde é representado o mapa genético parcial do grupo de ligação VII.

Figura 4 - Representação do mapa genético parcial do grupo de ligação VII de Aspergillus nidulans, mostrando as posições relativas dos supressores de nic 8. Elaborado segundo resultados da análise genética e teste de alelismo.



4.4 - TESTE DE DOMINÂNCIA - RECESSIVIDADE

Do cruzamento entre as linhagens MSE su nic 8 e a linhagem F (ver ítem 3.3) que também encerra o mutante nic 8, os heterocários e os diplóides derivados destes, foram ensaiados quanto a sua capacidade de crescer em meio com e sem suplementação de ácido nicotínico.

Os resultados observados encontram-se na Tabela XXVI.

Tabela XXVI - Crescimento (*) de heterocários e diplóides homozigotos para nic 8 e heterozigotos para su nic 8, em meios de cultura com e sem suplementação de ácido nicotínico

Cruzamento	Com suplementação		Sem suplementação	
	Heterocáριο	Diplóide	Heterocáριο	Diplóide
<u>MSE su 1 nic 8</u> x <u>F</u> (*)	+	+	+	-
<u>MSE su 2 nic 8</u> x <u>F</u>	+	+	+	-
<u>MSE su 3 nic 8</u> x <u>F</u>	+	+	+	-
<u>MSE su 4 nic 8</u> x <u>F</u>	+	+	+	-
<u>MSE su 5 nic 8</u> x <u>F</u>	+	+	+	-
<u>MSE su 6 nic 8</u> x <u>F</u>	+	+	+	+
<u>MSE su 7 nic 8</u> x <u>F</u>	+	+	+	-
<u>MSE su 8 nic 8</u> x <u>F</u>	+	+	+	-
<u>MSE su 9 nic 8</u> x <u>F</u>	+	+	+	-

(*) Linhagem F = su 1 ad 20 ; y ; ad 20 ; phen 2 ; pyro 4 ; lys 5 ;
s 3 ; nic 8 ; ni 103

(**) (+) = crescimento ; (-) = ausência de crescimento

4.5 - RESISTÊNCIA à p-FLUOROFENILALANINA

A linhagem MSE e as suas derivadas prototróficas para ácido ni cotínico (supressores de nic 8), foram inoculadas em placas com meio completo a diversas concentrações de pFA (ver item 3.6.6). Foram feitas observações, depois de 72 horas de incubação, as colônias em crescimento, medindo-se o diâmetro maior das mesmas. Os resultados observados encontram-se na Tabela XXVII.

Tabela XXVII - Diâmetro maior (mm) da linhagem MSE e suas derivadas com su nic 8 em MC com diversas concentrações de pFA

Linhagens	Concentração ($\mu\text{g/ml}$) de pFA no MC					Nível de resistência
	50	125	250	500	1000	
<u>MSE</u>	18	18	16	8	8	-
<u>MSE su 1 nic 8</u>	24	18	36	12	6	250
<u>MSE su 2 nic 8</u>	16	24	24	10	6	250
<u>MSE su 3 nic 8</u>	46	40	24	10	40	1000
<u>MSE su 4 nic 8</u>	46	30	24	20	28	1000
<u>MSE su 5 nic 8</u>	24	28	50	28	5	500
<u>MSE su 6 nic 8</u>	22	16	30	10	5	250
<u>MSE su 7 nic 8</u>	3	3	3	1	1	-
<u>MSE su 8 nic 8</u>	30	28	28	40	40	1000
<u>MSE su 9 nic 8</u>	22	30	28	40	24	500

As conclusões finais deste teste, as quais estão resumidas na última coluna da Tabela XXVII, foram tomadas de maneira um tanto subjetiva, pois foram baseadas não só no diâmetro das colônias, mas também no vigor e na intensidade de formação de conídios das mesmas. Verificou-se que existem pelo menos quatro classes distintas quanto à resistência à pFA. As linhagens MSE e MSE su 7 nic 8 não exibiram o menor grau de resistência, sendo completamente inibidos em qualquer das concentrações de pFA usadas. Outras três classes compreendem três linhagens resistentes até 250 $\mu\text{g/ml}$, duas linhagens resistentes a 500 $\mu\text{g/ml}$ e outras três resistentes a 1.000 $\mu\text{g/ml}$.

4.6 - CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS MSE e MSE su nic 8

As medidas de diâmetro das linhagens, tomadas das colônias em crescimento em diversos meios de cultura e diferentes tempos de incubação, são apresentadas na Tabela XXVIII.

Tabela XXVIII - Medidas dos diâmetros (mm) de colônia das linhagens em diversos meios de cultura em três tempos de incubação. Dados de duas repetições.

Linhagens	48 horas (*)			72 horas (*)			96 horas (*)		
	MC	T	T ⁿ	MC	T	T ⁿ	MC	T	T ⁿ (**)
<u>MSE (original)</u>	27	17	0	42	27	0	60	42	0
	27	19	0	42	29	0	60	42	0
<u>MSE su 1 nic 8</u>	22	18	15	43	30	24	61	41	35
	25	19	16	43	30	25	59	43	36
<u>MSE su 2 nic 8</u>	26	19	17	43	32	31	62	45	42
	27	20	20	44	32	32	63	46	43
<u>MSE su 3 nic 8</u>	25	16	13	39	26	21	55	41	30
	25	18	15	40	30	22	56	42	30
<u>MSE su 4 nic 8</u>	23	12	10	38	25	19	55	35	28
	25	14	10	39	25	19	57	36	30
<u>MSE su 5 nic 8</u>	23	16	14	35	25	22	54	38	34
	24	17	14	38	26	22	54	39	34
<u>MSE su 6 nic 8</u>	21	16	16	36	29	29	52	43	43
	23	18	18	38	30	31	54	43	44
<u>MSE su 7 nic 8</u>	11	8	5	17	14	10	24	23	12
	11	8	6	19	14	10	25	23	13
<u>MSE su 8 nic 8</u>	26	16	18	38	29	29	53	42	42
	26	17	19	38	30	30	53	42	42
<u>MSE su 9 nic 8</u>	27	17	18	42	28	30	59	44	43
	27	20	19	43	29	30	61	44	44

(*) Tempo de incubação

(**) Meios de cultura: MC = meio completo ; T = meio mínimo adicionado de requerimentos ; Tⁿ = idem ao anterior , exceto ácido nicotínico.

As taxas de crescimento das linhagens, determinadas em micras/hora de incubação, para cada meio de cultura, são apresentadas na Tabela XXIX .

Tabela XXIX - Taxas de crescimento (micras/horas) em diversos meios de cultura com 48 , 72 e 96 horas de incubação (médias de duas repetições).

Linhagens	48 horas (*)			72 horas (*)			96 horas (*)		
	MC	T	T ⁿ	MC	T	T ⁿ	MC	T	T ⁿ (**)
<u>MSE (original)</u>	562	375	323	583	389	0	625	437	0
<u>MSE su 1 nic 8</u>	490	385	323	597	417	340	625	437	370
<u>MSE su 2 nic 8</u>	552	406	385	604	444	437	651	474	443
<u>MSE su 3 nic 8</u>	521	354	292	549	389	299	578	432	312
<u>MSE su 4 nic 8</u>	500	271	208	535	347	264	583	370	302
<u>MSE su 5 nic 8</u>	490	344	292	507	354	306	562	401	354
<u>MSE su 6 nic 8</u>	458	354	354	514	410	417	552	448	453
<u>MSE su 7 nic 8</u>	229	167	115	250	194	139	255	240	130
<u>MSE su 8 nic 8</u>	542	344	385	528	410	410	552	437	437
<u>MSE su 9 nic 8</u>	562	385	385	590	396	417	625	458	453

(*) Tempos de incubação

(**) Meios de cultura: ver Tabela XXVIII .

A eficiência de cada supressor, definida pela sua capacidade em substituir a suplementação de ácido nicotínico, bem como a significância dos desvios com relação ao valor 100 % , constam na Tabela XXX .

Tabela XXX - Eficiência dos supressores e significância dos desvios (pelo teste t) em relação ao valor 100 %

Supressor	48 horas		72 horas		96 h de incubação	
	Eficiência	Teste t	Eficiência	Teste t	Eficiência	Teste t
<u>su 1 nic 8</u>	86,1	2,34 *	87,5	3,86 *	84,5	8,26 **
<u>su 2 nic 8</u>	102,8	0,43	112,5	3,62 **	101,2	0,60
<u>su 3 nic 8</u>	77,8	3,85 **	76,8	7,39 **	71,4	15,86 **
<u>su 4 nic 8</u>	55,6	8,28 **	67,9	10,52 **	69,0	17,33 **
<u>su 5 nic 8</u>	77,8	3,85 **	78,6	6,78 **	80,9	10,27 **
<u>su 6 nic 8</u>	94,4	0,92	107,1	2,09 *	103,6	2,04
<u>su 7 nic 8</u>	30,56	14,57 **	35,7	24,03 **	29,8	46,54 **
<u>su 8 nic 8</u>	102,78	0,46	105,3	1,58	100,0	0,00
<u>su 9 nic 8</u>	102,78	0,46	107,4	2,10 *	103,6	2,04
C. V. (%)	3,1		1,6		0,9	

(*) significativo ao nível de 5% de probabilidade

(**) significativo ao nível de 1% de probabilidade

A análise da variância dos dados relativos a diâmetros das colônias em crescimento, revelou os resultados que são apresentados na Tabela XXXI .

Tabela XXXI - Análise da variância de diâmetros de colônias de nove linhagens (MSE su nic 8) em três meios de cultura e em três tempos de incubação. Duas repetições.

Fonte de Variação	G. L.	Q. M.	Q. M.	Teste F
Tratamentos	26	112,9472	4,3441	236,09 **
Linhagens (L)	8	64,5183	8,0648	438,30 **
Meio de cultura (M)	2	42,9884	21,4942	1.168,16 **
L x M	16	5,4405	0,3400	18,48 **
Resíduo (a)	27	0,4973	0,0184	
<hr/>				
Total de parcelas	53	113,4445		
<hr/>				
Tempo de incubação (T)	2	138,2554	69,1277	13.554,45 **
L x T	16	1,8982	0,1186	23,25 **
M x T	4	0,7629	0,1907	37,39 **
L x M x T	32	0,8774	0,0274	5,37 **
Resíduo (b)	54	0,2767	0,0056	
<hr/>				
Total	161	255,5151		

(**) Significativo ao nível de 1% de probabilidade

C. V. (Ra) = 2,54%

;

C. V. (Rb) = 1,34%

4.7 - TESTE DE ALELISMO

O primeiro passo desta investigação foi a obtenção de linhagens contendo supressores de nic 8 e com requerimentos nutricionais diferentes das linhagens MSE su nic 8, com as quais deveriam ser cruzadas para obtenção dos heterocários. A obtenção das referidas linhagens se fez segundo a metodologia descrita no item 3.8.6. As que foram selecionadas para cruzamentos são apresentadas, juntamente com seus respectivos genótipos, na Tabela XXXII.

Tabela XXXII - Genótipos das linhagens segregantes utilizadas em cruzamentos com as linhagens MSE, su nic 8 no teste de alelismo

Supressor envolvido	Genótipo
<u>su 1 nic 8</u>	<u>pro1</u> ; <u>paba6</u> ; <u>w3</u> ; <u>pyro4</u> ; <u>s3</u> ; <u>v29</u> ; <u>fac303</u> ; <u>su1nic8</u> ; <u>nic8</u>
<u>su 2 nic 8</u>	<u>pro1</u> ; <u>paba6</u> ; <u>w3</u> ; <u>pyro4</u> ; <u>s3</u> ; <u>v29</u> ; <u>fac303</u> ; <u>su2nic8</u> ; <u>nic8</u>
<u>su 3 nic 8</u>	<u>pro1</u> ; <u>paba6</u> ; <u>w3</u> ; <u>pyro4</u> ; <u>s3</u> ; <u>v29</u> ; <u>fac303</u> ; <u>su3nic8</u> ; <u>nic8</u>
<u>su 8 nic 8</u>	<u>pro1</u> ; <u>paba6</u> ; <u>w3</u> ; <u>pyro4</u> ; <u>s3</u> ; <u>v29</u> ; <u>fac303</u> ; <u>su8nic8</u> ; <u>nic8</u>
<u>su 9 nic 8</u>	<u>pro1</u> ; <u>paba6</u> ; <u>w3</u> ; <u>pyro4</u> ; <u>s3</u> ; <u>v29</u> ; <u>fac303</u> ; <u>su9nic8</u> ; <u>nic8</u>

De peritécios híbridos obtidos dos cruzamentos mencionados, foram analisadas colônias quanto à prototrofia para ácido nicotínico. Os resultados são apresentados na Tabela XXXIII.

Tabela XXXIII - Número de colônias prototróficas e auxotróficas para ácido nicotínico, obtidos de peritécios híbridos em diversos cruzamentos. Teste de alelismo

Supressores envolvidos no cruzamento	Segregantes		Alelismo
	Prototróficos	Auxotróficos	
<u>su 1</u> x <u>su 3</u>	26	0	alelos
<u>su 1</u> x <u>su 5</u>	40	12	não alelos
<u>su 3</u> x <u>su 5</u>	106	50	não alelos
<u>su 3</u> x <u>su 8</u>	22	4	não alelos
<u>su 1</u> x <u>su 8</u>	22	4	não alelos
<u>su 8</u> x <u>su 5</u>	47	5	não alelos
<u>su 2</u> x <u>su 9</u>	52	0	alelos
<u>su 2</u> x <u>su 4</u>	52	0	alelos
<u>su 9</u> x <u>su 4</u>	26	0	alelos

Os dados da Tabela XXXIII sugerem a existência de pelo menos quatro locos supressores sendo um proximal e três distais com relação a nic_8 , conforme revelou a análise genética. Assim, seriam alelos os supressores su_9 , su_2 e su_4 (loco proximal) . Também seriam alelos su_1 e su_3 (loco distal) . Os outros dois locos seriam os dos supressores su_5 e su_8 . Resta ainda fazer menção ao su_7 , o supressor resultante de duplicação que não foi localizado com relação aos demais.

Verifica-se ainda que dos supressores mapeados em posição proximal (su_2 , su_4 , su_9) embora sendo alelos, exibiram diferentes graus de resistência à pFA . Trata-se, realmente de alelos múltiplos, ou seja, mutantes no mesmo loco mas com manifestações fenotípicas de intensidades diferentes. O mesmo ocorreu com os supressores su_1 e su_3 , mapeados em posição distal.

Particularmente notável, ainda com respeito à resistência à pFA , foi o comportamento do su_6 nic_8 , o qual revelou-se um dos menos resistentes. Este resultado vem confirmar a hipótese de supressão intracistrônica, uma vez que, por reversão verdadeira, a tendência seria a de aproximar-se do máximo de resistência, conforme foi discutido anteriormente.

5 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 - OBTENÇÃO DOS SUPRESSORES

O presente trabalho iniciou-se com a indução de mutação através de irradiação com luz ultra violeta, visando obter prototrofia a partir de um mutante auxotrófico para ácido nicotínico.

5.2 - ANÁLISE MITÓTICA

Através de análises mitóticas (ver Tabela II) , concluiu-se que todos os supressores estudados estão localizados no mesmo grupo de ligação VII do mutante correspondente (nic 8). Por esta razão, até esta etapa não se pôde afirmar que se tratava, realmente de supressores, pois reversões verdadeiras de nic 8 teriam dado o mesmo resultado na análise mitótica. Posteriormente, pela análise meiótica, a hipótese da reversão foi deixada à parte, uma vez que foram observados, em todos os casos, recombinantes que eram deficientes para ácido nicotínico.

Além dos resultados concernentes à análise mitótica propriamente dita, algumas considerações foram feitas a respeito de alguns eventos excepcionais que ocorreram durante o processo de análise.

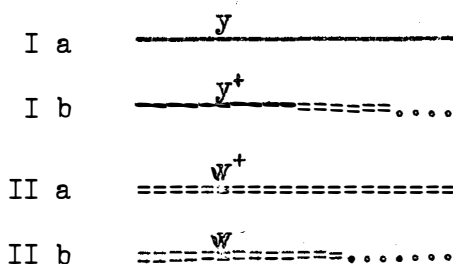
Com relação ao su 3 nic 8 , o diplóide MSE su 3 nic 8 x bi 1 ni 103 forneceu setores haplóides (de todas as côres) para análise. Posteriormente, um setor amarelo surgiu no diplóide verde original. Isolado e purificado, concluiu-se que se tratava de um setor diplóide, pelo tamanho de seus conídios e pela capacidade de crescer em meio mínimo não suplementado. Quanto à sua origem, o diplóide original deve ter sofrido permuta mitótica , espontaneamente, entre o gene y e o centrômetro do grupo de ligação I , segregando o diplóide amarelo (homozigoto yy) . Deste diplóide permutado ,

obteve-se mais 17 setores haplóides (amarelos e brancos) que também foram analisados e o resultado foi concordante com aquele obtido da análise de haplóides do diplóide normal.

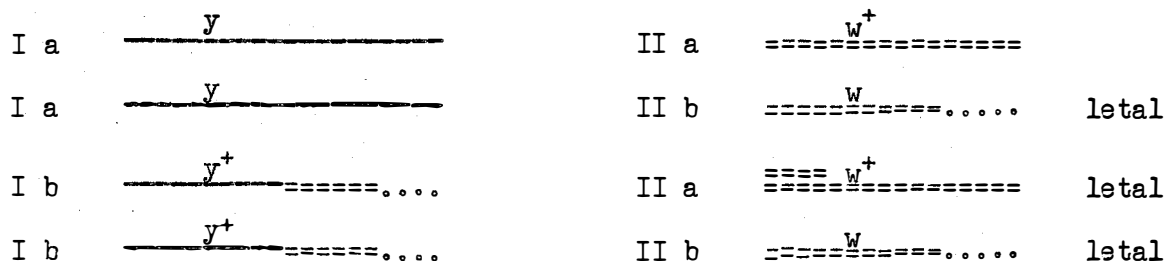
O mesmo fenômeno foi observado no diplóide MSE su 6 nic 8 x bi 1 ni 103 o qual, por permuta mitótica no grupo de ligação II, produziu um diplóide branco (homozigoto ww) mas que não foi utilizado para análise devido a dificuldades de isolamento de haplóides brancos.

Com o diplóide MSE su 9 nic 8 x bi 1 ni 103, observou-se que, por haploidização, houve segregação somente de setores amarelos. Tal resultado foi atribuído a uma anormalidade ocorrida no diplóide original. Provavelmente, a causa seja devida a uma translocação envolvendo o grupo de ligação II (proveniente da linhagem MSE) e o grupo de ligação I (proveniente de linhagem bi 1 ni 103), como está esquematicamente representado a seguir.

Diplóide translocado



Haplóides segregantes



Como se pode observar no esquema acima, somente são viáveis os haplóides de genótipo y w⁺ (conídios amarelos) pois todos os demais contêm uma deficiência letal no grupo de ligação I ou no II, ou em ambos.

Uma outra observação que deve ser mencionada é a que se verificou na análise do su 8 nic 8. O fato de todos os setores analisados serem FAC sugere a presença de uma mutação letal ocorrida no diplóide, no cromossoma proveniente da linhagem bi 1 ; ni 103.

Finalmente, com a linhagem MSE su 7 nic 8, verificou-se que a mesma apresentava desenvolvimento anormal (colônias compactas). Isto foi atribuído à presença de uma duplicação, provavelmente no grupo de ligação VII, conforme evidências obtidas da análise meiótica. Fenômeno semelhante já foi descrito em Aspergillus nidulans quando BAINBRIDGE & ROPER (1966) verificaram que duplicação cromossômica causa o aparecimento de colônias anormais, morfologicamente compactas, denominadas por estes setores de colônias "crinkled".

5.3 - ANÁLISE MEIÓTICA E TESTE DE TRÊS PONTOS

O resultado destas análises serviram, em primeiro lugar, para comprovar a existência de supressores nas diversas linhagens prototróficas devido ao aparecimento de recombinantes auxotróficos, o que não teria ocorrido se se tratasse de reversão.

Entretanto, a finalidade principal da análise foi a de determinar a posição e a distância relativa dos supressores no grupo de ligação VII. Os resultados (apresentados na Figura 4) mostram que os supressores foram mapeados tanto em posição distal como proximal, com relação a nic 8.

O su 1 nic 8 foi analisado em cruzamento com a linhagem bi 1 ni 103 (análise meiótica) e em cruzamento com a linhagem pro 1 paba 6 v 10 segundo um teste de três pontos. Os resultados foram concordantes, dando não ligação a nic 8 e em posição distal com relação a êste. O teste de três pontos com a linhagem bi 1 w 3 fl 1, confirmou êste resultado.

O su 2 nic 8 e su 9 nic 8 foram mapeados em posição proximal, com relação a nic 8, mas com segregação independente dêste (não ligados geneticamente).

O su 3 nic 8, o su 5 nic 8 e o su 8 nic 8 também foram mapeados em posição distal e não ligados a nic 8.

O su 4 nic 8 revelou ligação de 25 unidades de nic 8 e em posição proximal.

Um caso notável foi o revelado pela análise do su 6 nic 8 com ligação quase que absoluta (2,3 unidades) com nic 8, visto que da análise de 104 ascosporos somente um recombinante foi reconhecido.

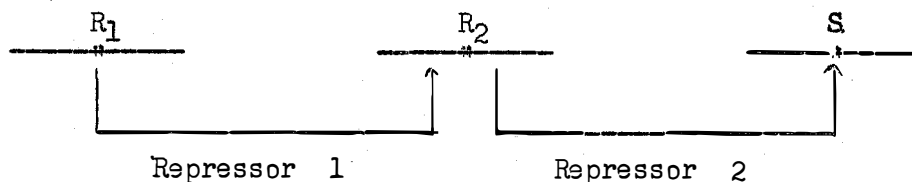
Finalmente, o su 7 nic 8 foi, reconhecidamente, resultante de uma duplicação no grupo de ligação VII, dado o aparecimento de colônias compactas (típicas de duplicação) na amostra de ascosporos. Verificou-se que todas as colônias compactas eram prototróficas e capazes de formar setores típicos resultantes da perda da duplicação. A análise de colônias normais (não compactas) deu, como resultado 21,09 unidades a distância entre nic 8 e v 10 no mapa genético, resultado êste concordante com o determinado originalmente (AZEVEDO & ROPER, 1970). Isto demonstra que a duplicação, responsável pela supressão de nic 8, localiza-se em posição distal e não ligada àquelas marcas, visto que não interferiu com a ligação nic 8 - v 10 (ver item 4.3.2.7).

5.4 - DOMINÂNCIA E RECESSIVIDADE EM HETEROCÁRIOS E DIPLÓIDES E RELAÇÕES COM O MODO DE AÇÃO GÊNICA

O teste de heterocários e diplóides homozigotos para nic 8 e heterozigotos para su nic 8, em meio não suplementado com ácido nicotínico (ver Tabela XXVI, ítem 4.4), revelou que todos os heterocários foram capazes de crescer em tal meio, ocorrendo o inverso com os diplóides (exceto um).

Este resultado foi interpretado com base no sistema de regulação gênica proposto por PONTECORVO (1963), conhecido por sistema de regulação em cascata ("cascade regulation"), o qual envolve dois ou mais repressores como reguladores da ação gênica (Figura 5).

Figura 5 - Sistema de regulação em "cascata" (PONTECORVO, 1963)



O repressor R_2 tem a capacidade de interagir com o gene estrutural, privando-o de sua atividade funcional que é a produção de mRNA (RNA mensageiro) que conduz à síntese de proteínas. O repressor R_1 , por sua vez, interfere com a ação do repressor R_2 , seja por repressão do cistron r_2^+ ou pela capacidade de formação de um complexo inativo $R_1 - R_2$ devido a uma afinidade estrutural dos dois repressores. Esta deve ser a situação que ocorre nos tipos selvagens, onde a presença simultânea dos dois repressores permite a atividade normal dos genes estruturais.

Os resultados aqui apresentados sugerem a existência de pelos menos quatro locos supressores, conforme revelou o teste de alelismo. Uma hipótese plausível é a de que estão envolvidos dois repressores na regulação do gene estrutural para ácido nicotínico, tal como no sistema proposto por PONTECORVO (1963). Assim, o mutante nic 8 corresponderia a mutação no loco responsável pela produção do repressor R_1 . Os supressores seriam mutantes nos locos responsáveis pela produção de um polipeptídeo complexo (heteromultímero) - o repressor R_2 . No tipo selvagem, cada um dos locos está relacionado com a produção de uma unidade daquele repressor; a ocorrência de mutação recessiva em qualquer desses locos resultaria em alteração na respectiva unidade estrutural, tornando inativo, total ou parcialmente, o complexo repressor.

Pela hipótese apresentada, as linhagens se apresentariam com os seguintes genótipos e fenótipos.

Linhagem	Genótipo	Fenótipo em meio sem ácido nicotínico
<u>MSE</u> (original)	$r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^+$	-
<u>MSE su nic 8</u> (<u>su 1</u> , <u>su 4</u> ou <u>su 9</u>)	$r_1^-, r_2^-, r_3^+, r_4^+, r_5^+$	+
<u>MSE su nic 8</u> (<u>su 1</u> ou <u>su 3</u>)	$r_1^-, r_2^+, r_3^-, r_4^+, r_5^+$	+
<u>MSE su nic 8</u> (<u>su 5</u>)	$r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^-, r_5^+$	+
<u>MSE su nic 8</u> (<u>su 8</u>)	$r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^-$	+
<u>Selvagem</u>	$r_1^+, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^+$	+

Por outro lado, os diplóides e heterocários, já mencionados anteriormente, se apresentariam, genotípica e fenotipicamente, como segue.

	Genótipo	Fenótipo em meio sem ácido nicotínico
<u>Diplóide</u>		
<u>MSE su nic 8 // F</u>	$\frac{r_1^-, r_2^-, r_3^+, r_4^+, r_5^+}{r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^+}$	-
	$\frac{r_1^-, r_2^+, r_3^-, r_4^+, r_5^+}{r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^+}$	-
	$\frac{r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^-, r_5^+}{r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^+}$	-
	$\frac{r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^-}{r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^+}$	-
	$\frac{r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^-}{r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^+}$	-
<u>Heterocário</u>		
<u>(MSE su nic 8 x F)</u>	$(r_1^-, r_2^-, r_3^+, r_4^+, r_5^+)(r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^+)$	+
	$(r_1^-, r_2^+, r_3^-, r_4^+, r_5^+)(r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^+)$	+
	$(r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^-, r_5^+)(r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^+)$	+
	$(r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^-)(r_1^-, r_2^+, r_3^+, r_4^+, r_5^+)$	+

Um dos supressores caracterizou-se por uma particularidade, razão pela qual este caso é discutido à parte. Trata-se de supressão envolvendo uma duplicação do grupo de ligação VII, mapeada em posição distal com relação a nic 8. Neste caso não foi investigada a relação de alelismo com outros supressores mas é provável que se trata de alteração em um daqueles locos mapeados em posição distal. A duplicação deve ter causado alteração num daqueles cistrons, resultando em supressão de nic 8 como nos outros casos. A análise de alguns setores normais, segregantes dos duplicados, revelou que a perda da duplicação não faz recuperar o fenótipo mutante, uma vez que não foram encontrados segregantes auxotróficos.

A hipótese envolvendo repressores no mecanismo de ação gênica dos supressores é fundamentada, pelos resultados aqui apresentados, apenas no teste de heterocários e diplóides. Por esta razão, ela não deve ser considerada como absoluta. A ausência de estudos enzimáticos e de outras informações genéticas e bioquímicas a respeito dos supressores, impõe certa limitação à hipótese apresentada. Portanto, não deve ser excluída a possibilidade da existência de um mecanismo mais ou menos complexo que somente possa ser determinado pela disponibilidade de dados mais completos.

Uma exceção com relação aos supressores indiretos, foi constatada na análise do su 6 nic 8, o qual revelou forte ligação com nic 8. Também a análise do diplóide homozigoto para nic 8 e heterozigoto para su 6 nic 8 (Tabela XII, ítem 4.4) indicou que este é capaz de crescer em meio não suplementado com ácido nicotínico, comportando-se diferentemente dos demais supressores estudados. A possibilidade de reversão de nic 8⁻ para nic 8⁺ foi deixada à parte, uma vez que, pela análise genética, foi detectado pelo menos um recombinante comprovadamente auxotrófico. Conclui-se, por

êste resultado que se trata de supressão do tipo intragênica (intracistrônica), à semelhança da supressão descrita por CRICK e col. (1961) . Em decorrência desse tipo de supressão, o repressor R_1 recupera sua capacidade funcional, pelo menos parcialmente, e o sistema passa a funcionar como no tipo selvagem.

Na análise desse supressor, o aparecimento de um recombinante auxotrófico foi considerado como sendo resultante de permuta intracistrônica, de ocorrência rara mas possível.

5.5 - RESISTÊNCIA À p-fluorofenilalanina (pFA)

A p-fluorofenilalanina é um análogo do aminoácido fenilalanina capaz de competir com êste na formação da estrutura primária de proteínas. A resistência à pFA está relacionada, pois, com a quantidade relativa de fenilalanina produzida pelo organismo. A biosíntese de fenilalanina está relacionada com a de ácido nicotínico, pois ambas as substâncias são sintetizadas a partir de um precursor comum - o ácido shiquímico (DAVIS, 1955) . Daí a razão de ter sido investigado o nível de resistência à pFA das diversas linhagens estudadas.

Pelos dados obtidos (Tabela XIX , ítem 4.6) , verificou-se que existem pelo menos quatro classes distintas quanto à resistência ao pFA . As linhagens MSE e MSE su 7 nic 8 não exibiram o menor grau de resistência sendo completamente inibidas em qualquer das concentrações de pFA usadas. A razão dêsse comportamento é que a primeira encerra o mutante nic 8 com efeito pleiotrópico: auxotrofia para ácido nicotínico e não resistência ao pFA . A outra (MSE su 7 nic 8) contém uma duplicação (ver ítem 4.3.2.7), e linhagens duplicadas são completamente inibidas por pFA , à semelhança do que ocorre com os diplóides de um modo geral.

As outras três classes exibiram diversos níveis de resistência, demonstrando diferenças distintas entre alguns supressores. Os supressores su 1 nic 8 , su 2 nic 8 e su 6 nic 8 foram resistentes apenas à concentração de 250 µg pFA/ml , su 5 nic 8 e su 9 nic 8 o foram a 500 µg/ml e su 3 nic 8 , su 4 nic 8 e su 8 nic 8 foram os mais resistentes (1.000 µg por ml) .

Por êstes resultados, é evidente que a supressão de nic 8 tem um efeito pleiotrópico, ou seja, também confere resistência ao pFA . Este resultado está de acôrdo com as observações de WARR & ROPER (1965), que as interpretaram sob o aspecto bioquímico: o mutante nic 8 bloqueia a síntese no passo anterior ao ácido shiquímico, um precursor comum de ácido nicotínico e de fenilalanina. A supressão de nic 8 resulta em aumento na síntese de ácido shiquímico e, conseqüentemente, em prototrofia para ácido nicotínico e aumento no nível de fenilalanina conferindo-lhe um maior poder de competição com o seu análogo (pFA) .

5.6 - TAXA DE CRESCIMENTO, EFICIÊNCIA E DIFERENCIAÇÃO DAS LINHAGENS

A taxa de crescimento das linhagens (inclusive MSE) em diversos meios de cultura, foi determinada pelo aumento do diâmetro da colônia em micra por hora de incubação. Os valores determinados variaram de 0 a 651 , indicando diferenças entre as linhagens quanto à sua capacidade de crescimento. As taxas de crescimento assumiram maiores valores quando medidas com 96 horas de incubação, para todas as linhagens. Isto indica que o ritmo de crescimento das colônias foi crescente no período de tempo considerado nesse experimento. Verificou-se também, que a taxa de crescimento, para todas as linhagens, foi maior em meio completo e meio suplementado com ácido nicotínico e um tanto menor em meio sem suplementação da vitamina. As discrepâncias

entre as taxas de crescimento das diversas linhagens indicam claramente as diferenças dos diversos supressores, uma vez que se trata de linhagens isogênicas que diferem apenas pelo su nic 8.

A eficiência dos diversos supressores, determinada através das capacidades das respectivas linhagens de crescerem em meio não suplementado com ácido nicotínico, variou de 29,8 a 112,5 %. Os supressores mais eficientes foram o su 6 nic 8, su 8 nic 8 e su 9 nic 8 nos três tempos de incubação considerados. Os demais foram variáveis com o tempo, mas o menos eficiente, foi, sem dúvida, o su 7 nic 8 o supressor que resultou de duplicação. A significância do desvio da eficiência com relação à unidade (100%) é dada pelo teste t da comparação de médias.

As diferenças entre os supressores foram demonstradas também pela análise da variância do crescimento das linhagens em diversos meios de cultura e diferentes tempos de incubação.

Da análise, concluiu-se que todos os efeitos foram significativos, variando apenas quanto à magnitude. Assim, o efeito de linhagens (L) indica que há diferenças marcantes entre as linhagens quanto à sua capacidade de crescimento. A influência do meio de cultura (M) e tempo de incubação, obviamente deram altamente significativos. Das interações, a significância de linhagens vs. meios (L x M) indica que as diversas linhagens reagiram diferentemente nos diversos meios de cultura e a interação linhagens vs. tempo de incubação (L x T) indica que os ritmos de crescimento das linhagens através do tempo foram diferentes. Entretanto, a significância da interação tripla (L x M x T), embora bem menor em magnitude, indica que as interações (L x M) e (L x T) não são constantes para qualquer tempo ou qualquer meio de cultura, respectivamente. A significância da interação meio de cultura vs. tempo (M x T), de menor importância, era de fato espe

rada, uma vez que o meio completo tende a se esgotar menos rapidamente que os demais, com o passar do tempo.

Resumindo, os resultados constatados nesta análise demonstram, estatisticamente, as diferenças das linhagens não só quanto à sua capacidade de crescimento, mas também quanto ao seu comportamento nos diversos meios de cultura e nos diferentes tempos de incubação. Convém acrescentar que as diferenças entre linhagens são um reflexo das diferenças dos supressores de nic 8 pois, como já foi mencionado, trata-se de linhagens isogênicas que diferem apenas pelo su nic 8

5.7 - ALELISMO

O teste de alelismo revelou a existência de pelo menos quatro locos supressores. A existência de diversos locos atuando como supressores de uma única deficiência é um caso que se assemelha, particularmente, aos relatados por LUIG (1962), LILLY (1963), GAJEWSKI & LITWINSKA (1967) e AYLING (1969), em estudos com mutantes meth em Aspergillus nidulans

É sugerido que todos os supressores estão envolvidos na síntese de um único repressor, um polipeptídeo heteromultímero que tem a capacidade de bloquear a atividade do gene estrutural.

5.8 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados de estudos de supressores de nic 8 (deficiência para ácido nicotínico) apresentados no presente trabalho, forneceram uma série de informações que são resumidas a seguir.

- a. Todos os nove supressores de nic 8, obtidos por irradiação da linhagem MSE com luz ultra violeta, foram mapeados no grupo de ligação VII, o mesmo que encerra o loco nic 8.

- b - As análises genéticas revelaram que três dos supressores são proximais com relação a nic 8 e v 10. Outros quatro supressores foram localizados em posição distal em relação àquelas marcas. Um outro supressor (su 7 nic 8, resultante de duplicação) foi de localização indeterminada e, finalmente, o su 6 nic 8 foi considerado como sendo do tipo intragênico.
- c - O teste de alelismo revelou que os supressores proximais são alelos entre si (alelos múltiplos). Dos supressores distais são alelos o su 1 e su 3, que não são alelos dos outros dois (su 5 e su 8). Portanto, ficou demonstrada a existência de pelo menos quatro locos supressores.
- d - O modo de ação dos supressores pode ser relacionado com o mecanismo de regulação da síntese de ácido nicotínico, onde nic 8 seria um loco repressor e os supressores seriam mutantes em quatro outros locos responsáveis pela produção de um segundo repressor (provavelmente um polipeptídeo heteromultímero). Este repressor tem capacidade de bloquear a atividade do gene estrutural, mas sua ação é inibida quando em presença do primeiro repressor. Além desses foi detectado um supressor do tipo intragênico, o qual se refere a reparo da própria mutação nic 8. Este esquema se adapta ao mecanismo de regulação em cascata, proposto por PONTECORVO (1963). Os testes de diplóides e heterocários homozigotos para nic 8 e heterozigotos para su nic 8 dão o suporte experimental a esta hipótese.
- e - Oito dos nove supressores estudados apresentaram efeito pleiotrópico, pois, além de suprimir o mutante nic 8, apresentaram resistência à p-fluorofenilalanina (análogo da fenilalanina) em maior ou menor grau.

Isto ocorre porque existe um precursor comum — o ácido shiquímico — na biossíntese de fenilalanina e de ácido nicotínico. O aumento da síntese deste precursor (por ação dos supressores) eleva o nível das duas substâncias no citoplasma, resultando em prototrofia para ácido nicotínico e maior poder de competição da fenilalanina com o seu análogo (daí a resistência à p-FA). Estes resultados foram interpretados com base nas observações de WARR & ROOPER (1965). Um dos supressores não exibiu resistência à p-FA, por envolver uma duplicação a qual, à semelhança do que ocorre com os diplóides de um modo geral, é inibida por p-FA.

f - Diferenças marcantes foram observadas nas linhagens com supressor, no que diz respeito à sua capacidade de crescimento, e comportamento de um modo geral, em diversos meios de cultura e tempos de incubação. A análise estatística evidenciou estas diferenças, as quais foram interpretadas como sendo um reflexo das diferenças entre os supressores, considerando que as linhagens são isogênicas que diferem apenas com relação aos supressores.

Com estes resultados são apresentadas algumas contribuições ao estudo dos supressores da deficiência para ácido nicotínico. As informações obtidas, embora insuficientes, abrem perspectivas para novos campos de estudos. Em caráter sugestivo, são apresentados alguns aspectos que poderiam ser investigados a respeito dos supressores.

Sob o aspecto bioquímico poderia ser investigado a sequência de reações que levam à produção de ácido nicotínico em Aspergillus nidulans; para esse fim deveriam ser empregados outros mutantes deficientes para esta vitamina e em meios de cultura apropriados procurar detectar e

identificar os produtos acumulados. Conhecida essa sequência, poderia ser determinado em que ponto estaria atuando o supressor ou qual a enzima que está sob sua dependência.

Conhecida a enzima envolvida no processo de supressão, um passo subsequente seria o seu isolamento da linhagem selvagem, da deficiente para ácido nicotínico (nic 8) e da linhagem nic 8 com supressor e procurar detectar possíveis alterações ou similaridades estruturais.

Ainda sob o ponto de vista bioquímico poder-se-ia investigar se as linhagens nic 8 com supressor são capazes de produzir material de reação cruzada ("cross reacting material"). Informações a esse respeito podem ser obtidas de YANOFSKY & St. LAWRENCE (1960) e de trabalhos recentes de YANOFSKY e colaboradores.

Sob o aspecto genético, poderiam ser obtidos e estudados maior número de supressores na tentativa de se detectar mutantes em outros locos além destes determinados no presente trabalho. Outros tipos de supressores poderiam ser descobertos, o que possibilitaria verificar a existência ou não de outros mecanismos de supressão, como por exemplo um processo alternativo de síntese do ácido nicotínico.

Um outro aspecto que auxiliaria o estudo do mecanismo de supressão seria o relacionado com a especificidade dos supressores, ou seja, se estes são específicos para nic 8 ou se são capazes de suprimir qualquer outro mutante nic. Para esse fim, são necessárias linhagens de genótipo apropriado. Por exemplo, para estudo da ação do supressor de nic 8 sobre o mutante nic 2, poderia ser utilizada a linhagem y, nic 2, ribo 5, na qual nic 2 e ribo 5 são ligados (grupo de ligação V). Do heterocáριο entre esta linhagem e a MSE su nic 8 seria isolado um diplóide que em seguida seria haploidizado pela técnica da p-FA. Como todos os

supressores são ligados mitoticamente a nic 8 deduz-se que, em ausência de permuta mitótica, todos os setores que forem deficientes para riboflavina também serão deficientes para ácido nicotínico (presença de nic 2) se os supressores de nic 8 forem específicos para esse mutante. Informações a respeito da especificidade dos supressores também seriam úteis na identificação de um processo alternativo de síntese do ácido nicotínico.

Finalmente, um outro aspecto importante do ponto de vista genético seria o estudo das interações entre os supressores, tanto alelos como não alelos. Isso seria feito através de cruzamentos apropriados, procurando-se obter os diversos pares de supressores em diplóides e em heterocários. O estudo desse comportamento forneceria evidências importantes a respeito do modo de ação dos supressores.

Assim, se elevadas a efeito as sugestões apresentadas, juntamente com as informações já disponíveis, ter-se-ia uma contribuição realmente valiosa aos estudos dos supressores bem como à Genética e à Biologia de um modo geral.

6 - RESUMO

Resumindo os resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes conclusões gerais podem ser mencionadas:

- 1 - Por irradiação da linhagem MSE do Aspergillus nidulans, onze supressores foram isolados e purificados em meios de cultura apropriados.
- 2 - Através da análise mitótica, nove dos supressores de nic 8 foram mapeados no grupo de ligação VII, o mesmo que encerra o loco nic 8.
- 3 - Através de análises meióticas, os supressores foram mapeados em relação as marcas nic 8 e v 10. Verificou-se que três dos supressores (su 2, su 4 e su 9) são proximais e outros quatro (su 1, su 3, su 5 e su 8) são distais em relação àquelas marcas. Um dos supressores (su 7) foi de posição indeterminada e, finalmente, o su 6 revelou-se um supressor do tipo intragênico.
- 4 - Pelos testes de alelismo, verificou-se que os supressores proximais são alelos entre si (alelos múltiplos) e que dos supressores distais su 1 e su 3 também são alelos. Concluiu-se, portanto, que existem pelo menos quatro locos supressores.
- 5 - O modo de ação dos supressores pôde ser relacionada com o mecanismo de regulação da síntese de ácido nicotínico, onde nic 8 seria mutante no loco responsável pela produção de um repressor. Os supressores seriam mutantes nos locos responsáveis pela produção de um segundo repressor, segundo uma adaptação ao mecanismo de regulação em cascata, proposto por PONTECORVO (1963). Os testes de diplóides e heterocários homozigotos para nic 8 e heterozigotos para su nic 8 dão o suporte experimental a esta hipótese.

- 6 - Todos os supressores, exceto o su 7 que envolve uma duplicação, apresentaram efeito pleiotrópico, ou seja, foram capazes de suprimir o mutante nic 8 e conferir resistência à p-fluorofenilalanina (análogo da felilalanina). Estes resultados foram interpretados segundo as observações de WARR & ROPER (1965) de que o ácido shiquímico é um precursor comum na síntese de ácido nicotínico e de fenilalanina. O aumento do nível daquele precursor (por ação dos supressores) resultaria naquele efeito pleiotrópico.

- 7 - Diferenças marcantes foram observadas nas linhagens com supressor, no que diz respeito à sua capacidade de crescimento, e comportamento de um modo geral, em diversos meios de cultura e tempos de incubação. A análise estatística evidenciou estas diferenças, as quais foram interpretadas como sendo um reflexo das diferenças entre os supressores, considerando que as linhagens são isogênicas que diferem apenas com relação aos supressores que encerram.

7 - SUMMARY

- 1 - Eleven nicotinic acid non-requiring strains were obtained following ultra-violet treatment of a strain which required nicotinic acid (strain MSE) of the filamentous fungus Aspergillus nidulans.
- 2 - Nine of the eleven strains analysed mitotically had suppressors of the requirement caused by the nic 8 allele located in linkage group VII: nic 8 itself is located in linkage group VII .
- 3 - Meiotic analyses indicated the location of the nic 8 suppressors in relation to nic 8 and v 10 markers in linkage group VII . Three of the suppressors (su 2 , su 4 and su 9) were proximal to nic 8 and v 10 and other four were distal to nic 8 and v 10 (su 1 , su 3 , su 5 , and su 8) . Su 7 was not exactly located and su 6 was shown to be an intragenic suppressor.
- 4 - Allelism tests revealed that su 2 , su 4 and su 9 were alleles ; also su 1 and su 3 were alleles. Consequently, there are at least four suppressor loci for the requirement caused by nic 8 .
- 5 - The explanation of the mode of action of the suppressors was based in the cascade regulation mechanism proposed by PONTECORVO (1963). In this case, nic 8 produces a repressor. The suppressor produces a second repressor which prevents the production of the repressor by nic 8 . Analysis of heterokaryons and diploids homozygous for nic 8 and heterozygous for the different suppressors gave experimental support to this hypothesis.

- 6 - All analysed suppressors, with exception of su 7 which involves a duplication of genetic material, are pleiotropic since they are able to suppress the nic 8 allele and also are able to confer resistance to p-fluorophenylalanine, an analogous of the aminoacid phenylalanine. This pleiotropic effect can be explained biochemically, since shikimic acid is a precursor of both phenylalanine and nicotinic acid ; an increase in the amount of shikimic acid produced, through the action of the suppressors, results in the pleiotropic effect observed.
- 7 - Striking differences were observed for the different suppressors in relation to the growth rate of strains containing them in addition to the nic 8 allele, and were interpreted as being solely due to the action of such suppressors since the used strains, with exception of the suppressors, were isogenic.

8 - BIBLIOGRAFIA

- APIRION, D. - 1962 - A General System for the Automatic Selection of Auxotrophs from Prototrophs and Vice Versa in Microorganisms. Nature, Lond. 192: 959-961.
- AYLING, P. D. - 1969 - Methionine Suppressors in Aspergillus nidulans: Their Genetics and Behaviour in Heterokaryons and Diploids. Genet. Res. Camb. 14: 275-289 .
- AZEVEDO, J. L. & J. A. ROPER - 1970 - Mitotic Non-conformity in Aspergillus nidulans: Successive and Transposable Genetic Changes. Genet. Res. Camb. 16: 79-93.
- BAINBRIDGE, B. W. & J. A. ROPER - 1966 - Observations on the Effects of a Chromosome Duplication in Aspergillus nidulans. Journal of Gen. Microbiol. 42: 417-424.
- BAKER, W. K. - 1968 - Position Effect Variegation. Advances in Genetics 14: 133-169 .
- BALL, C. - 1967 - Chromosome Instability Related to Gene Suppression in Aspergillus nidulans. Genet. Res., Camb. 10: 173-183.
- BALL, C. & J. L. AZEVEDO - 1964 - A "Fluffy" Mutant in Aspergillus nidulans. Aspergillus News Letter 5: 9 .
- BARRAT, R. W. , G. B. JOHNSON & W. N. OGATA - 1965 - Wild Type and Mutant Stocks of Aspergillus nidulans. Genetics 52: 233-246 .
- BARTH, L. J. - 1964 - Development - Selected Topics. Addison - Wesley Publish. Co. , Inc. , U. S. A. 111 p.
- BERG, P. , C. YANOFSKY & J. CARBON - 1967 - Missense Suppression due to a Genetically Altered RNA . Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 31: 487-497 .
- BONNER, D. M. - 1951 - Gene-enzyme Relationship in Neurospora. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 16: 143-157.

- BRENNER, S. & J. R. BECKWITH - 1965 - Ochre Mutants, a New Class of Suppressible Nonsense Mutants. J. Mol. Biol. 13: 629-637.
- BRINK, N. C. , B. KARIYA & D. R. STADLER - 1969 - The Detection of Reverse Mutations at the mtr Locus in Neurospora and Evidence for Possible Intragenic (Second Site) Suppressor Mutations. Genetics 63: 281-290.
- CARBON, J. , P. BERG & C. YANOFSKY - 1966 - Studies on Missense Suppression of the Tryptophan Synthetase A - protein Mutant , A 36 . Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 56: 764-771 .
- CARBON, J. & J. B. CURRY - 1968 - Genetically and Chemically Derived Missense Suppression Transfer RNA's with Altered Enzymic Aminoacylation Rates. J. Mol. Biol. 38: 201-216 .
- CHALMERS, Jr., J. H. & A. T. SEALE - 1971 - Supersuppressible Mutants in Neurospora: Mutants at the tryp-1 and tryp-2 Loci Affecting the Structure of the Multienzyme Complex in the Tryptophan Pathway. Genetics 67: 353-363 .
- CHILDS, J. D. - 1967 - Genetic Analyses of Suppressors of Methionine Mutants of Salmonella typhimurium. Heredity 22: 425-434.
- CLARKE, C. H. - 1963 - Suppression by Methionine of Reversions to Adenine Independence in Schizosaccharomyces pombe. J. Gen. Microbiol. 31: 353-363 .
- COX, B. S. - 1965 - A Cytoplasmic Suppressor of Super Suppressor in Yeast. Heredity 20: 505-521.
- COX, B. S. - 1971 - A Recessive Lethal Super Suppressor Mutation in Yeast and Other Phenomena. Heredity 26: 211-232.
- CRICK, F. H. C. , L. BARNETT , S. BRENNER & R. J. WATTS - TOBIN - 1961 - General Nature of the Genetic Code for Proteins. Nature , Lond. 192: 1227-1232 .
- DAVIS, B. D. - 1955 - Intermediates in Amino Acid Biosynthesis. Advanc. Enzymol. 16: 247-312 .

- DAVIS, R. H. - 1961 - Suppression of Pyrimidine 3 Mutants of Neurospora and its Relation to Arginine Synthesis. Science 134: 470-471.
- DAVIS, R. H. - 1962 - Consequences of a Suppressor Gene Effective with Pyrimidine and Proline Mutants of Neurospora. Genetics 47: 351-360 .
- DORN, G. L. - 1967 - A Revised Map of the Eight Linkage Group of Aspergillus nidulans. Genetics 56: 619-620.
- ELLIOTT, C. G. - 1960 - The Cytology of Aspergillus nidulans. Genet. Res., Camb. 1: 462-476 .
- GAJEWSKI, W. & J. LITWINSKA - 1968 - Methionine Loci and their Suppressors in Aspergillus nidulans. Aspergillus News Letter 8: 9-10 .
- GILES, N. H. - 1951 - Studies on the Mechanism of Reversion in Biochemical Mutants of Neurospora. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 16: 283-313 .
- GILES, N. H. & C. W. H. PARTRIDGE - 1953 - The Effect of a Suppressor on Allelic Inositolless Mutants in Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 39: 479-488 .
- GILMORE, R. A. - 1967 - Super-suppressors in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 56: 641-658.
- GILMORE, R. A. & R. K. MORTIMER - 1966 - Super-suppressor Mutations in Saccharomyces cerevisiae. J. Mol. Biol. 20: 302 pp.
- GILMORE, R. A. , J. W. STEWART & F. SHERMAN - 1958 - Amino Acid Replacements Resulting from Super Suppression of a Nonsense Mutant of Yeast. Biochim. Biophys. Acta 161: 270-272 .
- GORINI, L. - 1970 - Informational Suppression. Ann. Rev. Genetics 4: 107-134 .
- GORINI, L. & J. R. BECKWITH - 1966 - Suppression. Ann. Rev. Microbiol. 20: 401-422.
- GUPTA, N. K. & H. G. KHORANA - 1966 - Missense Suppression of the Tryptophan Synthetase A - protein Mutant , A 78 . Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 56: 772-779 .

- HAWTHORNE, D. C. - 1969 - The Selection of Nonsense Suppressors in Yeast. Mutation Res. 7: 187-197.
- HAWTHORNE, D. C. & R. K. MORTIMER - 1963 - Super - Suppressor in Yeast. Genetics 48: 617-620.
- HILL, C. W. , J. FOULDS , L. SOLL & P. BERG - 1969 - Instability of a Missense Suppressor Resulting from a Duplication of Genetic Material. J. Mol. Biol. 39: 563-581 .
- HOULAHAN, M. B. & H. K. MITCHELL - 1947 - A Suppressor in Neurospora and its Use as Evidence for Allelism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 33: 223-229 .
- HOWARTH, S. - 1958 - Suppressor Mutations in Some Cystine Requiring Mutants of Salmonella typhimurium. Genetics 43: 404-418 .
- JACOB, F. & J. MONOD - 1961 - Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. J. Mol. Biol. 3: 318-356.
- JAIN, M. L. - 1966 - Biochemical Definition of Yellow Virescent and Light Green Suppressor Mutation in Barley. Genetics 45: 813-818.
- KAFER, E. - 1961 - The Process of Spontaneous Recombination in Vegetative Nuclei of Aspergillus nidulans. Genetics 46: 1581-1609 .
- KEMPER, J. & P. MARGOLIN - 1969 - Suppression by Gene Substitution for the leu D Gene of Salmonella typhimurium. Genetics 63: 263-279.
- LEIN, J. & P. S. LEIN - 1952 - Studies on a Suppressor of Non-allelic Acetate - requirement Mutants of Neurospora. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 38: 44-48.
- LEWIS, D. - 1961 - Genetic Analysis of Methionine Suppressors in Coprinus lagopus. Genet. Res. , Camb. 2: 141-155.
- LHOAS, P. - 1961 - Mitotic Haploidization by Treatment of Aspergillus niger Diploids with Para - Fluorophenylalanine. Nature , Lond. 190: 744.
- LILLY, J. L. - 1963 - A Possible Technique for the Simultaneous Measurement of Forward Mutation Rate in Several Cistrons. Aspergillus News Letter 4: 8 .

- LUIG, N. H. - 1962 - Recessive Suppressors in Aspergillus nidulans Closed Linked to an Auxotrophic Mutant Which they Suppress. Genet. Res. , Camb. 3: 331-332.
- MITCHELL, M. B. & H. K. MITCHELL - 1952 - Observation on the Behaviour of Suppressors in Neurospora. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 38: 205-214.
- MORGAN, D. H. - 1961 - Recombination and Complementation Between Suppressor Genes in Coprinus lagopus. Heredity 16: 239 .
- MORGAN, D. H. - 1965 - Suppression of "purple" in Coprinus lagopus and Anomalous Situation. Genetic Res. , Camb. 7: 195-206 .
- MORPURGO, G. - 1961 - Somatic Segregation Induced by p - Fluorophenylalanine (PEP) . Aspergillus News Letter 2: 10 .
- OSHIMA, Y. & I. OSHIMA - 1966 - A Super - suppressor on the Thirteenth Linkage Group in Saccharomyces. Genet. Res. , Camb. 8: 1-7.
- PIOTROWSKA, M. , M. SAWICKI & P. WEGLENSKI - 1969 - Mutants of the Arginine-proline Pathway in Aspergillus nidulans. J. Gen. Microbiol. 55: 301-305.
- PONTECORVO, G. - 1963 - Microbial Genetics. Retrospect and Prospect. Proc. Roy. Soc. B. 158: 1-23 .
- PONTECORVO, G. , J. A. ROPER , L. M. HEMMONS , R. D. MACDONALD & A. W. J. BUFTON - 1953 - The Genetics of Aspergillus nidulans. Advances in Genet. 5: 141-238 .
- PONTECORVO, G. , E. TARR-GLOOR & E. FORBES - 1954 - Analyses of Mitotic Recombination in Aspergillus nidulans. J. Genetics 52: 226 -237.
- REISSIG, J. L. - 1959 - Forward and Back Mutation at the pyr-3 Locus of Neurospora. Heredity 13: 144 .
- REISSIG, J. L. - 1960 - Forward and Back Mutation in the pyr-3 Region of Neurospora. I. Mutations from Arginine Dependence to Prototrophy. Genet. Res. , Camb. 1: 356-374.

- REISSIG, J. L. - 1963.a - Induction of Forward Mutants in the pyr-3 Region of Neurospora. J. Gen. Microbiol. 30: 317-325.
- REISSIG, J. L. - 1963.b - Spectrum of Forward Mutants in the pyr-3 Region of Neurospora. J. Gen. Microbiol. 30: 327-337.
- RIZKI, T. M. , A. SOLIMAN , R. M. RIZKI , T. B. FRIEDMAN & S. K. HEALY - 1970 - Ultrastructural Effects of a Suppressor Mutation in Drosophila. Genetics 64: 459-469 .
- ROPER, J. A. - 1952 - Production of Heterozygous Diploids in Filamentous Fungi. Experientia 8: 14-15.
- SADGOPAL, A. - 1968 - The Genetic Code After the Excitement. Advances in Genet. 14: 325-404.
- SEALE, T. - 1968 - Reversion of the am Locus in Neurospora: Evidence for Nonsense Suppression. Genetics 58: 85-99.
- SEALE, T. - 1970 - Nonallelic Super Suppressors in Neurospora. (Abstract) Genetics 64: 57.
- SOLL, L. & P. BERG - 1969 - Recessive Lethals: a New Class of Nonsense Suppressors in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 63: 392-399.
- STADLER, D. R. - 1967 - Suppressors of Aminoacid Uptake Mutants in Neurospora. Genetics 57: 935-942.
- STEEL, R. G. D. & J. H. TORRIE - 1960 - Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York. 481 pp.
- STRAUSS, B. S. & S. PIEROG - 1954 - Gene Interactions: the Mode of Action of the Suppressor of Acetate - requiring Mutants of Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol. 10: 221-235.
- SUSKIND, S. R. & L. I. KUREK - 1959 - On the Mechanism of Suppressor Gene Regulation of Tryptophan Synthetase Activity in Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 45: 193-196.

- TERRY, K. - 1966 - Suppression of a Neurospora td Mutant that Lacks Cross Reating Material. Genetics 54: 105-114.
- YANOFSKY, C. - 1952 - The Effects of Gene Change on Tryptophan Desmolase Formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 38: 215-226.
- YANOFSKY, C. & D. M. BONNER - 1955.a - Non-allelic Suppressor Gene Affecting a Single td Allele. Genetics 40: 602-603 .
- YANOFSKY, C. & D. M. BONNER - 1955.b - Gene Interaction in Tryptophan Synthetase Formation. Genetics 40: 761-769
- YANOFSKY, C. & P. St. LAWRENCE - 1960 - Gene Action. Ann. Rev. Microbiol. 14: 311-340 .
- YOURNO, J. & S. R. SUSKIND - 1963 - Wild - like - enzyme in a Suppressed Tryptophan Synthetase Mutant of Neurospora. Genetics 48: 917-918.
- YOURNO, J. D. & S. R. SUSKIND - 1964.a - Suppressor Gene Action in the Tryptophan Synthetase System of Neurospora crassa: Genetic Studies. Genetic 50: 803-816 .
- YOURNO, J. D. & S. R. SUSKIND - 1964.b - Wild - like - enzyme in a Suppressed Tryptophan Synthetase System of Neurospora crassa: Biochemical Studies Genetics 50: 817-828.
- WAGNER, R. P., R. P. & H. K. MITCHELL - 1955 - Genetics and Metabolism. John Wiley & Sons, Inc. , New York , 444 pp.
- WARR, J. R. & J. A. ROPER - 1965 - Resistance to Various Inhibitors in Aspergillus nidulans. J. Gen. Microbiol. 40: 273-281.
- WEGLENSKI, P. - 1966 - Genetical Analyses of Proline Mutants and Their Suppressors in Aspergillus nidulans. Genet. Res. , Camb. 8: 311-321.
- WEGLENSKI, P. - 1967 - The Mechanism of Action of Proline Suppressors in Aspergillus nidulans. J. Gen. Microbiol. 47: 77-85.

WESTGAARD, W. - 1958 - The Mechanism of Sex Determination in Dioiceous Flowering Plants. Advances in Genet. 9: 217-281.

WITKIN, E. M. - 1969 - Ultraviolet-induced Mutation and DNA Repair. Ann. Rev. Genetics 3: 525-552 .