

CARACTERIZAÇÃO CITOLÓGICA, GENÉTICA E MOLECULAR DE  
UM MUTANTE PARA CONIDIOGÊNESE EM *Aspergillus nidulans*

CARMEM LUCIA DE MELLO SARTORI CARDOSO DA ROCHA

Bióloga

Orientador: Dr. João Lucio de Azevedo

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura  
“Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de  
concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Março de 1997

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP**

Rocha, Carmem Lucia de Mello Sartori Cardoso da  
Caracterização citológica, genética e molecular de um mutante para  
conidiogênese em *Aspergillus nidulans* / Carmem Lucia de Mello Sartori Cardoso da  
Rocha. - - Piracicaba, 1997.  
202 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.  
Bibliografia.

1. Aspergilo 2. Genética do desenvolvimento I. Título

CDD 575.1  
589.24

A duas grandes mulheres, minha mãe e minha avó Belmira, que me ensinaram a sonhar e a lutar por meus sonhos...

A dois grandes homens, meu pai e meu avô Rubens, cujos exemplos de vida me ensinaram a ter fê no futuro e a acreditar em mim...

A meus amores - meu marido, Jorge e meus filhos, Carmem Lucia, Jorge Henrique, Marcio André e Rodrigo, cujo carinho e alegria têm sustentado minha alma...

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. João Lucio de Azevedo, pela orientação, generosidade e respeito.

À Dra. Elza Áurea Luna Alves Lima, pelo exemplo de trabalho, confiança e orientação.

Ao Dr. Javier Salvador Gamarra, pelo apoio moral e material em todos os momentos.

À Dra. Cassandra Corvello, pelo exemplo de coragem, caráter e sensibilidade, pelo estímulo e apoio em todos os momentos e por ter possibilitado a realização do sequenciamento para conclusão da tese.

Ao Dr. Luiz Coutinho, pela generosa acolhida em seu laboratório para a realização de parte dos experimentos de Biologia Molecular, por acreditar no projeto e pelas sugestões.

Ao Dr. Andrew Simpson, por ter permitido a realização do sequenciamento em seu laboratório no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Cancer e pelo suporte financeiro deste experimento.

À Dra. Aline Pizzirani-Kleiner, pela acolhida no laboratório, apoio e sugestões.

À Dra. Eleidi Alice Chautard Freire-Maia pelo estímulo nos momentos difíceis.

Ao Dr. Newton Freire-Maia, para sempre meu mito, mestre e amigo.

À Dra. Marialba A. Avezum de Castro Prado pelo apoio, incentivo e sugestões preciosas.

Ao colega de curso e de Departamento, Prof. João Alencar Pamphile, pelo entusiasmo, amizade e ajuda inestimável na confecção da tese.

À Margarete Nadalini, grande amiga, pelo ombro amigo, pela acolhida carinhosa e pelo estímulo nos momentos difíceis.

À Dra. Marisa Vieira Queiroz, pelas discussões esclarecedoras e pelas sugestões.

Aos colegas do Departamento de Biologia Celular e Genética da UEM, em especial a Josil dos Santos Gebara e Maria de Fátima Machado, pela força e carinho nos momentos difíceis.

Aos colegas de Curso, especialmente ao Renato, pela amizade e grande ajuda na Microscopia Eletrônica de Varredura, Renata, pela ajuda na bibliografia, Luciana e Chirlei, pela amizade e acolhida, Wellington, Alexandre, André, Rose e Marcelo, pela convivência agradável.

Aos técnicos de laboratório Ricardo, do Instituto Ludwig, Luzia e Sonia, da UEM, José (Zezo) da ESALQ e Zizi, do Instituto de Química da USP, pelas infundáveis placas, pipetas, soluções, meios, etc, sempre prontos e esterilizados para o trabalho poder acontecer.

À Carmem Lucia e Jorge Henrique, meus filhos e colaboradores dedicados na digitação e edição das figuras da tese.

Às secretárias Carmem e Leia e às bibliotecárias Silvana e Elizabeth, pelo apoio em todos os momentos.

Aos professores do Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

A CAPES, pela concessão da bolsa e suporte financeiro da tese.

A ESALQ, este “ponto verde”, onde se pode desenvolver um programa de doutorado, uma tese e uma coleção de cartões postais.

## SUMÁRIO

|   | Página |
|---|--------|
| LISTA DE FIGURAS .....  | xi     |
| LISTA DE TABELAS .....  | xvii   |
| RESUMO .....  | xix    |
| SUMMARY .....   | xxi    |
| <br>  |        |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 01     |
| <br>  |        |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA .....                                  | 04     |
| 2.1. <i>Aspergillus nidulans</i> .....                          | 04     |
| 2.1.1. Um modelo para a Genética .....                          | 04     |
| 2.1.2. Ciclo de vida .....                                      | 05     |
| 2.2. Estudo da diferenciação em <i>A. nidulans</i> .....        | 10     |
| 2.2.1. Metodologias .....                                       | 10     |
| 2.2.1.1. Mutação .....  | 10     |
| 2.2.1.2. Complementação .....                                   | 11     |
| 2.2.1.3. Mapeamento genético .....                              | 11     |
| 2.2.1.4. Citologia .....  | 13     |
| 2.2.1.5. Metodologia molecular .....                            | 14     |
| 2.2.2. Mudanças bioquímicas durante o desenvolvimento .....     | 15     |
| 2.2.3. Fatores ambientais que interferem na diferenciação ..... | 16     |
| 2.2.3.1. Luz .....  | 16     |
| 2.2.3.2. Temperatura .....                                      | 17     |
| 2.2.3.3. Oxigênio .....   | 18     |
| 2.2.3.4. Osmolaridade .....                                     | 19     |
| 2.2.3.5. pH .....   | 19     |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.3.6. Fatores nutricionais.....                                      | 20 |
| 2.2.3.7. Umidade, consistência e espessura do meio .....                | 21 |
| 2.2.4. Determinação genética da diferenciação.....                      | 22 |
| 2.2.5. Análise da conidiogênese com mutantes estágio-específicos .....  | 23 |
| 2.2.5.1. Mutantes de interesse e mutantes ignorados .....               | 23 |
| 2.2.5.2. Genes para o desenvolvimento do conidióforo .....              | 27 |
| 2.3. O gene <i>bristle</i> .....  | 31 |
| 2.3.1. Mutantes <i>bristle</i> .....                                    | 31 |
| 2.3.2. A proteína Brl.....  | 33 |
| 2.3.3. Papel da proteína Brl.....                                       | 34 |
| 2.3.4. Sequências responsivas a Brl .....                               | 35 |
| 2.3.5. A expressão da proteína Brl .....                                | 37 |
| 2.3.6. A transcrição de <i>brl</i> .....                                | 38 |
| 2.3.7. A regulação de <i>brl</i> .....                                  | 42 |
| 2.3.8. A degradação de Brl.....   | 47 |
| 2.3.9. Relação de Brl com outras proteínas .....                        | 48 |
| 2.3.10. Relação de Brl com o ciclo sexual.....                          | 49 |
| <br>  |    |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 51 |
| 3.1. Linhagens .....  | 51 |
| 3.2. Meios de cultura e soluções para análises genéticas .....          | 54 |
| 3.2.1. Meio mínimo .....  | 54 |
| 3.2.2. Meio completo.....   | 55 |
| 3.2.3. Solução de vitaminas .....                                       | 56 |
| 3.2.4. Meio mínimo mais 2% de meio completo .....                       | 56 |
| 3.2.5. Meio galactose.....  | 57 |
| 3.2.6. Meio acetato .....   | 57 |
| 3.2.7. Meios seletivos para análises de segregantes de cruzamentos..... | 58 |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.8. Suplementos para meios seletivos .....                                   | 58 |
| 3.2.9. Meios seletivos para análise mitótica .....                              | 59 |
| 3.2.10. Meios seletivos para análise meiótica.....                              | 60 |
| 3.2.11. Meio com nitrato.....   | 60 |
| 3.2.12. Meio com nitrito .....  | 60 |
| 3.2.13. Meios seletivos para mapeamento intragênico.....                        | 60 |
| 3.2.14. Meio com hipoxantina .....  | 61 |
| 3.2.15. Meio com tartarato de amônia.....                                       | 61 |
| 3.2.16. Meio completo com NaCl .....  | 61 |
| 3.2.17. Meio para produção de cleistotécios.....                                | 62 |
| 3.2.18. Meios para determinação das marcas nutricionais do mutante<br>CLB3..... | 62 |
| 3.2.19. Meios para observação da intensidade de conidiogênese .....             | 63 |
| 3.2.20. Meios para haploidização.....   | 63 |
| 3.2.20.1. Meio completo com Benlate.....  | 63 |
| 3.2.20.2. Meio completo com pFA.....  | 64 |
| 3.2.21. Solução salina .....  | 64 |
| 3.2.22. Solução de Tween 80 .....   | 64 |
| 3.2.23. Solução de Benlate.....   | 64 |
| 3.2.24. Solução de pFA.....   | 65 |
| 3.2.25. Solução de ácidos nucleicos .....                                       | 65 |
| 3.3. Soluções para análise citológicas .....                                    | 66 |
| 3.3.1. Lactofenol-azul algodão.....   | 66 |
| 3.3.2. Fixador para coloração de núcleos .....                                  | 66 |
| 3.3.3. Tampão fosfato .....   | 67 |
| 3.3.4. Solução de Giemsa.....   | 67 |
| 3.3.5. Fixador para microscopia eletrônica de varredura .....                   | 68 |
| 3.3.6. Tampão cacodilato.....   | 68 |

|  |    |
|--|----|
| 3.4. Soluções para metodologia molecular .....   | 69 |
| 3.4.1. Tampão de extração de DNA .....   | 69 |
| 3.4.2. Solução de acetato de potássio .....  | 69 |
| 3.4.3. Clorofane .....   | 70 |
| 3.4.4. Clorofil .....  | 70 |
| 3.4.5. RNase .....   | 70 |
| 3.4.6. Tampão TE .....   | 71 |
| 3.4.7. Enzimas de restrição .....  | 71 |
| 3.4.8. Tampão de amostra para eletroforese de DNA .....                                  | 71 |
| 3.4.9. Tampão TAE .....  | 72 |
| 3.4.10. <i>Primers</i> .....   | 72 |
| 3.4.11. Plasmídio .....  | 73 |
| 3.4.12. Reações de amplificação (PCR) .....  | 73 |
| 3.4.12.1. Reação de amplificação para obtenção do fragmento do gene<br><i>brlA</i> ..... | 73 |
| 3.4.12.2. Reação de amplificação para seleção dos clones transformantes .....            | 74 |
| 3.4.12.3. Reação de amplificação para sequenciamento .....                               | 74 |
| 3.4.13. Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com prata .....                 | 75 |
| 3.4.13.1. Solução de fixação .....   | 75 |
| 3.4.13.2. Solução de prata .....   | 75 |
| 3.4.13.3. Solução de revelação .....   | 75 |
| 3.4.14. Meios de cultura para bactérias .....  | 76 |
| 3.4.14.1. Meio LB .....  | 76 |
| 3.4.14.2. Meio SOC .....   | 76 |
| 3.4.14.3. Meio SOB .....   | 77 |
| 3.4.15. Solução Tris-cálcio .....  | 77 |
| 3.5. Preparação das placas de meio sólido .....  | 77 |
| 3.6. Inoculação e incubação .....  | 78 |

|  |    |
|--|----|
| 3.7. Purificação das linhagens.....                                      | 78 |
| 3.8. Técnicas de análise de crescimento vegetativo e conidiogênese ..... | 79 |
| 3.8.1. Obtenção de colônias monospóricas.....                            | 79 |
| 3.8.2. Cultivo para análise macroscópica .....                           | 79 |
| 3.8.3. Observação ao microscópio estereoscópico.....                     | 80 |
| 3.8.4. Observação ao microscópio ótico.....                              | 81 |
| 3.8.4.1. Observação da colônia já desenvolvida.....                      | 81 |
| 3.8.4.2. Observação das fases do desenvolvimento .....                   | 82 |
| 3.8.5. Estimativa de crescimento radial e peso úmido .....               | 82 |
| 3.8.6. Estimativa de quantidade de conídios.....                         | 82 |
| 3.8.7. Observação da resposta a diferentes condições nutricionais .....  | 83 |
| 3.8.8. Observação da resposta a estabilizador e pH.....                  | 83 |
| 3.8.9. Observação da resposta a temperatura.....                         | 83 |
| 3.8.10. Observação da resposta a carência e oxigênio .....               | 84 |
| 3.8.11. Observação da resposta a luz.....                                | 84 |
| 3.8.12. Análise da conidiogênese em meio com haploidizante .....         | 84 |
| 3.8.13. Análise da resposta a neomicina.....                             | 85 |
| 3.8.14. Técnica de coloração de núcleos.....                             | 85 |
| 3.9. Técnicas de análise genética .....                                  | 86 |
| 3.9.1. Obtenção de heterocário.....                                      | 86 |
| 3.9.2. Obtenção de diplóide .....  | 86 |
| 3.9.3. Haploidização .....   | 87 |
| 3.9.4. Obtenção de cleistotécios.....                                    | 87 |
| 3.9.5. Isolamento de cleistotécios híbridos.....                         | 88 |
| 3.9.6. Análise de complementação em heterocários e diplóides.....        | 88 |
| 3.9.7. Teste de alelismo .....   | 89 |
| 3.9.7.1. Por complementação.....   | 89 |
| 3.9.7.2. Por recombinação .....  | 89 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.9.8. Mapeamento por ciclo parassexual ou análise mitótica .....       | 90  |
| 3.9.9. Mapeamento por ciclo sexual ou análise meiótica.....             | 90  |
| 3.9.10. Mapeamento intragênico .....                                    | 91  |
| 3.9.10.1. Por recombinação.....   | 91  |
| 3.9.10.2. Por conversão gênica.....                                     | 91  |
| 3.10. Microscopia eletrônica de varredura .....                         | 92  |
| 3.11. Técnicas de biologia molecular .....                              | 93  |
| 3.11.1. Extração de DNA.....  | 93  |
| 3.11.2. Amplificação.....   | 94  |
| 3.11.3. Eletroforese de DNA em agarose .....                            | 95  |
| 3.11.4. RFLP .....  | 95  |
| 3.11.5. Clonagem para sequenciamento .....                              | 95  |
| 3.11.5.1. Fosforilação do produto de PCR .....                          | 96  |
| 3.11.5.2. Ligação do fragmento ao vetor .....                           | 96  |
| 3.11.5.3. Obtenção de bactérias competentes.....                        | 96  |
| 3.11.5.4. Congelamento de bactérias competentes.....                    | 97  |
| 3.11.5.5. Transformação .....   | 97  |
| 3.11.5.6. Seleção das bactérias transformantes contendo o inserto ..... | 98  |
| 3.11.5.7. Eletroforese dos produtos de PCR.....                         | 98  |
| 3.11.5.8. Coloração de prata .....                                      | 99  |
| 3.11.6. Sequenciamento.....   | 99  |
| 3.11.6.1. Minipreparação de plasmídios.....                             | 100 |
| 3.11.6.2. Reação de sequenciamento.....                                 | 100 |
| 3.11.6.3. Eletroforese dos produtos de PCR do sequenciamento .....      | 101 |
| 4. RESULTADOS .....   | 102 |
| 4.1. Caracterização do fenótipo do mutante CLB3 .....                   | 102 |
| 4.1.1. Análise macroscópica .....                                       | 102 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.1.2. Análise ao microscópio estereoscópico .....  | 103 |
| 4.1.3. Análise ao microscópio ótico .....   | 103 |
| 4.2. Caracterização do fenótipo do segregante CLY14.....  | 106 |
| 4.2.1. Análise macroscópica .....   | 106 |
| 4.2.2. Análise ao microscópio estereoscópico .....  | 106 |
| 4.2.3. Análise ao microscópio ótico .....   | 107 |
| 4.3. Observação da resposta de CLB3 a diferentes condições nutricionais ....                          | 107 |
| 4.3.1. Análise macroscópica .....   | 107 |
| 4.3.2. Análise ao microscópio estereoscópico .....  | 109 |
| 4.3.3. Análise ao microscópio ótico .....   | 111 |
| 4.3.3.1. Colônias já desenvolvidas .....  | 111 |
| 4.3.3.2. Análise da conidiogênese .....   | 113 |
| 4.3.4. Estimativa de crescimento radial, peso úmido e número de<br>conídios por cm <sup>2</sup> ..... | 115 |
| 4.4. Resposta a estabilizador osmótico e pH .....   | 115 |
| 4.4.1. Análise macroscópica .....   | 115 |
| 4.4.2. Análise ao microscópio estereoscópico .....  | 118 |
| 4.4.3. Análise ao microscópio ótico .....   | 118 |
| 4.4.3.1. Colônias já desenvolvidas .....  | 118 |
| 4.4.3.2. Análise da conidiogênese .....   | 119 |
| 4.4.4. Estimativa de crescimento radial, peso úmido e número de<br>conídios por cm <sup>2</sup> ..... | 119 |
| 4.5. Resposta a temperatura .....   | 122 |
| 4.5.1. Análise macroscópica .....   | 122 |
| 4.5.2. Análise ao microscópio ótico .....   | 124 |
| 4.5.2.1. Colônias já desenvolvidas .....  | 124 |
| 4.5.2.2. Análise da conidiogênese .....   | 124 |
| 4.5.3. Estimativa do crescimento radial, peso úmido e número de                                       |     |

|   |     |
|---|-----|
| conídios por cm <sup>2</sup> .....  | 124 |
| 4.6. Resposta à carência de oxigênio.....   | 126 |
| 4.6.1. Análise macroscópica .....   | 126 |
| 4.6.2. Análise ao microscópio estereoscópico .....  | 126 |
| 4.6.3. Análise ao microscópio ótico .....   | 126 |
| 4.6.4. Estimativa do crescimento radial, peso úmido e número de<br>conídios por cm <sup>2</sup> ..... | 126 |
| 4.7. Resposta à luz.....  | 128 |
| 4.8. Análise da conidiogênese em meio com haploidizante .....   | 129 |
| 4.8.1. Linhagens CLB3, CLY14 e <i>biA1methG1</i> .....  | 129 |
| 4.8.2. Linhagem CLV3 .....  | 129 |
| 4.9. Análise da resposta a neomicina.....   | 131 |
| 4.10. Técnica de coloração de núcleos .....   | 131 |
| 4.11. Microscopia eletrônica de varredura .....   | 131 |
| 4.12. Análises genéticas.....   | 134 |
| 4.12.1. Complementação em heterocários e diplóides .....  | 134 |
| 4.12.2. Teste de alelismo .....   | 135 |
| 4.12.2.1. Por complementação .....  | 135 |
| 4.12.2.2. Por recombinação.....   | 136 |
| 4.12.3. Mapeamento por ciclo parassexual (análise mitótica).....                                      | 136 |
| 4.12.4. Mapeamento por ciclo sexual (análise meiótica) .....  | 139 |
| 4.12.5. Mapeamento intragênico .....  | 139 |
| 4.12.5.1. Por recombinação.....   | 139 |
| 4.12.5.2. Por conversão gênica.....   | 141 |
| 4.13. Metodologia molecular .....   | 144 |
| 4.13.1. RFLP .....  | 144 |
| 4.13.2. Clonagem.....   | 145 |
| 4.13.3. Sequenciamento .....  | 145 |

|                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| 5. DISCUSSÃO GERAL .....            | 150 |
| 6. CONCLUSÕES .....                 | 168 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 169 |

## LISTA DE FIGURAS

|  | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i> .....   | 7      |
| Figura 2. Diferentes tipos de conidióforos encontrados em mutantes<br>para conidiogênese .....   | 29     |
| Figura 3. Diferentes aberrações de conidióforos encontrados em mutantes<br>para o gene <i>brlA</i> em <i>Aspergillus nidulans</i> .....  | 32     |
| Figura 4. Estrutura do gene <i>brlA</i> de <i>Aspergillus nidulans</i> e seus transcritos .....  | 40     |
| Figura 5. Conidióforos da linhagem controle e da linhagem CLB3 .....   | 104    |
| Figura 6. CLB3 crescido em diferentes composições de meio .....  | 108    |
| Figura 7. Resposta de CLB3 a 0,5M NaCl como estabilizador osmótico .....   | 117    |
| Figura 8. Análise da resposta de CLB3 a temperatura .....  | 123    |
| Figura 9. Análise da resposta de CLB3 à carência de oxigênio .....   | 127    |
| Figura 10. Análise de ploidia das linhagens CLB3 e CLV3 antes e<br>depois de tratamento com Benlate .....  | 130    |
| Figura 11. Observação da heterocariose haplóide-diplóide na linhagem<br>CLB3 .....   | 132    |
| Figura 12. Conidióforos de CLB3 e controle em microscopia eletrônica<br>de varredura .....   | 133    |
| Figura 13. Eletroforese dos fragmentos de restrição do produto de PCR<br>para amplificação de parte do gene <i>brlA</i> das linhagens<br>CLB3, <i>biA1methG1</i> e <i>brlA42</i> ..... | 146    |
| Figura 14. Eletroforese dos produtos de PCR das regiões flanqueadoras do<br>sítio de ligação do inserto no vetor pUC18 dos clones<br>transformantes .....                              | 147    |
| Figura 15. Resultado do sequenciamento das regiões portadoras de mutação   |        |

|   |     |
|---|-----|
| no alelo <i>brlA</i> da linhagem CLB3.....  | 148 |
| Figura 16. Comparação entre as sequências do gene <i>brlA</i> do alelo selvagem<br>e do alelo de CLB3, na região onde foram localizadas as<br>mutações, -881 e -71..... | 149 |

## LISTA DE TABELAS

|   | Página |
|---|--------|
| Tabela 1. Crescimento vegetativo e produção de hifas aéreas e conidióforos da linhagem CLB3 em resposta a diferentes composições de meio .....  | 110    |
| Tabela 2. Observação ao microscópio ótico, das estruturas desenvolvidas por CLB3 e controle após 48 horas de crescimento em diferentes condições de meio .....  | 112    |
| Tabela 3. Conidiogênese das linhagens CLB3 e controles em diferentes composições de meios de cultura para observação do possível efeito das combinações nutricionais sobre o relógio da diferenciação dos conidióforos .....  | 114    |
| Tabela 4. Estimativa do crescimento radial e do peso úmido do micélio crescido em meio sólido de diferentes composições.....  | 116    |
| Tabela 5. Conidiogênese das linhagens CLB3 e controles em diferentes condições de osmolaridade e pH para observação do possível efeito de estabilizador osmótico e pH sobre o relógio da diferenciação dos conidióforos ..... | 120    |
| Tabela 6. Estimativa do crescimento radial e do peso úmido do micélio crescido em meio sólido em diferentes condições de osmolaridade e pH .....  | 121    |
| Tabela 7. Estimativa do crescimento radial e do peso úmido do micélio crescido em meio sólido a diferentes temperaturas.....  | 125    |
| Tabela 8. Estimativa do crescimento radial, peso úmido e produção de conídios, das linhagens CLB3 e <i>biA1methG1</i> crescidas em MC sólido, em presença e carência de oxigênio.....   | 128    |
| Tabela 9. Mapeamento mitótico da marca <i>brl</i> pela análise de segregantes   |        |

|  |     |
|--|-----|
| haplóides do diplóide CLB3//MSE .....  | 137 |
| Tabela 10. Mapeamento mitótico da marca <i>suBmethG1 (cys)</i> pela análise dos segregantes haplóides do diplóide CLB3//MSE .....  | 138 |
| Tabela 11. Mapeamento mitótico da marca <i>mel</i> pela análise de segregantes haplóides do diplóide CLB3//MSE.....  | 138 |
| Tabela 12. Mapeamento meiótico da marca <i>brl</i> pela análise dos segregantes do cruzamento CLB3x <i>niaD</i> .....  | 140 |
| Tabela 13. Mapeamento meiótico da marca <i>cys</i> pela análise dos segregantes do cruzamento CLB3xMSE .....   | 140 |
| Tabela 14. Mapeamento intragênico do gene <i>brl</i> , a partir do cruzamento de CLB3 com as linhagens <i>brlA17</i> , <i>brlA39</i> e <i>brlA9</i> , indicando que o novo alelo localiza-se na mesma região que <i>brlA17</i> ..... | 141 |
| Tabela 15. Mapeamento intragênico do gene <i>brl</i> , a partir da análise dos recombinantes que sofreram conversão gênica, resultantes dos cruzamentos de CLB3 com as linhagens <i>brlA17</i> , <i>brlA39</i> e <i>brlA9</i> ....   | 143 |
| Tabela 16. Comparação dos resultados obtidos pela análise de recombinantes entre o alelo de CLB3 e os alelos mapeadores e dos obtidos pela análise da conversão gênica.....  | 144 |

CARACTERIZAÇÃO CITOLÓGICA, GENÉTICA E MOLECULAR DE UM  
MUTANTE PARA CONIDIOGÊNESE EM *Aspergillus nidulans*

Autora: CARMEM LUCIA DE MELLO SARTORI CARDOSO DA ROCHA

Orientador: Dr. JOÃO LUCIO DE AZEVEDO

RESUMO

Com o objetivo de estudar a conidiogênese em *Aspergillus nidulans*, foram obtidos por tratamento com luz ultravioleta, diversos mutantes com esporulação deficiente. Uma destas linhagens, CLB3, mostrou-se particularmente interessante por apresentar conidióforos aberrantes típicos de mutantes *bristle* ou *medusa*.

As análises genéticas demonstraram tratar-se de um novo alelo do gene *bristle* (*brlA*), o mais importante gene regulador na diferenciação do conidióforo. A expressão de *brlA* apresenta uma coordenação temporal-espacial bastante complexa. Para isto são transcritos dois diferentes mRNAs que codificam para a mesma proteína. O primeiro,  $\beta$ , é responsável pelo desenvolvimento do conidióforo até a fase de métula e é regulado a nível de transcrição, processamento e tradução. O segundo,  $\alpha$ , é induzido a nível de transcrição.

A morfologia do conidióforo e o mapeamento intragênico indicavam que a mutação está localizada em região anterior à estrutural, comprometendo a quantidade de produto do transcrito  $\beta$ . O sequenciamento

mostrou uma transição C→T a -24 da origem de transcrição de  $\beta$ , o que deve acarretar diminuição de transcrição deste mRNA.

A análise citológica da conidiogênese de CLB3 em diferentes condições de meio, osmolaridade, luz e temperatura, trouxe duas importantes contribuições para o conhecimento do papel deste gene no estágio inicial do desenvolvimento em *Aspergillus nidulans*:

1. Demonstrou que a deficiência de *brlA $\beta$*  leva à formação de conidióforos secundários, como previa PRADE & TIMBERLAKE, com deficientes construídos por tecnologia do DNA recombinante.
2. Demonstrou que todos os fatores que induzem esporulação não são capazes de suprimir a deficiência de *brlA $\beta$*  e, por isto, não induzem *brlA*, como havia sido sugerido.

CYTOLOGICAL, GENETICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION  
OF A CONIDIATION MUTANT OF *Aspergillus nidulans*

Author: CARMEM LUCIA DE MELLO SARTORI CARDOSO DA ROCHA

Adviser: Dr. JOÃO LUCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

To analyse the conidiogenesis in *Aspergillus nidulans*, some mutants oligosporous were obtained by treatment with UV. One of them, CLB3, was interesting because its aberrant conidiophores, that resembles bristle and medusa mutants.

Genetic approach showed that a new allele of the bristle (*brlA*) gene was responsible for this phenotype. This gene is the most important regulator of conidiophore differentiation. Its expression presents a complex spacial-temporal coordination. For this purpose, there are the transcription of two different mRNAs. Both led to the same protein. First,  $\beta$ , is responsible by early development and is regulated by transcription, splicing and translation. The second mRNA,  $\alpha$ , is induced only at transcription level.

The conidiophore's morphology and intragenic mapping demonstrated that the mutation is upstream the structural region. The consequence is a delayed expression of the transcript  $\beta$  product.

The sequencing showed a transition C→T at -24 of the  $\beta$  transcription initiation site. This damage may be led to decrease of the  $\beta$ mRNA transcription.

Cytological analysis of the CLB3 conidiogenesis at distinct nutrition, osmolarity, light and temperature conditions led two important contributions to the knowledge about *brlA* at early stages of development of the *A. nidulans* conidiophores:

1. The demonstration that the deficiency of *brlA* $\beta$  led to secondary conidiophores development. This results are in concordance with PRADE & TIMBERLAKE (1993) had obtained with deficient strains constructed by molecular approach;
2. The indication that all the factors that induce conidiogenesis don't suppress the deficiency of *brlA* $\beta$ . This means that *brlA* isn't induced by this factors as have been suggested.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 15 anos, o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular vêm permitindo um avanço significativo no conhecimento dos mecanismos de regulação que controlam os fenômenos de proliferação celular, diferenciação e senescência.

O fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*, cuja fisiologia e genética são bem conhecidas, mostrou-se, neste período, um excelente modelo para estudos de genética do desenvolvimento. Embora seja classificado como um eucarioto inferior, é um organismo pluricelular com vários tipos de células e uma morfogênese bem conhecida.

O ciclo de vida compreende 3 fases distintas: a fase vegetativa, que engloba a germinação do esporo e o crescimento das hifas vegetativas, originando o micélio; a fase assexuada ou conidiogênese, que consiste na produção de esporos assexuados designados conídios, a partir de estruturas diferenciadas - os conidióforos; e a fase sexuada ou ascospogênese, que resulta na formação de esporos sexuais - os ascósporos, dentro de corpos de frutificação chamados de cleistotécios.

Ao contrário do que ocorre em outros organismos, a esporulação não é induzida por fatores nutricionais. Embora responda a fatores do ambiente, tais como oxigênio, luz e osmolaridade, este processo é controlado por um grupo

de cerca de 1000 genes, somente para a conidiogênese. Alguns destes genes são exclusivos de cada fase, enquanto outros estabelecem estreita relação entre elas.

Empregando técnicas de análise citológica e metodologia de genética clássica, como obtenção de mutantes, mapeamentos, complementação em heterocários e diplóides e relações de epistasia, o Dr. John Clutterbuck, que trabalha com genética de fungos no Departamento de Genética da Universidade de Glasgow, Escócia, a partir de 1969 deu o impulso inicial para a compreensão do controle genético da conidiogênese em *Aspergillus nidulans*. Vários outros grupos vêm desenvolvendo pesquisas nesta área, aumentando a coleção de mutantes e adaptando novas metodologias, trazendo, nestes últimos 25 anos, uma considerável contribuição para a compreensão deste processo complexo e preciso de regulação espacial e temporal de genes, sem precedentes nos estudos genéticos deste fungo.

O gene *bristle*, (*brlA*) codifica para uma proteína reguladora, responsável por desencadear a cascata de eventos que caracterizam a diferenciação do conidióforo. Atualmente já se conhece muito sobre esta proteína, como a estrutura da sua molécula e os sítios de ligação nos promotores dos genes responsivos a ela. Há também modelos bastante prováveis para explicar a coordenação temporal-espacial da sua expressão. No entanto, existem ainda grandes lacunas na compreensão dos fatores genéticos que regulam a expressão deste gene, bem como das relações de *brl* com genes modificadores e sua possível atuação também no desenvolvimento do ciclo sexual.

O crescente interesse pela regulação do gene *brl*, principalmente no primeiro estágio da conidiogênese que vai da diferenciação da célula-pé até a formação da vesícula e brotamento das métulas, torna relevante a obtenção de mutantes para esta fase.

O objetivo do presente trabalho foi o de caracterizar sob o ponto de vista genético e molecular, um mutante *brl* obtido por tratamento com luz ultravioleta e analisar citologicamente sua conidiogênese em diferentes condições de composição de meio, osmolaridade, luz e temperatura, para oferecer uma contribuição ao conhecimento do papel do gene *bristle* no estágio inicial do desenvolvimento do conidióforo em *Aspergillus nidulans*.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA:**

### **2.1. *Aspergillus nidulans*:**

#### **2.1.1. Um modelo para a Genética:**

Embora HENRARD (1934) tenha tentado desenvolver análises genéticas com *Aspergillus nidulans*, deve-se a PONTECORVO, a introdução deste fungo em estudos de Genética (PONTECORVO et al., 1953). Em 1945 este pesquisador iniciou uma série de estudos com vários microrganismos, buscando aquele que melhor se prestasse a uma "abordagem genética de certos problemas de organização espacial da célula" (PONTECORVO, 1950; 1952a e 1952b). Os primeiros resultados ainda no final da década de 40 por seu grupo (PONTECORVO, 1946; 1947; 1949a; 1949b; 1952c; PONTECORVO et al., 1949; 1953; ROPER, 1950a; 1950b; 1952 e PONTECORVO & ROPER, 1952), prenunciavam a consagração deste microrganismo como modelo para a pesquisa em diversas áreas da Genética (CLUTTERBUCK, 1974; MARTINELLI, 1994 e ROPER, 1994). Atualmente, sua contribuição já é tão grande, que foi comparado à Pedra da Roseta para elucidação da genética do desenvolvimento (MORRIS & ENOS, 1992 e OAKLEY, 1992).

O nome *Aspergillus nidulans* (EIDAM, 1883) significa aspersório de água-benta que faz ninhos. A primeira parte diz respeito às estruturas responsáveis pela produção dos esporos assexuados, que fazem lembrar um pincel e a segunda refere-se aos corpos de frutificação cercados de células de hülle que realmente lembram ninhos (CLUTTERBUCK & TIMBERLAKE, 1992). Curiosamente, este foi um dos organismos mais estudados sob o ponto de vista da Genética durante 25 anos, sem que se atentasse para as estruturas reprodutivas como objetos de estudo.

Este fungo é um ascomiceto que apresenta, como outros eucariotos primitivos, características que favorecem sua manipulação para estudos de Genética, como ciclo de vida curto, haploidia e morfogênese bem definida. No entanto, há três fatores que determinam a importância deste grupo de organismos para a exploração dos intrincados mecanismos de regulação do desenvolvimento: primeiro, a relativa facilidade para a utilização de metodologia molecular; segundo, o fato deste fungo apresentar poucos tipos celulares mas com funções bem diferenciadas e uma morfogênese com sofisticada regulação; terceiro, a possibilidade de indução de sincronismo na conidiogênese, tornando viável, o isolamento e a análise de compostos bioquímicos estágio-específicos (TIMBERLAKE & MARSHALL, 1988 e MILLER, 1990).

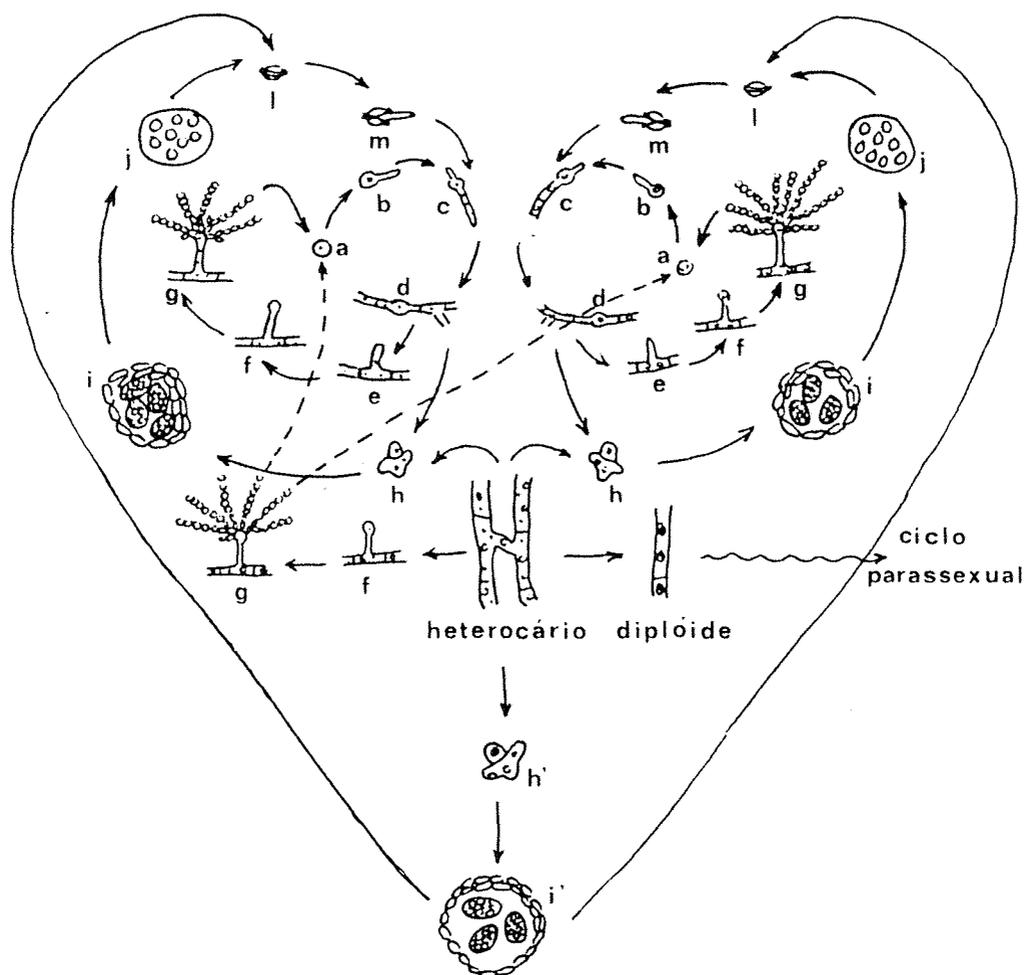
### **2.1.2. Ciclo de Vida:**

*Aspergillus nidulans* é um fungo filamentosso homotático, geralmente haplóide, com 8 cromossomos (SCHWARZ, 1928; HENRARD, 1934 e ELLIOT, 1960). Seu ciclo de vida compreende 3 fases: vegetativa, conidiogênese e ascospogênese, como representa, a Figura 1.

O ciclo vegetativo inicia-se quando um esporo aumenta de volume, seu núcleo entra em mitose e forma-se o tubo germinativo (DANGEARD, 1907 e YUILL, 1950). Esta estrutura apresenta crescimento apical, com mitose dos núcleos mais próximos da ponta e periodicamente, formação de septos. Estes septos delimitam células com 8 a 16 núcleos, embora esta separação seja relativa, pois os septos apresentam poros centrais que permitem passagem de organelas e núcleos entre células (FIDDY & TRINCI, 1976; MORRIS, 1976 e TRINCI & MORRIS, 1979). Após algum crescimento, o esporo emite um segundo tubo germinativo em orientação diametralmente oposta àquela do primeiro e às vezes, um terceiro perpendicularmente a estes dois, sempre no plano horizontal. Em meio sólido, estas hifas crescem e ramificam-se de forma sub apical, originando uma colônia que cresce radialmente (PONTECORVO et al., 1953 e AXELROD, 1972). Nas primeiras 4 horas, o crescimento é geométrico e, a seguir, em proporção aritmética (TRINCI, 1969). Nova redução acontece quando há indução da conidiogênese (ADAMS & TIMBERLAKE, 1990a).

A conidiogênese ou ciclo assexuado consiste na produção de esporos assexuados a partir de estruturas diferenciadas chamadas conidióforos (YUILL, 1950 e PONTECORVO et al., 1953).

Ao contrário do que acontece com *Bacillus subtilis* em que a esporulação é dependente de limitação nutricional, em *Aspergillus*, a diferenciação celular, embora responda a fatores extrínsecos e possa até ser induzida em condições especiais, por carência de alguns nutrientes, é dirigida geneticamente (LOSICK et al., 1989; TIMBERLAKE, 1980 e MILLER, 1990).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* (AZEVEDO & COSTA, 1973 com modificações).

a: conídio; b: tubo germinativo; c, d: micélio; e: haste do conidióforo; f: haste; g: conidióforo; h: núcleos do *crozier*; i: cleistotécio com os ascos; j: asco com 8 ascósporos; l: ascósporo; m: ascósporo germinando; h': núcleos do *crozier* heterocariótico; i': cleistotécio híbrido.

a-b-c-d e l-m-c-d: ciclo vegetativo

d-e-f-g: conidiogênese

d-h-i-j-l-m: ciclo sexual

Os principais fatores ambientais que induzem a conidiogênese são a luz e a exposição ao oxigênio, apesar da inequívoca importância de outros ditos secundários. Embora não se conheça o modo de ação da luz para desencadear tal processo, o mecanismo lembra os fitocromos das plantas superiores, pois pode ser revertido por luz vermelho-distante (MOONEY & YAGER, 1990 e MOONEY et al., 1990). A exposição ao oxigênio é imprescindível, pois o cultivo em meio líquido, via de regra, permite um crescimento apenas vegetativo (SAXENA & SINHA, 1973 e MARTINELLI, 1976). Culturas mantidas nestas condições por 20 horas, quando transferidas para superfície de meio sólido e expostas diretamente ao ar, entram em conidiogênese sincronicamente (TIMBERLAKE, 1980).

Estes fatores, no entanto, só apresentam efeito indutivo após 20 horas de crescimento vegetativo em meio líquido, quando o micélio é dito "competente" (AXELROD, 1972; AXELROD et al., 1973; GEALT E AXELROD, 1974 e CHAMPE et al., 1981).

Após 5 horas da indução de um micélio competente é possível visualizar os conidióforos como hifas que crescem em plano perpendicular à superfície do meio. A primeira estrutura a ser formada é a célula-pé, resultante da diferenciação de uma hifa vegetativa. Desta célula, surge uma ramificação em ângulo reto com o plano de crescimento do micélio vegetativo - a haste - independente de luz ou gravidade. Após atingir uma altura de 100  $\mu\text{m}$ , esta haste sofre uma dilatação na extremidade superior, originando a vesícula, com 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Destas estruturas brotam entre 30 e 60 pequenas vesículas - as métulas que crescem até atingirem 5  $\mu\text{m}$ . Os núcleos da vesícula, aproximadamente 4, sofrem vários ciclos de mitose e os núcleos filhos migram para as métulas. De cada métula surgem, também por brotamento, 2 a 4 fiálides que recebem posteriormente um núcleo resultante do existente na métula de

origem. As fiálides desempenham 2 papéis de suma importância: são as sedes de mitose para a formação dos conídios, que vão brotando um a um, formando cadeias de até 100 conídios; são também responsáveis pela síntese de todas as substâncias envolvidas na maturação dos conídios, como componentes de parede, pigmentos e proteínas armazenadas na fase de dormência (PONTECORVO et al., 1953; CLUTTERBUCK, 1977; TIMBERLAKE, 1980; 1990; MILLER, 1990; CLUTTERBUCK & TIMBERLAKE, 1992 e YAGER, 1992).

A ascosporogênese ou ciclo sexual compreende a formação de esporos - os ascósporos - dentro de corpos de frutificação que recebem o nome de cleistotécios.

Em condições normais de crescimento em meio sólido, os cleistotécios começam a aparecer 5 a 6 dias depois da inoculação com crescimento conflente. O evento mais precoce conhecido na morfogênese do ciclo sexual, é o aparecimento das células de hülle que formam grupamentos ao redor da hifa ascógena, uma ponta de hifa que se dobra como gancho (*crozier*). As células de hülle ou de revestimento são globosas, multinucleadas quando jovens, crescem até atingirem entre 5 e 8 vezes o diâmetro inicial de 25  $\mu\text{m}$  e germinam, envolvendo o primórdio de cleistotécio. Embora de função desconhecida, são produtoras de lacase II, uma fenol-oxidase responsável pela pigmentação do cleistotécio. Com a utilização de substrato cromogênico específico para lacase II, é possível distinguir em uma placa conflente, os pontos que correspondem aos primórdios, antes que os cleistotécios possam ser visualizados ao microscópio ótico (PONTECORVO et al., 1953 e HERMANN et al., 1983).

A diferenciação sexual depende de 2 eventos morfogênicos intimamente relacionados: o desenvolvimento do cleistotécio, que é o corpo de frutificação visível a olho nu e a formação dos ascos, cada qual contendo 8

ascósporos binucleados (PONTECORVO et al., 1953; BENJAMIN, 1955 e YAGER, 1992).

Na hifa ascógena, 2 núcleos haplóides sofrem mitose, seguida de fusão dos 2 núcleos filhos, que entram em meiose. Os 4 núcleos resultantes, dentro de um só compartimento - o asco - sofrem então uma mitose pós-meiótica, originando 8 ascósporos que, após uma mitose sem divisão celular, tornam-se binucleados. Os mesmos 2 núcleos iniciais do *crozier* repetem centenas de vezes todo o processo chegando a 400.000 ascósporos por cleistotécio (BARACHO et al., 1970; BARROS & AZEVEDO, 1989; YAGER, 1992; CHAMPE & SIMON, 1992 e CHAMPE, 1994).

## **2.2. Estudo da diferenciação em *A.nidulans*:**

### **2.2.1. Metodologias:**

#### **2.2.1.1. Mutação**

A obtenção de mutantes deficientes para a diferenciação dos conidióforos foi feita inicialmente por CLUTTERBUCK (1969a), empregando luz ultravioleta, ácido nitroso, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) e dietil sulfato (DES) em tratamento de conídios. A seleção de linhagens aconidiais e oligosporogênicas resultou na coleção que trouxe os primeiros conhecimentos sobre a genética do processo (CLUTTERBUCK, 1969a e MARTINELLI & CLUTTERBUCK, 1971).

BARBATA et al. (1973) e YAGER et al (1982) também obtiveram mutantes aconidiais, dentre os quais, muitos sensíveis a temperatura, cujo estudo

permitiu a compreensão dos primeiros estágios da passagem do ciclo vegetativo para o assexual.

#### **2.2.1.2. Complementação**

Os estudos de complementação foram muito importantes para determinar se novas mutações caracterizavam novos genes ou se eram novos alelos de genes já identificados (TIMBERLAKE & CLUTTERBUCK, 1994). Foi assim que se descobriu que alguns mutantes com conidióforos secundários e/ou cadeias de métulas eram devidos a alelos do gene *brlA* (*bristle*) previamente descrito a partir de mutantes graves com ausência de conidióforos (CLUTTERBUCK, 1969a).

MARTINELLI (1979) também recorreu a análises de complementação em duplos mutantes para diferentes genes, com o objetivo de determinar as relações de epistasia entre eles e, desta forma, propor uma sequência na expressão de tais genes para a diferenciação do conidióforo.

#### **2.2.1.3. Mapeamento genético**

Os métodos de mapeamento genético por ciclo parassexual e por ciclo sexual (PONTECORVO et al., 1953; 1954; 1956; PONTECORVO & KÄFER, 1958; FORBES, 1959; MORPURGO, 1961 e ROPER, 1966) foram empregados para mapear muitos dos mutantes para desenvolvimento (CLUTTERBUCK, 1969a; 1974 e BUTNICK et al., 1984a).

Novas técnicas de mapeamento molecular foram desenvolvidas nos últimos anos, ampliando os recursos para localização de novos genes no genoma de *A. nidulans*. A eletroforese de campo pulsado permitiu a resolução dos

cromossomos. Esta técnica, seguida de um Southern blot com uma sonda do gene de interesse, levou à atribuição correta do cromossomo relativo a cada banda (BRODY & CARBON, 1989 e BRODY et al., 1991). Este método pode resolver o problema do cariótipo de *Aspergillus nidulans*. A designação dos cromossomos de I a VIII seguiu a ordem cronológica de mapeamento dos grupos de genes (PONTECORVO et al, 1953; KÄFER, 1958 e ROPER, 1971). ELLIOTT (1960) classificou os cromossomos de 1 a 8, segundo o tamanho que apresentavam nas preparações citológicas, mas não havia meios de relacionar as duas classificações. Atualmente, graças a estes novos métodos de mapeamento, foi estabelecido que os cromossomos 1, 2 e 3 correspondem a VIII, VII e II, 4 e 5 são o I e V respectivamente, 6 e 7 representam o III e VI que migram juntos e finalmente, o 8, o menor de todo o cariótipo, corresponde ao cromossomo IV (BRODY & CARBON, 1989).

Em 1983, AZEVEDO et al., analisando diversos aspectos em segregantes de cruzamentos, envolvendo genes letais, duplicações e deleções, de forma bastante elegante, foram capazes de antecipar estes resultados, acertando na atribuição de 6 dos 8 cromossomos de *Aspergillus nidulans*.

BRODY et al (1991) desenvolveram uma biblioteca em cosmídios dividida em sub-coleções cromossomo-específicas. Desta maneira, ADAMS et al. (1992) mapearam o gene *acoD* no cromossomo III.

O mapeamento intragênico de mutantes para o gene *brlA* permitiu mapear 31 mutantes, agrupando os alelos em 7 grupos dentro deste locus (CLUTTERBUCK et al., 1992).

#### 2.2.1.4. Citologia

A avaliação macroscópica da presença de esporos, bem como de sua quantidade, foi seguida pela observação ao microscópio ótico, das estruturas que compõem os conidióforos.

ROPER (1952) e PONTECORVO et al. (1953) analisaram citologicamente os conidióforos e conídios de linhagens haplóides e diplóides, bem como seus cleistotécios e ascos. Nestes trabalhos encontramos as primeiras referências às diferenças quanto ao tamanho entre conídios haplóides (3 $\mu$ m) e diplóides (4 $\mu$ m). PONTECORVO et al. (1953) observaram que heterocários resultantes do cruzamento de linhagens com diferentes colorações de conídios apresentam conidióforos com conídios de uma só cor ou com cadeias de ambas as cores.

ELLIOTT (1960) fez um estudo minucioso dos ascos e seus cromossomos, em linhagens haplóides e diplóides. Confirmou, com este trabalho, o número haplóide de 8 cromossomos para *Aspergillus nidulans*, número este que coincide com os 8 grupos de ligação estabelecidos pelas análises genéticas (KÄFER, 1958).

Outros trabalhos empregaram esta metodologia para elucidar o desenvolvimento normal e anômalo de diferentes linhagens deste fungo (ROSENBERGER & KESSEL, 1967; CLUTTERBUCK, 1969b; 1970a; 1970b; MARTINELLI & CLUTTERBUCK, 1971; MARTINELLI, 1979 e MILLER & MILLER, 1992).

O desenvolvimento do conidióforo, em linhagens selvagens e mutantes também foi analisado empregando-se microscopia eletrônica de transmissão, elucidando os detalhes da formação da parede e distribuição das organelas e dos núcleos ao longo da haste, vesícula, métulas e fiáides, o

brotamento e a maturação dos conídios (OLIVER, 1972; MIMS et al, 1988 e SEWALL et al., 1990a).

A microscopia eletrônica de varredura também vem permitindo uma melhor análise das estruturas que compõem o conidióforo, em diferentes linhagens (BOYLAN et al, 1987; MIMS et al, 1988 e PRADE & TIMBERLAKE, 1993).

#### **2.2.1.4. Metodologia molecular**

ZIMMERMANN et al. (1980) e JOHNSTONE (1985) clonaram e sequenciaram alguns genes para o desenvolvimento. A partir desta época, muitos outros trabalhos envolvendo tecnologia do DNA recombinante vêm sendo aplicadas nesta área.

Uma grande variedade de sistemas foram desenvolvidos para transformação em *Aspergillus nidulans* (RAMBOSEK & LEACH, 1987; TIMBERLAKE & MARSHALL, 1988; TIMBERLAKE, 1991c e TURNER, 1994). Foram aperfeiçoados vetores específicos para integração homóloga, facilitando a utilização de estratégias de substituição de fragmentos de DNA ao longo dos genes, bem como os experimentos de inativação gênica por inserção de sequências exógenas, interrompendo o gene (YELTON et al., 1984; 1985; BOYLAN et al., 1987; MAYORGA & TIMBERLAKE, 1990 e GEMS et al., 1991).

Transformação com construções contendo a região estrutural de genes "repórter" sob o controle da região promotora dos genes para desenvolvimento têm sido muito importantes para a elucidação dos complexos mecanismos de regulação em cascata que determinam a diferenciação dos conidióforos (AGUIRRE et al., 1990; AGUIRRE, 1993 e CHANG &

TIMBERLAKE, 1992). A construção de vetores contendo a parte estrutural dos genes para desenvolvimento sob o controle de promotores induzíveis permitiram o estudo do papel de cada produto gênico na sequência de eventos morfogênicos (ADAMS et al., 1988; MIRABITO et al., 1989 e MARSHALL & TIMBERLAKE, 1991).

### **2.2.2. Mudanças bioquímicas durante o desenvolvimento**

Muitos autores analisaram possíveis mudanças metabólicas que pudessem ser responsabilizadas por determinar a opção da colônia pelo início do ciclo assexuado.

CLUTTERBUCK (1975) observou em *Aspergillus nidulans* que, durante a germinação, adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) está presente no micélio em alta concentração e vai progressivamente diminuindo até 20 horas após a germinação, atingindo níveis baixos que se mantêm constantes. Como este tempo coincide com o estabelecimento da competência, ele fez diversos ensaios mas não conseguiu demonstrar um possível papel dos níveis de cAMP no processo.

A concentração de ferro (HALL & AXELROD, 1977 e 1978), a inducibilidade de nitrato redutase e protease extracelular (GEALT & AXELROD, 1974), capacidade de incorporar glicose (KURTZ & CHAMPE, 1979) e frutose (KURTZ, 1980) foram avaliados com resultados semelhantes.

Entretanto, os resultados de SOM & KOLAPARTI (1994) demonstraram que a proteína Aras (*Aspergillus Ras*), homóloga a H-Ras de mamíferos, é expressa em todas as células durante toda a vida do fungo e os níveis da forma ativa que se liga a GTP determinam o desenvolvimento de cada

fase. Na germinação do esporo, por exemplo, os níveis são altos, na fase vegetativa, são intermediários e, a partir da diferenciação da célula-pé, são baixos. Se a quantidade da forma ativa for mantida baixa durante todo o crescimento vegetativo, todos os passos da conidiogênese são desenvolvidos precocemente.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, a proteína Ras controla, de diversas formas, o desenvolvimento (JUNG et al, 1995). Em presença de grande quantidade de glicose, aumenta os níveis de cAMP e retarda a divisão celular (TOKIWA et al, 1994). Em carência de nitrogênio, induz o brotamento unipolar, resultando na forma pseudomicelial (GIMENO et al, 1992). É possível que, em *Aspergillus nidulans*, o papel da proteína Aras também tenha relações com estados nutricionais e metabólicos da colônia.

### **2.2.3. Fatores ambientais que interferem na diferenciação**

#### **2.2.3.1. Luz**

A grande maioria das linhagens mantidas em laboratório são mutantes para o gene *veA1* e por este motivo, não respondem à luz. No entanto, linhagens selvagens de *A.nidulans* são induzidas a esporular em presença de luz e, em ausência de luz, produzem apenas hifas aéreas (KÄFER, 1965 e MOONEY & YAGER, 1990). A ausência de luz, além de inibir a conidiogênese nestas linhagens, induz o ciclo sexual.

Embora muito pouco seja conhecido sobre os mecanismos que levam a luz a induzir a conidiogênese, os estudos com linhagens supressoras de *velvet* evidenciaram uma complexidade que envolve pelo menos quatro genes,

cujos produtos interagem com o do gene *veA* (MOONEY et al., 1990). A luz vermelha é a responsável pela indução luminosa, embora a luz branca leve aos mesmos resultados, desde que seja mantida a intensidade de  $10\text{W}/\text{m}^2$  e o tempo de exposição entre 15 e 30 minutos. O período crítico em que a exposição à luz permite a conidiogênese nas linhagens *ve*<sup>+</sup> inicia-se concomitantemente com a indução e se prolonga por 6 horas. Esta especificidade pela luz vermelha assemelha-se à resposta à luz mediada pelos fitocromos, nas plantas. Curiosamente, GRIFFITH et al. (1994) encontraram homologia entre a sequência N-terminal da proteína Brl e a do domínio responsável pela fotorrecepção de vários fitocromos de plantas.

### 2.2.3.2. Temperatura

*Aspergillus nidulans* é capaz de crescer dentro de um grande espectro de temperaturas. Segundo EIDAM (1883), a temperatura ótima está em torno dos 40° C. PONTECORVO et al. (1953) recomendou 36° a 37° C, o que é seguido até hoje, na maioria dos laboratórios.

A temperatura é um fator importante para conidiogênese, visto que em cultura submersa, a indução da formação de conidióforos pode ser induzida por *heat shock* (MARTINELLI, 1976).

Foram descritos muitos mutantes sensíveis a temperatura, sensibilidade esta, relacionada a diferentes fases do desenvolvimento (YAGER et al., 1982). Em geral, nestes casos, a temperatura permissiva era mais baixa (entre 20° e 25° C) que a usual (37° C).

Mutantes *bristle* intermediários apresentam uma melhora no fenótipo, quando a temperatura de incubação é de 22°C ou de 25°C

(CLUTTERBUCK, 1969a). Os mutantes *medusa*, no entanto, respondem de forma diferente, mostrando um fenótipo mais grave a 22° C.

A temperatura parece ser um fator muito importante também para o início do ciclo sexual, pois supressores para o gene *velvet*, que retomam a capacidade de optar pelo ciclo assexual ou sexual independentemente de luz, não produzem cleistotécios a 40° C.

### 2.2.3.3. Oxigênio

A exposição ao oxigênio de superfície é um importante fator indutor da conidiogênese (MORTON, 1961; AXELROD, 1973 e TIMBERLAKE, 1980). Micélio crescido em meio líquido por 20 horas, quando transferido para a superfície de meio sólido, entra sincronicamente em diferenciação (AXELROD, 1972; LAW & TIMBERLAKE, 1980 e YAGER et al., 1982). É possível que este efeito seja mediado pelo produto do gene *fluD*, que é homólogo ao protooncogene *myb* (WIESER & ADAMS, 1995). A proteína Myb responde a mudanças de estado redox, aumentando sua afinidade ao DNA, passando a induzir os genes responsivos a ela, em presença de oxigênio (GUEHMANN et al., 1992).

Também é conhecido que, em condição de carência de oxigênio provocada pela vedação da placa de Petri com fita celulósica, há indução do ciclo sexual, em detrimento do ciclo assexual (CLUTTERBUCK, 1974).

#### 2.2.3.4. Osmolaridade

O aumento de potencial osmótico obtido por 0,5M de NaCl ou de outros estabilizadores osmóticos, é capaz de favorecer a conidiogênese de mutantes oligosporogênicos (CLUTTERBUCK, 1969a e MOLINA, 1993). Segundo alguns autores, o efeito deve ser consequência do aumento de afinidade entre proteínas reguladoras e o DNA (CLUTTERBUCK, 1970b).

No entanto, a adição de estabilizador osmótico favoreceu o crescimento vegetativo e a conidiogênese em linhagens normais de *Aspergillus nidulans* (GRIFFIN, 1981). Esta resposta é mediada pelo aumento da quantidade interna de glicerol, o mais importante osmorregulador para os ascomicetos (HOCKING & NORTON, 1983 e BEEVER & LARACY, 1986).

LEE & ADAMS (1995) observaram que linhagens selvagens cultivadas em meio líquido, quando transferidas para meio de mesma composição mas acrescido de 0,8M de NaCl, produziram conidióforos. Os autores sugeriram que o aumento de osmolaridade suprimiu a necessidade de ar para indução à conidiogênese. É possível, por outro lado, que esta condição permita um aumento da assimilação do oxigênio dissolvido no meio para que ocorra a indução.

#### 2.2.3.5. pH

*Aspergillus nidulans* é capaz de viver em pH de 3,5 a 9,0. Os meios de cultura são feitos com pH entre 6,0 e 6,8. CLUTTERBUCK (1969a; 1970) e CLUTTERBUCK & SPATHAS (1984), analisando a ação de fatores ambientais sobre a conidiogênese de um mutante para conidiogênese, relataram que o pH abaixo de 7,0 potencializava o efeito benéfico da alta osmolaridade, enquanto valores superiores a 7,0, apresentavam efeito contrário. MOLINA (1993)

observou resultados semelhantes, quando obteve maior esporulação em presença de estabilizador osmótico e tampão fosfato pH igual a 5,8 do que apenas com estabilizador osmótico. A primeira explicação para este fato é que a faixa de pH ácido, como a temperatura baixa (20°C) deve ser a condição ótima para a atividade de enzimas envolvidas na diferenciação. No entanto, há a possibilidade de que os pHs mais baixos induzam a expressão de genes para desenvolvimento, como ocorre com o da fosfatase ácida (CADDICK et al., 1986; DORN, 1965a;b e ARST, 1994).

#### **2.2.3.6. Fatores nutricionais**

As primeiras evidências da relação entre fatores nutricionais e conidiogênese vieram indiretamente, da observação de que, em um meio pobre em nitrato e com alta concentração de glicose, ocorria a indução do ciclo sexual, em detrimento do ciclo assexual (PONTECORVO et al., 1953). KASATKINA (1961) observou a diminuição da esporulação e a presença de conidióforos aberrantes, em preparações citológicas de mutantes auxotróficos crescidos em meios inadequadamente suplementados.

Linhagens deficientes para a síntese de arginina precisam de uma concentração maior deste aminoácido para esporular do que para crescer vegetativamente, permanecendo contudo incapazes de produzir cleistotécios autofecundados (SERLUPI-CRESCENZI et al., 1983). Mutantes auxotróficos para triptofano apresentam bloqueio do ciclo assexual e sexual, independente da concentração deste requerimento no meio de cultura (BAINBRIDGE, 1974; KÄFER, 1977 e YELTON et al., 1983). O mesmo ocorre com N-acetilglucosamina (BORGIA, 1992). Estes resultados podem ser explicados por MARTINELLI & CLUTTERBUCK (1971), que calcularam que mais de 80%

dos mutantes deficientes para conidiogênese, apresentam de fato, um bloqueio no crescimento vegetativo ou em funções metabólicas essenciais para “suporte” da diferenciação.

Por outro lado, carência de fonte de nitrogênio ou de carbono é capaz de induzir o desenvolvimento de conidióforos em linhagens mantidas em meio líquido (MORTON, 1961; SAXENA & SINHA, 1973; MARTINELLI, 1976; SKROMNE et al., 1995 e LEE & ADAMS, 1995). Este tipo de indução evidenciou que alguns genes são importantes para o desenvolvimento programado geneticamente, programa este que pode ser suprimido pela carência de nitrogênio ou carbono.

#### **2.2.3.7. Umidade, consistência e espessura do meio sólido**

CLUTTERBUCK & SPATHAS (1984) observaram que o meio de cultura, após algum tempo de desidratação, favorecia a esporulação. À primeira vista, o fator envolvido parecia ser a umidade. No entanto, estudos posteriores, em que as placas eram mantidas em atmosfera saturada com água, não mostraram nenhum efeito sobre a intensidade de esporulação (TIMBERLAKE & HAMER, 1986). Por outro lado, o crescimento do fungo em meio com diferentes concentrações de ágar, mostraram que a maior consistência está associada à maior produção de esporos (SCAZZUCHIO, comunicação pessoal). Estes resultados indicam que o efeito da dissecação das placas devem ocorrer em função do aumento da consistência. A espessura do meio apresenta uma relação inversamente proporcional à intensidade de conidiogênese, embora menos acentuada que o efeito da consistência (CLUTTERBUCK & SPATHAS, 1984).

#### 2.2.4. Determinação genética da diferenciação:

CLUTTERBUCK (1969a) e MARTINELLI & CLUTTERBUCK (1971) foram os primeiros a descrever e estudar mutantes para o desenvolvimento em *Aspergillus nidulans*.

CLUTTERBUCK (1977) propôs uma classificação dos genes importantes para a diferenciação do conidióforo em 4 grupos: o primeiro inclui os genes envolvidos no crescimento e desenvolvimento vegetativo, portanto, os genes ditos "de suporte"; o segundo grupo, de genes "estratégicos", abrange os responsáveis pela decisão de partir do ciclo vegetativo para o assexual ou sexual; o terceiro, dos genes "táticos", reúne os genes reguladores da conidiogênese, bem como os que codificam para todas as funções essenciais para a diferenciação de cada tipo celular que compõe o conidióforo; o quarto grupo engloba os genes "auxiliares" cuja função é dar acabamento aos processos de diferenciação, como pigmentos do conidióforo e dos conídios, substâncias adicionais a serem estocadas nos conídios e componentes de parede dos conídios maduros.

Muito poucos genes para ciclo sexual são conhecidos. Alguns deles, como coloração de ascósporos (APIRION, 1963), alta produção de cleistotécios, assim como sua deficiência (HOUGHTON, 1970; 1971; ZONNEVELD, 1972; 1974 e 1977) e tubulina B, responsável em parte, pela mobilização dos cromossomos na meiose (KIRK & MORRIS, 1991) foram descritos e mapeados. Vários genes para diferentes fases da conidiogênese parecem estar também envolvidos na diferenciação sexual, como *bristle*, *medusa*, *stuted*, *velvet* (CLUTTERBUCK, 1974; JURGENSON & CHAMPE, 1990 e TIMBERLAKE & CLUTTERBUCK, 1994).

Há duas estimativas do número de genes para a conidiogênese em *Aspergillus nidulans*. Na primeira, MARTINELLI & CLUTTERBUCK (1971)

analisaram frequências de mutação, comparando taxa de mutação para *loci* envolvidos na conidiogênese e outros *loci* conhecidos. Estimaram desta forma, entre 300 e 1000 genes, responsáveis pela diferenciação dos conidióforos. Descontando os que, embora afetando a conidiogênese são responsáveis também por funções básicas no micélio vegetativo, que chegam a 85% deste número, o total cai para 45 a 150 genes. Na segunda, empregando hibridização mRNA/cDNA e analisando separadamente micélio vegetativo, colônias em esporulação e colônias com conídios maduros, TIMBERLAKE (1980) concluiu que o micélio vegetativo contém cerca de 6000 mRNAs diferentes, o micélio em conidiogênese, outros 1000 e os esporos maduros, em torno de 200. Esta grande diferença de resultados, certamente, é devida à introdução de erros de amostragem, tanto em uma quanto em outra abordagem. De qualquer maneira, estes números são uma indicação da complexidade do processo de diferenciação mesmo em se tratando de um organismo simples como um eucarioto inferior.

### **2.2.5. Análise da conidiogênese com mutantes estágio-específicos.**

#### **2.2.5.1. Mutantes de interesse e mutantes ignorados:**

CLUTTERBUCK (1969a) obteve uma coleção de mutantes, por indução com ultravioleta e diferentes agentes químicos. O primeiro critério para a sua seleção foi o de descartar qualquer mutante que tivesse algum comprometimento no ciclo vegetativo, para não incorrer no erro de considerar um gene responsável por algum papel na conidiogênese, quando na verdade seu produto interfere no processo, mas na condição de gene de "suporte". Este critério eliminou cerca de 83% da coleção inicial. O segundo critério foi separar

para futuras análises, os mutantes com bloqueio anterior ao início do desenvolvimento do conidióforo. Este grupo inclui os mutantes para competência, os mutantes *fluffy* e os que optam pelo desenvolvimento sexual, como *dcl* (*dense cleistothecial*) e supressores de *veA* (*velvet*). Esta fase do desenvolvimento é muito complexa e foi necessário um intenso trabalho para que as partes do processo comesçassem a se encaixar e oferecer alguma contribuição ao processo.

A competência, por exemplo, envolve muitos genes e muitas vias metabólicas. A decisão pelo início da conidiogênese não depende apenas de uma cascata de sinalização entre genes reguladores e morfogenéticos. É necessária a mudança de algumas vias metabólicas, bem como de algumas funções, como por exemplo, síntese de parede. De fato foram observadas modificações no padrão de transporte de nutrientes e de taxa de crescimento micelial após a indução (KURTZ & CHAMPE, 1979 e ADAMS & TIMBERLAKE, 1990a).

Foram descritos 5 genes envolvidos na competência (AXELROD et al., 1973; GEALT & AXELROD, 1974; CHAMPE et al., 1981; YAGER, 1982; BAGGA, 1989 e LEE & ADAMS, 1994). Receberam a designação *aco* (de aconidial). Mutantes *aco A*, *B*, *C* foram analisados por BUTNICK e colaboradores (1984a; b). Todos eles acumulam um grupo de compostos fenólicos, um dos quais é uma substância antibacteriana chamada diorcinol. Outras, de grande importância, são hormônios chamados fatores Psi (*precocious sexual induction*). Psi A estimula conidiogênese, Psi C inibe conidiogênese e estimula ciclo sexual. O fato de serem interconvertíveis *in vitro* leva à proposição de que há síntese de Psi A e, com o tempo de crescimento da colônia e conversão deste a Psi C, a conidiogênese passa a ser inibida e há opção pelo ciclo sexual. O mutante *aco D* ou *flu G* obtido por YAGER (1982) mostrou, em estudos posteriores que sua incapacidade para entrar em conidiogênese pode ser superada

em condições de carência nutricional ou pela proximidade com uma colônia selvagem para este gene (ADAMS *et al*, 1992 e LEE & ADAMS, 1994a).

Outro grupo de mutantes que estão intimamente relacionados com esta fase e portanto devem ser lembrados quando são analisados os primeiros estágios da conidiogênese, são os *velvet* e os *fluffy*. *Velvet* significa veludo. Esta é a denominação de um fenótipo apresentado por linhagens selvagens incubadas em ausência de luz. Há grande produção de hifas aéreas com pequeno número de conidióforos (KÄFER & CHEN, 1964 e KÄFER, 1965). Em presença de luz, mais especificamente, a luz vermelha, os selvagens *ve*<sup>+</sup> esporulam abundantemente e não apresentam o grande número de hifas aéreas que confere o aspecto aveludado. A indução pode ser revertida por exposição à luz "vermelho-distante". Este comportamento lembra a resposta mediada por fitocromos de plantas (MOONEY & YAGER, 1990).

A maioria das linhagens de laboratório são *veA1*, esporulando em ausência de luz. Supressores para esta mutação, no entanto, apresentam sensibilidade à temperatura, não produzindo cleistotécios a 40°C. Outras características mostram uma estreita e complexa interação entre algumas mutações *aco*, gene *ve*<sup>-</sup>, *veA1* e seus supressores, além de apontar para uma relação entre ciclo assexual e sexual nesta fase inicial de diferenciação para esporulação (MOONEY *et al*, 1990).

Os mutantes *fluffy* formam uma grande massa de hifas aéreas, dando um aspecto cotonoso à colônia. Alguns apresentam alguma conidiogênese. Descritos inicialmente por ROPER (1958), foram denominados mutantes de crescimento micelial. ROPER (1958) concluiu que este fenótipo era resultante da interação entre fatores citoplasmáticos e nucleares. KWIATOWSKI & BOHDANOWICZ (1962) e BALL & AZEVEDO (1964), estudando outros mutantes, demonstraram que este fenótipo era devido a um gene mapeado no

cromossomo VII. Outros genes *fluffy* foram descritos por DORN *et al*, 1967; 1970). Há três características sobre estes mutantes que são muito intrigantes: primeiro, aparecem com frequência como setores espontâneos em linhagens deficientes para conidiogênese (GEMS & CLUTTERBUCK, 1994); segundo, surgem espontaneamente principalmente em culturas velhas; terceiro, uma vez presentes, crescem demasiadamente e não respeitam o limite das colônias vizinhas, crescendo sobre elas. Este último aspecto tornou-se inclusive um sério risco para os estoques pois a repurificação é muito difícil (DORN, 1970). Foram descritos 8 diferentes genes, 5 dos quais foram mapeados no cromossomo VIII. TAMAME *et al*. (1983) obteve 20% de indução de *fluF* por tratamento com 5-azacitidina, uma droga inibidora de metilação de DNA, indicando pela primeira vez em *Aspergillus nidulans*, a regulação de um gene por metilação. Esta condição foi corroborada pela detecção de 5-metilcitosina neste fungo (TAMAME & SANTOS, 1989).

Outra grande contribuição que os mutantes *flu* trouxeram ao estudo da conidiogênese foi a demonstração por CLUTTERBUCK (1970a) de que, ao crescer sob celofane, que inibe o crescimento de hifas aéreas, as colônias *fluffy* deixavam de ser invasivas. A consequência desta afirmação foi a conclusão de que a classificação inicial destes mutantes entre os que não produzem mais do que hifas vegetativas estava incorreta, uma vez que estes genes atuam após o estabelecimento da competência, já em fase de diferenciação.

Recentemente, foram descritos vários genes que foram chamados *flb* (*fluffy low bristle expression*), que resultam em um bloqueio no passo imediatamente anterior ao início da expressão de *brlA*, confirmando a afirmação de CLUTTERBUCK (1970a) de que o micélio aéreo abundante nestes mutantes é formado por hifas aéreas e não por micélio vegetativo (ADAMS *et al*, 1992;

WIESER et al., 1994; LEE & ADAMS, 1994a; 1994b e WIESER & ADAMS, 1995).

#### **2.2.5.2. Genes para o desenvolvimento do conidióforo:**

Quando CLUTTERBUCK (1969a) obteve e analisou a primeira coleção de mutantes para conidiogênese, apresentou os resultados classificando-os em 4 grupos:

1) Mutantes com conídios modificados: neste grupo, ficaram os variantes para coloração de conídios já descritos (DORN, 1967). Acrescentou também dois outros que, além da coloração eram afetados, de alguma maneira, na estrutura dos conídios: *wet-white* (*wet*) e *dark* (*drk*). O primeiro apresenta conídios brancos, aparentemente normais, mas que apresentam autólise poucos dias depois de maduros. Os conídios *dark* são mais escuros que a coloração normal e, segundo observações de OLIVER (1972) por microscopia eletrônica, a camada mais externa da parede do conídio, não envolve apenas um conídio, mas forma um saco que engloba uma cadeia de conídios.

2) Mutantes com modificações de conidióforo ou esterigmas: nesta classe ficaram os mutantes *stunted* (*stu*) e *medusa* (*med*). *stu* origina conidióforos encurtados com conídios brotando diretamente da vesícula, sem a formação de métulas e fiálides. *med* apresenta conidióforos de tamanho normal, mas com cadeias de métulas e, ocasionalmente, métulas que se transformam em

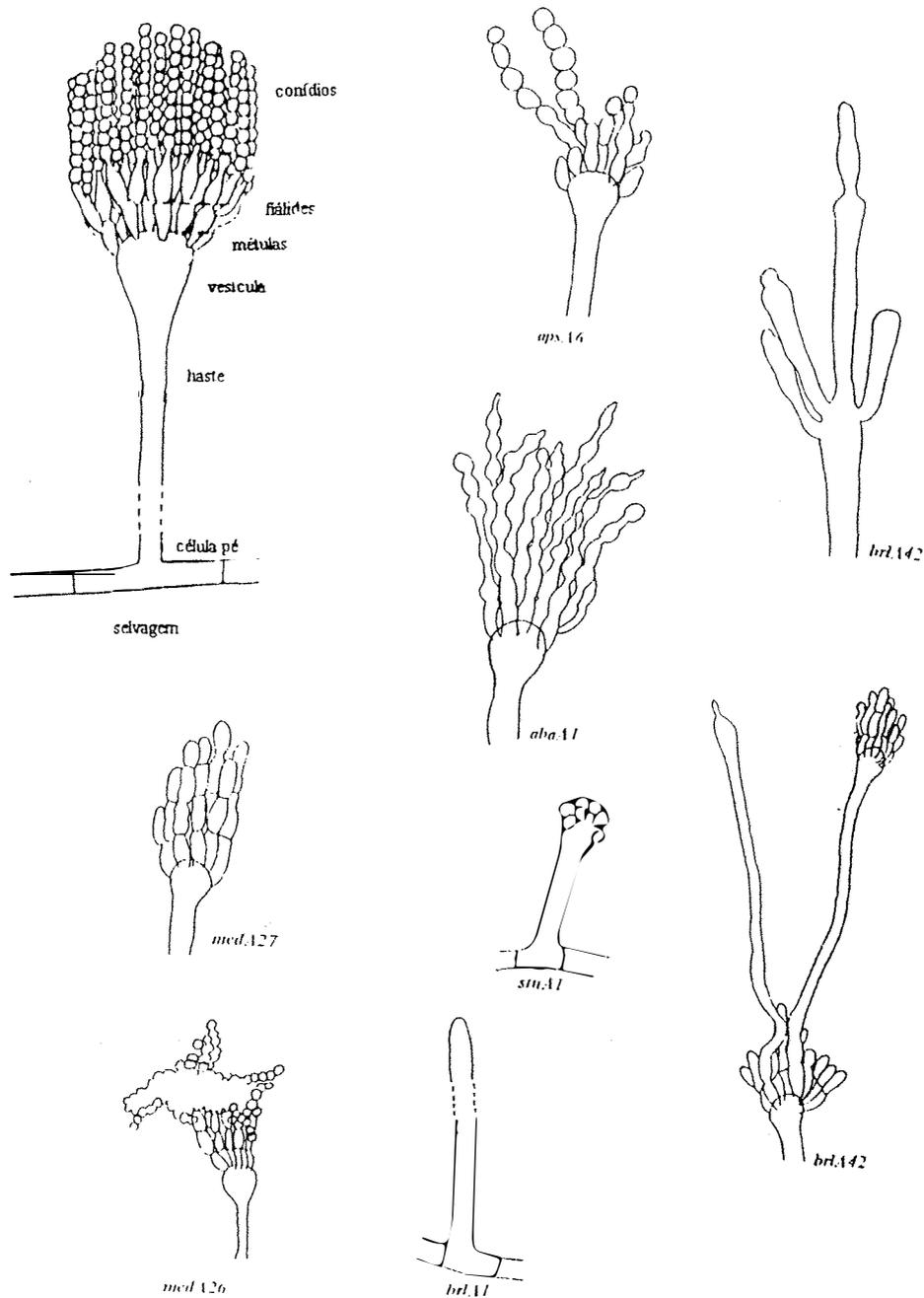
hastes de novos conidióforos. Ambos os mutantes são incapazes de produzir cleistotécios autofecundados.

3) Mutantes aconidiais: com esta designação foram classificados os mutantes *abacus* (*aba*) que apresentavam conidióforos com estruturas que lembram abaco, em lugar das fiálides e conídios. A análise ultraestrutural destes mutantes indica que estas estruturas são intermediários entre métulas e fiálides (SEWALL et al., 1990b). Os mutantes *bristle* (*brl*) foram incluídos neste grupo porque algumas linhagens desenvolvem apenas hastes dos conidióforos que se alongam até 2-3mm e não desenvolvem vesícula, nem qualquer estrutura subsequente na diferenciação do conidióforo. No entanto, muitos outros mutantes brandos para este gene desenvolvem conidióforos aberrantes, com cadeias de esterigmas ou com métulas que se desdiferenciam e originam novos conidióforos, a partir da vesícula. Os conídios podem ser formados em maior ou menor quantidade, de acordo com o nível de comprometimento dos conidióforos.

4) Mutantes para pigmentação dos conidióforos: os mutantes *ivory* (*ivo*), independente da coloração dos conídios, apresentavam conidióforos sem a pigmentação marrom característica. Este fenótipo mostrou também uma interessante relação com a mutação *brl*, uma vez que os *brl* graves eram também *ivo*, embora não fossem genes ligados (CLUTTERBUCK, 1969a; 1990).

A Figura 2 representa os conidióforos aberrantes que caracterizam alguns destes mutantes.

A análise das aberrações características de cada subgrupo de mutantes já sugeria que o produto do gene *brl* deve estar relacionado com a fase



**Figura 2.** Diferentes tipos de conidióforos encontrados em mutantes para conidiogênese. A: conidióforo normal; B: alelo *aps16*; C e G: alelo *brlA42*; D: alelo *abaA1*; E: alelo *medA27*; F: alelo *stuA1*; H: alelo *medA26*; I: alelo *brlA1* (MARTINELLI, 1979).

da diferenciação da vesícula e das métulas, o produto do gene *aba* responde pela transição de métula para fiálide e *wet* deve ser gene controlador da formação ou pelo menos, da maturação dos conídios. *med* parece imbricar com *brl*, e *stu*, curiosamente afeta o comprimento do conidióforo, antecipando a diferenciação da vesícula e suprimindo a formação dos esterigmas (métulas e fiálides).

Empregando metodologia clássica, CLUTTERBUCK (1969a) determinou que os 36 mutantes *brl* são alelos e mapeiam no cromossomo VIII, 40 *aba* também estão no mesmo locus, no cromossomo VIII, não ligado ao *brl*, os 3 *stu* e os 30 *med* mapeiam igualmente em loci únicos não ligados, no cromossomo I, como os 6 *wet* e os 3 *dark*, no cromossomo VII. Por outro lado os 118 *ivo* foram distribuídos em dois loci: *ivo A* no cromossomo III e *ivo B*, no cromossomo VIII.

Para confirmar a ordem de ação dos genes durante o desenvolvimento, MARTINELLI (1979) desenvolveu um exaustivo programa de análise de grande parte dos mutantes obtidos por CLUTTERBUCK (1969), além dos mutantes *aps* (*anucleate primary sterigmata*) que apresentam algumas métulas sem núcleo e, as que recebem núcleo desenvolvem fiálide e cadeia de conídios, originando assim conidióforos aberrantes, CLUTTERBUCK (1974; 1977). Um outro tipo de mutantes para migração de núcleos foi descrito por PIZZIRANI-KLEINER & AZEVEDO (1986 a e b). O gene *bcn*, mapeado no cromossomo IV, resulta na formação de conídios binucleados, a partir de conidióforos morfológicamente normais. PASCON (1994) descreveu a conidiogênese deste mutante, demonstrando que os conidióforos apresentavam um desenvolvimento aparentemente normal, mas ao microscópio, com coloração de núcleos, é possível visualizar aberrações na migração dos núcleos.

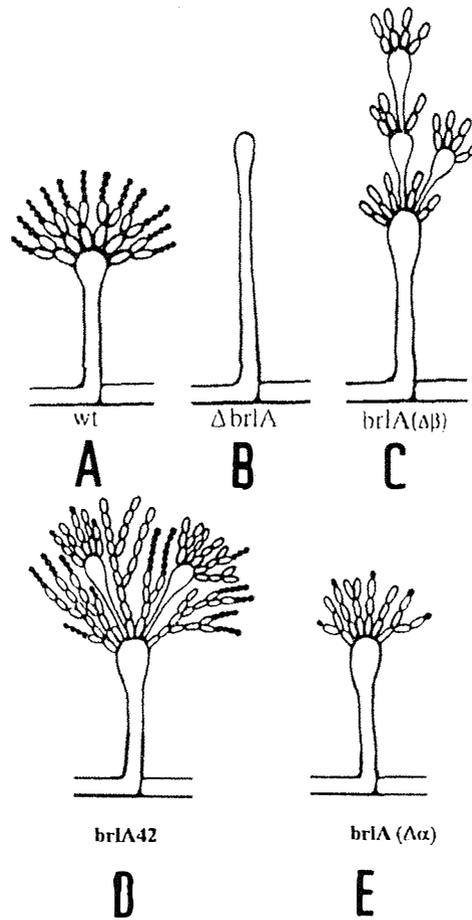
Partindo da observação de que duplos mutantes para diferentes genes de uma via metabólica são capazes de dar informação acerca da relação de

epistasia entre eles, COOTE & MANDELSTAN (1973) empregaram o mesmo tipo de trabalho para mapear a ação de genes envolvidos na formação do esporo de *Bacillus subtilis*. Esta foi a estratégia de MARTINELLI (1979), ao analisar duplos mutantes entre os diferentes genes para a conidiogênese de *Aspergillus nidulans*, com diversas combinações de alelos. Os resultados indicaram que a ordem de expressão dos genes é *brl-aps-aba-wet. stu* e *med*, no entanto, mostraram expressão concomitante com *brl*, com relações de interpretação mais complexa. MARTINELLI concluiu que *brl*, *aba* e *wet* são responsáveis pela morfogênese do conidióforo, já que a ausência de qualquer um leva à ausência de conídios. Os genes *stu* e *med* participam de uma outra via que imbrica com a principal no momento da expressão de *brl*, influenciando na estrutura do conidióforo.

### **2.3. O gene *bristle***

#### **2.3.1. Mutantes *bristle***

Entre os 36 mutantes *bristle*, muitos apresentavam fenótipos intermediários entre o *bristle* grave e o normal, como representa a Figura 3, podendo ser colocados em uma série de acordo com o comprimento do conidióforo, formando um gradiente entre o fenótipo *bristle* nulo ou silencioso e o selvagem (CLUTTERBUCK, 1969a; CLUTTERBUCK et al., 1992). Uma explicação para este fato é a de que esta série de alelos corresponde a um gradiente na expressão da proteína Brl. Esta hipótese foi corroborada pela análise



**Figura 3.** Diferentes aberrações de conidióforos encontrados em mutantes para o gene *brlA* em *Aspergillus nidulans*. A: conidióforo de linhagem selvagem; B: mutante *bristle* grave, com ausência de expressão de *brlA*; C, D e E: mutantes *brl* intermediários (brandos) (MILLER, 1990).

de mutantes *bristle* sensíveis a temperatura e a osmolaridade. Em diferentes graus de permissividade, os mutantes assumiam diferentes graus de comprometimento do conidióforo. A ausência de *brl* levava ao desenvolvimento de hastes que se alongavam até 10 vezes o comprimento normal de um conidióforo, sem contudo apresentar vesícula ou qualquer outra estrutura subsequente. Um pouco de expressão de *brl* já permitia alguma diferenciação, com vesícula rudimentar e ramificações. Mais atividade de *brl* resultava em conidióforos com cadeias de métulas e conidióforos secundários originados a partir de uma métula. A pigmentação do conidióforo pela indução dos genes *ivo A* e *B* também acompanhava esta série, com ausência nos fenótipos graves e pigmentação normal nas formas mais brandas (CLUTTERBUCK & TIMBERLAKE, 1992).

### 2.3.2. A proteína Brl

Estudos empregando metodologia molecular mostraram que a epistasia de *brl* sobre *aba* e deste sobre *wet* deve-se a supressão da transcrição dos genes subsequentes, em caso de falta do produto do gene epistático. Estes resultados sugeriam que as proteínas Brl, Aba e Wet são reguladores positivos de transcrição (MIRABITO et al., 1989; BOYLAN et al., 1987).

O sequenciamento do gene *brlA* permitiu a previsão da estrutura da proteína codificada por tal sequência. Esta proteína de 432 aminoácidos, rica em prolina (10%) e serina (13%), apresenta 2 *zinc fingers*, estruturas características de proteínas que se ligam ao DNA (MILLER et al., 1985; JOHNSTONE et al., 1985; ADAMS et al., 1988 e MITCHELL & TJIAN, 1989). O comprometimento de qualquer um desses *zinc fingers* por mutação sítio-dirigida convertendo cisteínas a serinas, resultaram em completa perda de atividade de Brl (ADAMS et

al., 1990). Dependendo da mutação nesta região, no entanto, alguma atividade de Brl foi preservada, como ocorreu com os mutantes *brlA31* e *brlA42* e a maioria dos mutantes brandos, cujo dano foi mapeado nesta região (CLUTTERBUCK, 1992 e TIMBERLAKE & CLUTTERBUCK, 1994).

### 2.3.3. Papel da proteína Brl

Para observar os efeitos da expressão da proteína Brl e sua relação com o produto dos genes *aba* e *wet*, ADAMS e colaboradores (1988) construíram um plasmídeo contendo a parte estrutural do gene *brlA* sob o controle do promotor (p) do gene *alcA* (álcool desidrogenase). Este promotor é induzido por treonina e reprimido por glicose (LOCKINGTON et al, 1985). Assim, a linhagem transformada com esta construção pode ser induzida a expressar Brl pela transferência do meio de glicose para o meio contendo treonina. O tempo escolhido para a indução foi de 12 horas após a germinação. Nesta fase, o fungo está crescendo vegetativamente, pois não se completou ainda, o estabelecimento da competência e não há expressão de Brl endógena. Duas horas após a indução, iniciaram-se muitas alterações citológicas que resultaram na dilatação das pontas das hifas, como se fossem vesículas, de onde brotaram conídios viáveis, diretamente, sem a formação de métulas ou fiálides. Este resultado coloca *brl* como o gene responsável por deflagrar a cascata de eventos que constitui a conidiogênese. Já se sabia que as proteínas Aba e Wet só se expressam após o aparecimento de Brl. Isto justifica porque mutantes *bristle* não apresentam transcrição de *aba* e *wet*. ADAMS et al (1988) observou que mRNAs destes genes começavam a se acumular 3 horas após o transporte do micélio para meio líquido contendo treonina. Ao transformar com a construção *alcA(p)::brlA* uma

linhagem portadora do alelo *abaA14* que é sensível a temperatura e induzir a expressão de Brl em temperatura restritiva para *aba*, não houve a produção de conídios, mas de estruturas típicas de mutantes *aba*, a partir das dilatações das hifas vegetativas. Quando a linhagem transformada era defectiva para o gene *wet*, os conídios foram formados mas germinavam ainda ligados à hifa e sofriam dilatação na extremidade, originando novo conídio (ADAMS et al, 1988). Estes resultados mostram claramente que Brl é necessário e suficiente para dirigir a diferenciação que vai resultar na produção dos conídios. No entanto, os produtos dos genes *aba* e *wet* são indispensáveis para a formação de conídios viáveis, com ou sem desenvolvimento de um conidióforo (ADAMS et al, 1988 e 1990).

#### **2.3.4. Sequências responsivas a Brl**

Todos os resultados apontavam para uma mesma direção - a proteína Brl deve ser um regulador positivo de transcrição. Para confirmar definitivamente esta hipótese, era necessário determinar a sequência consenso no DNA que corresponde ao sítio de ligação da proteína Brl ao promotor dos genes regulados por ela - as BREs (elementos responsivos a Brl). CHANG & TIMBERLAKE (1992), empregando uma estratégia análoga à de SCHENA & YAMAMOTO (1988) para detectar as sequências responsivas a glucocorticóides, encontraram de fato, as BREs. Para contornar os problemas técnicos da expressão em *Escherichia coli* e *A. nidulans*, trabalharam com *Saccharomyces cerevisiae*, como sistema de expressão de Brl. Como esta expressão não causava nenhuma alteração na levedura, acrescentaram a um plasmídeo URA3, 2 $\mu$ m, a parte estrutural do gene *lacZ* de *E.coli* sob o controle do promotor CYC1 sem os elementos UAS. Um sítio de reconhecimento para múltiplas enzimas de restrição

(*polylinker*) foi colocado antes do promotor de levedura para permitir a clonagem das BREs. Foi ensaiado, então, um fragmento de 752pb a 5' do sítio cap do gene *rodA* de *A.nidulans*, responsável pela síntese de uma camada de parede do conídio que lhe confere hidrofobicidade e é regulado por Brl (BOYLAN et al, 1987 e STRINGER et al, 1991). Este fragmento foi introduzido no plasmídeo de expressão de Brl previamente utilizado, contendo a parte estrutural do gene *brl* sob o controle do promotor e sequência líder do gene para galactosidase de levedura, que é reprimido por glicose e induzido por galactose. Assim, em meio contendo galactose havia indução de *brl* e, se a sequência clonada fosse uma BRE, haveria indução da expressão de  $\beta$ -galactosidase, e as colônias apareceriam azuis em X-gal. A análise da sequência do gene *rod* e de fragmentos de DNA genômico que foram positivos neste teste, permitiu chegar a um consenso 5'-CAAGGGG-3' que aparecia em múltiplas cópias. A remoção destes sítios causava a perda de resposta a Brl. Oligonucleotídeos sintéticos com uma ou mais cópias em tandem, foram capazes de promover a indução de *lacZ*. Uma contribuição muito importante deste trabalho foi a observação de que o número de cópias desta sequência era proporcional ao potencial de inducibilidade do gene pela proteína Brl. TIMBERLAKE (1980) e ZIMMERMANN et al (1980) estimaram que Brl sozinha é capaz de induzir apenas um terço dos genes regulados por esta proteína, o que representa 300 a 400 genes. Isto significa que os promotores da maioria dos genes induzíveis por Brl, além das BREs, devem apresentar outras sequências consenso específicas para outras proteínas reguladoras, como Aba ou Med para expressão de genes que, embora sejam dependentes de Brl, não são responsivos em ausência de Aba ou Med. Foram detectadas BREs em vários genes cuja expressão depende de Brl, inclusive o próprio gene *brl* (CHANG & TIMBERLAKE, 1992).

### 2.3.5. A expressão da proteína Brl

BOYLAN et al. (1987), pela análise dos RNAs extraídos em cada fase da conidiogênese em culturas sincronizadas, descreveu o padrão temporal de expressão dos genes *brl*, *aba* e *wet*. O emprego de construções contendo a região promotora dos genes *brl*, *aba* e *wet* e a parte estrutural do gene *lacZ* de *E.coli* levou à observação da distribuição espacial e temporal dessas proteínas reguladoras. Brl era expressa em vesícula, métulas e fiálides; Aba, em métulas e fiálides; e Wet, em fiálides e conídios. O tempo de aparecimento da proteína também foi característico. Brl aparecia 10 horas após a indução por exposição ao ar, Aba, 15 horas e Wet, 25 horas (ADAMS & TIMBERLAKE, 1990 e AGUIRRE, 1993).

Um aspecto muito importante na conidiogênese é a expressão sequencial de grupos de genes, o que caracteriza a regulação temporal do processo. Para garantir este dispositivo de tempo, a proteína Brl, responsável pela indução de todos estes genes, é traduzida em pulsos, o primeiro dos quais, resulta na diferenciação da vesícula e brotamento das métulas (HAN et al., 1993). Seguindo este raciocínio, o segundo pulso deve ocorrer nas métulas já diferenciadas, juntamente com a proteína Aba, originando as fiálides e, finalmente, nas fiálides, devem ocorrer sucessivos pulsos, um para cada conídio que se forma a partir destas células. Embora este modelo esteja baseado na sequência de induções já relatadas, o único pulso identificado experimentalmente foi o primeiro. Já foi descrito um gradiente de mRNA de *brlA* ao longo da haste, que são traduzidos apenas na vesícula (BOYLAN et al., 1987; MILLER et al., 1992 e ANDRIANOPOULOS & TIMBERLAKE, 1994). Os demais pulsos ocorrem por indução das proteínas Brl e Aba, gerando um círculo de induções e

auto-induções que resultam em um aumento inicial do nível de Brl em relação ao nível que ocorria na vesícula e a manutenção desta concentração enquanto houver formação de conídios (BUSBY et al., 1996).

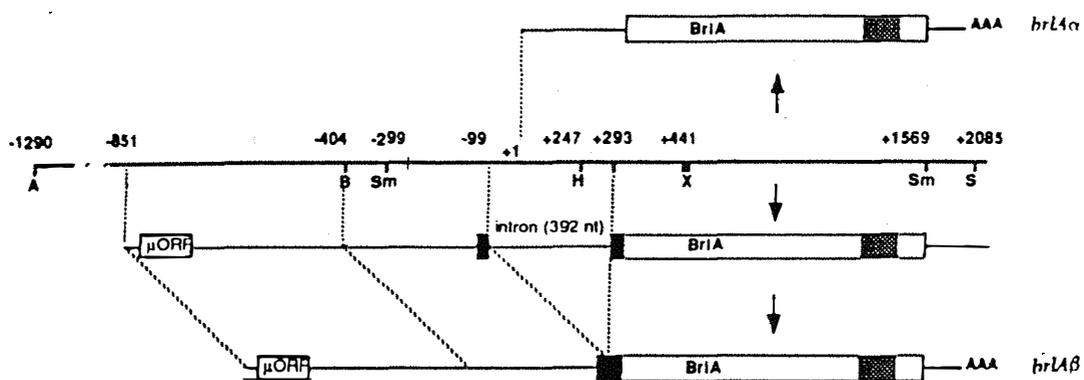
O controle da diferenciação do conidióforo, no entanto, não depende somente da expressão coordenada destes três genes. A distribuição espacial não é apenas função da fase em que um gene é induzido. MILLER et al. (1991 e 1992) demonstraram, por exemplo, que o produto do gene *stu* é necessário para a adequada localização da proteína Aba. Empregando uma construção com a parte reguladora de *aba* e a estrutural do gene *lacZ*, transformaram uma linhagem mutante para *stu*. A expressão de  $\beta$ -galactosidase não se restringiu aos esterigmas, como se esperaria de Aba, mas estava disperso por todo o conidióforo, até a célula-pé. AGUIRRE (1993) também chegou à mesma conclusão com relação ao papel de Stu na distribuição espacial mas não temporal de Brl.

### 2.3.6. A transcrição de *brl*

Os trabalhos iniciais de clonagem do gene *brl* sugeriam que ele era transcrito em duas formas alternativas (BOYLAN et al., 1987). No entanto, estudos posteriores não confirmaram este fato e o gene foi apresentado com um único sítio de início de transcrição, uma ORF (*open reading frame*) e ausência de introns (ADAMS et al, 1988). PRADE & TIMBERLAKE (1993), ao selecionar clones de cDNA do gene *brl*, encontraram dois tipos de mRNAs: um de 2,1 kb, que foi chamado  $\alpha$ , e um menos abundante, de 2,5 kb, o  $\beta$ . Eles são resultantes de dois inícios de transcrição no gene e apresentam uma sobreposição na região estrutural, como mostra a Figura 4. O transcrito  $\alpha$  inicia a +1 e +8, com o

primeiro ATG a +349, iniciando um quadro de leitura de 432 codons. O transcrito  $\beta$  inicia a -857, -851 e -848 e contém um intron de -99 a +292. O primeiro ATG ocorre a -790 e inicia uma ORF de 41 codons, designado  $\mu$ ORF, e um segundo ATG a -112 seguido por uma ORF de 22 codons seguidos pelos mesmos 432 codons do transcrito  $\alpha$ . Portanto, a proteína Brl codificada por  $\beta$  contém 23 aminoácidos adicionais na extremidade N, em relação à proteína resultante da tradução de  $\alpha$ . Empregando recombinação homóloga, fizeram remoção do início de transcrição, ora de  $\alpha$ , ora de  $\beta$ , ora de ambos e analisaram as aberrações na conidiogênese destes mutantes artificialmente obtidos. Os que expressavam apenas  $\alpha$ , apresentavam conidióforos secundários; os que tinham apenas  $\beta$ , mostravam cadeias de métulas e os mutantes que perderam ambos os transcritos, apresentavam o fenótipo *bristle* grave ou nulo típico, apenas com longas hastes indiferenciadas. Esta diferença na morfogênese dos mutantes para cada mRNA indica que ambos são necessários para o correto desenvolvimento do conidióforo. Estes resultados são coerentes com o fato de a maioria dos mutantes intermediários de CLUTTERBUCK (1992), apresentarem o dano na região que corresponde aos *zinc-fingers* na proteína, interferindo na sua atividade de ligação ao DNA. Eles desenvolviam tanto conidióforos secundários, quanto cadeias de métulas, o que pode ser explicado pela mutação envolvendo ambos os transcritos.

PRADE & TIMBERLAKE (1993) mostraram também que o transcrito  $\beta$  é o primeiro a aparecer e deve ser o responsável pela diferenciação



**Figura 4.** Estrutura do gene *brlA* de *Aspergillus nidulans* e seus transcritos.

A barra representa a parte estrutural dos transcritos. A parte em negro, representa a região adicional que será traduzida a partir de  $\beta$ ; a parte achuriada indica a região que, na proteína, apresenta os *zinc-fingers* (PRADE & TIMBERLAKE, 1993).

da vesícula e das métulas e o  $\alpha$  deve ser expresso em métulas e dirigir a transição métula-fiálide e em fiálides, para a produção dos conídios. Como ambas as proteínas são iguais, com excessão de 23 resíduos na região N-terminal, o que distingue os dois transcritos não deve ser a função da proteína, mas a regulação temporal de sua expressão. De fato, mutantes  $\alpha+\beta^-$  transformados com múltiplas cópias de  $\alpha^+$ , e  $\alpha-\beta^+$  com super produção de  $\beta^+$  foram capazes de desenvolver conidióforos normais.

Em vista deste novo cenário, HAN et al (1993) estudaram a expressão destes transcritos e de seus produtos em linhagens transformadas com diferentes plasmídios. Estes plasmídios continham, cada um, o ATG de um ORF ( $\mu$ ,  $\alpha$  ou  $\beta$ ) fusionado com a região estrutural do gene *lacZ* de *E.coli*. As linhagens transformadas foram de dois tipos: *brl+* e *brl-*. Nos transformantes *brl+*, *brl $\alpha$ ATG::lacZ*, a atividade de  $\beta$ -galactosidase começou a aparecer entre 2 e 4 horas após a indução, chegando ao nível máximo de 180 unidades com 12 horas pós-indução. Já nos transformantes *brl+*, *brl $\beta$ ATG::lacZ*, a atividade chegou ao máximo de 40 unidades com 6 horas pós-indução. Estes resultados são compatíveis com os ensaios de *Northern blot* (BOYLAN et al, 1987 e PRADE & TIMBERLAKE, 1993). Confirmam também a especificidade temporal do aparecimento de  $\alpha$  e  $\beta$ .

Quando as linhagens transformadas eram *brl-*, a expressão de  $\beta$ -galactosidase de fusão com  $\alpha$  era menor que na linhagem *brl+*, enquanto a proteína de fusão com  $\beta$  não sofreu influência da presença ou ausência de Brl endógena. Este fato demonstrou que a auto-indução de *brl* já observada por outros autores, ocorre a nível de transcrito  $\alpha$ . Portanto, a transcrição de  $\alpha$  é regulada pela própria proteína Brl. Além deste ciclo de “retro-indução”, a transcrição de *brlA $\alpha$*  é regulada negativamente pela proteína Stu, positivamente

pela proteína Aba, de forma direta e pelo produto do gene Med, de forma indireta, como será apresentado em detalhes, no próximo item (AGUIRRE, 1993; ADRIANOPOULOS & TIMBERLAKE, 1994 e BUSBY et al., 1996)

Até 1994, pensava-se que a transcrição de  $\beta$  fosse constitutiva e tivesse início ainda na fase vegetativa. As quantidades de transcrito nesta fase são tão pequenas que não podem ser visualizadas por *northern blot*. No entanto, por PCR, PRADE & TIMBERLAKE (1993) foram capazes de demonstrar sua presença nestas condições. WIESER et al (1994) obtiveram vários mutantes com hifas aéreas indiferenciadas, devidos a diferentes genes *fluffy* e com baixa expressão de Brl. Empregando estes mutantes, demonstraram que o transcrito  $\beta$  é induzido a nível de transcrição por estes genes, em resposta a diferentes fatores ambientais.

### 2.3.7. A regulação de *brl*

Com o acúmulo de informações, é possível traçar hoje, um modelo para a diferenciação do conidióforo, desde a diferenciação da célula-pé até a maturação dos conídios, embora existam ainda muitos pontos obscuros. No entanto, o estado atual de compreensão destes mecanismos encoraja os pesquisadores a enveredar pelo terreno ainda misterioso que vai da competência até a indução. Neste sentido, muitos mutantes guardados ou descartados começaram a ser alvo de grande investimento. Foi assim que os mutantes *fluffy* passaram a trazer importantes contribuições.

YAGER (1982) obteve uma linhagem sensível a temperatura, de fenótipo *flu*, que recebeu o nome de *acoD*. O desenvolvimento estava bloqueado logo após o estabelecimento da competência, de maneira que não ocorria a

formação de conidióforos, apenas de grande massa de hifas aéreas. ADAMS et al. (1992) estudaram esta linhagem e mostraram que *acoD* ou *fluG* era essencial para a expressão de *brl*. Este requerimento podia, no entanto, ser contornado em parte, por limitação nutricional. Em meio mínimo, a colônia apresentava a metade do diâmetro de uma linhagem selvagem e produzia muito poucos conidióforos tardiamente, cerca de 24 horas após a indução. Nesta linhagem, crescida em meio completo, não havia expressão de *brl*, indicando que, em condições nutricionais normais, o produto do gene *fluG* deveria induzir *brl* para o início do programa de diferenciação dos conidióforos. Em condições de carência nutricional, outros fatores deveriam desencadear o processo. *fluG* codifica para uma proteína que é secretada para o meio de cultura, levando uma colônia mutante para este gene, a produzir conidióforos quando crescida próximo a uma colônia selvagem (ADAMS et al., 1992 e LEE & ADAMS, 1994a).

LEE & ADAMS (1994b) analisaram um dos mutantes *flu* com baixa expressão de Brl obtidos por WIESER et al. (1994). Foram chamados *flb* (*fluffy low bristle expression*). Este mutante, *flbA*, além de não produzir conidióforos, crescia mal e apresentava lise das hifas, na parte mais velha da colônia, a partir de dois dias. Este foi o primeiro gene descrito com influência tanto na fase vegetativa, quanto na conidiogênese, embora tenha sido descrita uma senescência precoce das hifas em linhagens mutantes para o gene *stu* (TIMBERLAKE, 1990). O gene foi clonado e sequenciado. Uma cópia do gene *flbA* selvagem sob o controle de um promotor induzível, quando induzido em uma linhagem *brl+*, ainda na fase vegetativa, foi capaz de provocar a expressão da proteína Brl e as mesmas modificações de pontas de hifas observadas por ADAMS et al. (1988) com conseqüente produção de conídios. Este fato veio confirmar o papel de FlbA como uma das proteínas que induzem a transcrição do gene *brlA*. A proteína FlbA é homóloga a SST2 de *S.cerevisiae* cuja função é

regular a atividade da via de transdução de sinal mediada por proteína G, que controla a resposta sexual na levedura (DIETZEL & KURJAN, 1987). Esta similaridade levou à proposição de que FlbA poderia ser a responsável pela resposta ao sinal do produto do gene *fluG* para a conidiogênese (LEE & ADAMS, 1994a e 1994b). LEE & ADAMS (1995) demonstraram que estes dois genes são interdependentes para a indução da conidiogênese e que a indução de *brl* que promovem é específica para o transcritoβ (LEE & ADAMS, 1995).

Outros 4 genes deste grupo, *flbB*, *flbC*, *flbD* e *flbE* são independentemente requeridos para a indução de *brlA* (WIESER et al, 1994). Os mutantes para qualquer um destes genes apresentam um atraso de pelo menos 24 horas na formação dos conidióforos, levando a um aspecto fluffy da colônia com conidióforos apenas no centro, a uma distância de 12 a 15mm do bordo de crescimento vegetativo. Uma linhagem selvagem para estes genes, produz conidióforos até 1 a 2mm do bordo. Empregando construções com cada um destes genes, sob o controle de um promotor induzível, WIESER & ADAMS (1995), obtiveram a superexpressão de cada produto gênico em presença ou ausência dos outros. O que se pretendia observar era o aparecimento ou não de conidióforos e conídios em cultura submersa. Os resultados indicaram que *flbA* é epistático sobre os outros; que *flbE*, *D* e *B* estão envolvidos em uma mesma via de indução de *brlA*; e que *flbC* não participa desta via, mas induz *brlA*, como os demais.

O produto do gene *flbD* é homólogo ao domínio de ligação ao DNA, do protooncogene *myb*. Como a concentração de *FlbD* não é alterada durante o desenvolvimento, deve haver um controle pós-tradução da atividade desta proteína, como ocorre com Myb que, em diferentes estados redox, apresenta modificações de conformação que alteram sua capacidade de se ligar ao DNA (GUEHMANN et al., 1992 e MYRSET et al., 1993). É possível,

portanto, que este conjunto de genes seja responsável por uma via de indução da conidiogênese em resposta à exposição ao oxigênio (WIESER & ADAMS, 1995).

Sob o controle de todos estes genes, o transcrito  $\beta$  do gene *brlA* começa a ser sintetizado ainda na fase vegetativa, provavelmente durante a diferenciação da célula-pé. No entanto, estes mRNAs são acumulados formando um gradiente ao longo da haste do conidióforo, sem ser traduzidos. A tradução ocorre num pulso que leva à diferenciação da vesícula e brotamento das métulas (HAN et al., 1993). A presença do  $\mu$ ORF sugere um controle a nível de tradução, possibilitando a formação deste gradiente. As evidências do papel deste fragmento no controle da tradução do transcrito  $\beta$  foram confirmadas com o emprego de transformantes *brl+*, *brl* $\beta$ ATG::*lacZ* em que o ATG do  $\mu$ ORF foi alterado para ATC por mutação sítio-dirigida. Neste caso, houve o aparecimento de atividade da enzima antes da indução da conidiogênese. Mutações que levam a alteração no quadro de leitura não resultaram no comprometimento da regulação (HAN et al., 1993). É provável, portanto, que o mecanismo de controle da tradução não necessite da produção de um peptídeo, mas apenas do início da tradução do AUG deste fragmento. A presença deste tipo de controle deve ser mais comum do que se pensa, em *Aspergillus*, segundo MILLER et al. (1992) que relatou um pequeno  $\mu$ ORF no gene *stu*, que é transcrito antes da competência, mas parece ser traduzido apenas após a indução. Na levedura *S.cerevisiae*, o gene GCN4 cujo produto é um ativador de transcrição para controle geral da síntese de aminoácidos, é regulado a nível de tradução, graças a um pequeno  $\mu$ ORF no início do mRNA (HINNEBUSCH, 1984 e MUELLER & HINNEBUSCH, 1986).

O primeiro pulso de tradução da proteína Brl, induz um grupo de genes, entre os quais, o gene *abaA* e o próprio *brlA* (transcrito  $\alpha$ ) (HAN et al., 1993). A transcrição de *brlA* é reprimida por Stu e Med e induzida por Brl e Aba. Além das evidências experimentais, foram encontradas no intron do gene *brl*, onde se encontra o promotor de *brlA*, sequências consenso responsivas a Brl (Figura 4) (CHANG & TIMBERLAKE, 1992), a Aba (ANDRIANOPOULOS & TIMBERLAKE, 1994) e a Stu (BUSBY et al., 1996).

A tradução do segundo pulso de Brl, ocorre nas métulas já diferenciadas e provoca o brotamento das fiálides e a indução de outro grupo de genes, entre os quais, novamente *brlA*, *abaA* e *wetA*. Com a expressão destas proteínas, um novo conjunto de genes é induzido e começam a se formar os conídios, um a um, e a entrar em processo de maturação, com a expressão de alguns genes nos próprios conídios, como *wetA*, e outros nas fiálides, com deposição dos seus produtos sobre a parede dos conídios, como é o caso das enzimas para a síntese dos pigmentos (genes *wA* e *yA*) e hidrofobinas (gene *rodA*) (CLUTTERBUCK, 1972; OLIVER, 1972; LAW & TIMBERLAKE, 1980; SEWALL et al., 1980a e O'HARA & TIMBERLAKE, 1989). Quando o conídio está na quarta ou quinta posição na cadeia, a partir da fiálide, ele já está maduro (MILLER, 1990)

É importante ressaltar ainda que este controle temporal não significa que não haja indução de *brlA* precocemente. PRADE & TIMBERLAKE (1993) obtiveram mutantes que, embora não apresentassem qualquer expressão de transcritos  $\beta$ , tinham um desenvolvimento aberrante, no entanto, eram capazes de diferenciar vesícula e primórdios de métulas que desdiferenciavam para novas hastes, o que não acontece quando falta  $\alpha$  e  $\beta$ . Ensaios de *Northern blot* não

foram sensíveis para detectar transcritos *brl* $\alpha$  nestas condições, mas por PCR foi possível reconhecer sua presença.

BUSBY et al. (1996) descreveram a repressão da transcrição precoce de transcrito  $\alpha$  pelos produtos dos genes *med* (*medusa*) e *stu* (*stunted*). Seus resultados indicaram também que, após a indução de *brl* $\alpha$ , Med passa a reprimir a transcrição de *brl* $\beta$ , pois mutantes *medusa* apresentam tardiamente, níveis aumentados deste transcrito.

A complexa regulação espacial-temporal de *brl* ainda não está totalmente esclarecida. Além do controle da transcrição e tradução de *brl* $\beta$  e da transcrição de *brl* $\alpha$ , LEE & ADAMS (1995) encontraram evidências de regulação a nível de processamento de *brl* $\beta$ . Empregando a região do gene *brl* correspondente ao transcrito  $\beta$  sem *intron* para transformar linhagens deficientes para *brl*, obtiveram uma antecipação da conidiogênese, quando promoveram a indução de *brl* com a superexpressão de *fluG* e *flbA*, o que não ocorria quando a transformação era feita com o gene inteiro.

### **2.3.8. A degradação de Brl**

As análises da presença de Brl durante as diversas etapas da diferenciação dos conidióforos não permitem assegurar detalhes sobre a relação entre síntese e degradação da proteína. O que parece claro é que Brl deve estar presente cada vez que um novo grupo de genes é induzido (BOYLAN, et al, 1987 e MIRABITO et al, 1989).

No entanto, a expressão de Brl nos conídios colocaria em risco a germinação e o início da fase vegetativa, pois sua presença induz a diferenciação

de conidióforos aberrantes nas pontas de hifas (ADAMS et al, 1988). Por este motivo, deve haver uma intensa degradação da proteína Brl nos conídios recém-formados, pois todas as análises concluíram que não ocorre a presença de transcritos de *brl*, nem do seu produto nestas estruturas.

### 2.3.9. Relação de Brl com outras proteínas

A expressão temporal e espacialmente coordenada de grupos de genes durante o desenvolvimento do ciclo assexuado de *Aspergillus nidulans* não se deve apenas aos pulsos de tradução da proteína Brl. Muitas evidências apontam para a cooperação de outras proteínas, na indução destes genes. Um caso bem estudado é o do gene *medusa*. Mutantes para este gene apresentam fenótipos semelhantes aos deficientes intermediários para o gene *brl*. Apenas o fenótipo já indica alguma relação entre os produtos destes dois genes. Um dos genes controlados por Brl é o *ivoA*, responsável em parte pela coloração dos conidióforos (CLUTTERBUCK, 1990). A falta de indução deste gene é responsável pela falta de coloração dos mutantes *bristle* graves e dos mutantes *medusa*. Desta forma, parece que ambas as proteínas se associam na indução de alguns genes. Esta hipótese foi corroborada pelo trabalho de BUSBY et al (1996), que transformaram uma linhagem deficiente para *med* com um plasmídeo contendo uma ou mais cópias do gene *brl*. A superexpressão de Brl suprimiu o fenótipo *medusa*. A interação das proteínas Brl e Med ocorrem desde a fase de vesícula, onde o transcrito  $\beta$  do gene *brl* é traduzido, pois os mutantes *med* mostram conidióforos secundários, o que foi relacionado com deficiência de Brl nesta fase (PRADE & TIMBERLAKE, 1993).

Foram descritos dois novos genes que receberam a denominação *sthenyo* (*sth*) que, na mitologia grega, era um dos irmãos da Medusa. Isto se deve ao fato de terem sido encontrados em mutantes *medusa*, onde causam um agravamento do fenótipo destas linhagens. Curiosamente, sozinhos, em uma linhagem selvagem para *med* e *brl*, são assintomáticos. Em mutantes *bristle* também causam agravamento das aberrações de conidióforos. Estes resultados levaram GEMS & CLUTTERBUCK (1994) a propor que *brl*, *med*, *sthA* e *sthB* formam uma série poligênica com funções distintas, mas parcialmente interrelacionadas.

Outro fato bem estudado é a necessidade da expressão conjunta de Brl e Aba para a indução de certos genes e Brl, Aba e Wet para a expressão de outros, colocando claramente, a possibilidade de associação destas proteínas em conjunto, às regiões promotoras (TIMBERLAKE & CLUTTERBUCK, 1994). Como já foi mencionado, a proteína Brl sozinha é responsável pela indução de apenas um terço dos genes, o que indica que na maior parte das vezes, ou seja, dois terços dos genes, a indução de Brl depende de associação com outras proteínas (TIMBERLAKE, 1980 e ZIMMERMANN et al, 1980).

### **2.3.9. Relação de Brl com o ciclo sexual**

Vários genes estão envolvidos, tanto na conidiogênese, quanto na ascospogênese, indicando que a opção por um ou outro ciclo pode ser explicado pelo balanço entre o conjunto de estímulos para cada um em um dado momento da vida da colônia. Os fatores Psi, por exemplo, que são interconvertíveis, no início do crescimento da colônia, induzem o ciclo sexual e reprimem o sexual e mais tarde, fazem o inverso (CHAMPE & EL-ZAYAT,

1989). Os mutantes *velvet* apresentam bloqueios nas duas vias e seus supressores corrigem ambos os bloqueios concomitantemente (MOONEY et al, 1990).

Os genes *stu* e *med*, que interagem com *brl* na conidiogênese, são imprescindíveis para a formação de ascósporos e cleistotécios, já que mutantes *stunted* e *medusa* são autoestéreis (CLUTTERBUCK, 1969a).

JURGENSON & CHAMPE (1990) obtiveram resultados indicando que *brlA* é envolvido na regulação da expressão de genes durante a reprodução sexual. Um gene *Spo28* é expresso em conídios e ascósporos. Em mutantes deficientes para *brl*, este transcrito não é encontrado em conídios, como se poderia supor, uma vez que Brl está envolvida na indução de muitos genes expressos em conídios. No entanto, este transcrito também está ausente nos ascósporos, mostrando que Brl deve ser responsável pela indução de pelo menos este gene durante a ascosporogênese.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagens:

A linhagem em estudo é a CLB3, obtida pela autora, por tratamento da linhagem *biA1 methG1* de *Aspergillus nidulans* com luz ultravioleta.

A linhagem CLY14 foi obtida pela autora, como um segregante meiótico do cruzamento de CLB3 e AJC.51, portador do alelo *brlA* de CLB3 e crescimento vegetativo normal.

A linhagem *biA1 methG1*, analisada como controle de crescimento vegetativo e conidiogênese, e MSE (Master Strain E) utilizada para mapeamento genético, são originárias de Glasgow e foram obtidas a partir da coleção do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

As linhagens *niaD*, empregada no mapeamento fino do gene *brl*, *brlA42*, utilizada no teste de alelismo e AJC9.51, AJC9.52 e AJC9.53, que possibilitaram o mapeamento intragênico de *brl* foram gentilmente cedidas pelo Dr. A. John Clutterbuck, da Universidade de Glasgow.

De acordo com a nomenclatura sugerida por CLUTTERBUCK (1969c), a descrição das linhagens é a seguinte (entre parêntesis, a autora acrescentou o grupo de ligação onde se encontra o gene mencionado):

*CLB3*: conídios verdes esparsos; crescimento vegetativo menor que o normal; grande melanização do micélio vegetativo;

*biA1* (I) requisito para biotina

*methG1* (IV) requisito para metionina;

*suB methG1 (cys C)* (V) supressor de *methG1*;

*brlA* (VIII) *bristle* brando.

*biA1 methG1*: conídios verdes; crescimento e esporulação normais;

*biA1* (I) requisito para biotina;

*methG1* (IV) requisito para metionina.

MSE (Master Strain E): conídios brancos; crescimento e esporulação normais;

*suA1 adE20* (I) supressor de *adE20*;

*yA2* (I) conídios amarelos;

*adE20* (I) requisito para adenina;

*wA3* (II) conídios brancos;

*galA1* (III) incapacidade de utilização de galactose como fonte de carbono;

*pyroA4* (IV) requisito para piridoxina;

*facA303* (V) incapacidade de utilização de acetato como fonte de carbono;

*sB3* (VI) requisito para tiosulfato;

*nicB8* (VII) requisito para ácido nicotínico;

*riboB2* (VIII) requisito para riboflavina.

*niaD*: conídios amarelos, crescimento e esporulação normais;

*yA2* (I) conídios amarelos;

*pyroA4* (IV) requisito para piridoxina;

*niaD* (VIII) incapacidade de utilização de nitrito como fonte de nitrogênio.

*brlA42*: ausência de conídios a 37° C, crescimento vegetativo normal;

*pabaA1* (I) requisito para ácido *p*-aminobenzóico;

*brlA42* (VIII) *bristle* brando.

AJC9.51: ausência de conídios e crescimento vegetativo normal;

*yA2* (I) conídios amarelos;

*pabaA1* (I) requisito para ácido *p*-aminobenzóico;

*argB2* (III) requisito para arginina;

*pyroA4* (IV) requisito para piridoxina;

*niiA4* (VIII) incapacidade de utilização de nitrato e nitrito;

*cnxA5* (VIII) incapacidade de utilização de nitrato e hipoxantina;

*brlA9* (VIII) *bristle* grave.

AJC9.52: ausência de conídios e crescimento vegetativo normal;

*yA2* (I) conídios amarelos;

*argB2* (III) requisito para arginina;

*pyroA4* (IV) requisito para piridoxina;

*niiA4* (VIII) incapacidade de utilização de nitrato e nitrito;

*cnxB11* (VIII) incapacidade de utilização de nitrato e hipoxantina;

*brlA17* (VIII) *bristle* grave.

AJC9.53: ausência de conídios e crescimento vegetativo normal;

*yA2* (I) conídios amarelos;

*biA1* (I) requisito para biotina;

*argB2* (III) requisito para arginina;  
*pyroA4* (IV) requisito para piridoxina;  
*niiA4* (VIII) incapacidade de utilização de nitrato e nitrito;  
*cnxA5* (VIII) incapacidade de utilização de nitrato e hipoxantina;  
*ivoB63* (VIII) ausência de pigmentação dos conidióforos;  
*brlA39* (VIII) *bristle* grave.

CLY14: conídios amarelos, crescimento vegetativo normal

*yA2* (I) conídios amarelos  
*pyroA4* (IV) requisito para piridoxina  
*cys C* (V) requisito para cisteína  
*brlA* (VIII) alelo *bristle* da linhagem CLB3 com fenótipo brando

### 3.2. Meios de cultura e soluções para análises genéticas:

3.2.1. Meio mínimo (PONTECORVO et al., 1953) modificado (VAN DE VATE & JANSEN, 1978)

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| NaNO <sub>3</sub>                    | 6,0g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1,5g  |
| Kcl                                  | 0,5g  |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,5g  |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 1,0mg |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 1,0mg |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O | 1,0mg |

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| Glicose               | 10,0g    |
| Agar                  | 15,0g    |
| Água destilada q.s.p. | 1000,0ml |

Após o preparo, o pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 1N e o meio, autoclavado a uma atmosfera de pressão, por 15 minutos, sendo depois mantido à temperatura ambiente.

### **3.2.2. Meio completo (PONTECORVO *et al.*, 1953) modificado**

Aos componentes do meio mínimo, foram adicionados:

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Peptona.             | 2,0g  |
| Caseína hidrolisada  | 1,5g  |
| Extrato de levedura. | 2,0g  |
| Solução de vitaminas | 1,0ml |

Após o preparo, o pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 1N e o meio, autoclavado a uma atmosfera de pressão, por 15 minutos, sendo depois mantido à temperatura ambiente.

### 3.2.3. Solução de vitaminas

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Biotina.              | 2,0mg   |
| Piridoxina            | 50,0mg  |
| Ácido p-aminobenzóico | 50,0mg  |
| Ácido fólico          | 50,0mg  |
| Ácido nicotínico      | 100,0mg |
| Ácido pantotênico     | 200,0mg |
| Cloreto de colina     | 200,0mg |
| Riboflavina           | 100,0mg |
| Meso-inositol         | 400,0mg |
| Aneurina              | 50,0mg  |
| Água destilada q.s.p. | 100,0ml |

A água destilada e o frasco foram previamente autoclavados a uma atmosfera de pressão por 20 minutos. Após o preparo, a solução foi mantida em banho-maria (100°C) por 20 minutos, acrescentados 5ml de clorofórmio e mantida a 4°C.

### 3.2.4. Meio mínimo mais 2% de meio completo

Adicionou-se a cada 100ml de meio mínimo líquido (item 3.2.1 omitindo-se o ágar), 2ml de meio completo (item 3.2.2 omitindo-se o ágar).

Após o preparo, o meio foi autoclavado a uma atmosfera de pressão por 15 minutos e distribuído (4ml) em tubos de ensaio estéreis, para uso imediato.

### 3.2.5. Meio com galactose (ROBERTS, 1959)

Meio mínimo (item 3.2.1) substituindo a glicose por igual quantidade de galactose.

O pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 1N e autoclavado a uma atmosfera por 15 minutos, sendo depois mantido à temperatura ambiente.

Os complementos nutricionais foram acrescentados como descrito nos itens 3.2.7 e 3.2.9.

### 3.2.6. Meio com acetato (APIRION, 1962)

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| Acetato de amônia                    | 12,0g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 43,0g    |
| NaCl                                 | 2,0g     |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,5g     |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 1,0mg    |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 1,0mg    |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O | 1,0mg    |
| Ágar                                 | 15,0g    |
| Água destilada q.s.p.                | 1000,0ml |

O pH foi ajustado para 5,1 com NaOH 1N e autoclavado a uma atmosfera por 15 minutos, sendo depois mantido à temperatura ambiente.

Os complementos nutricionais foram acrescentados como descrito nos itens 3.2.7 e 3.2.9.

### **3.2.7. Meios seletivos para análises de segregantes de cruzamentos**

A composição destes meios variou de acordo com as linhagens envolvidas no cruzamento. Foram feitos a partir de meio mínimo (item 3.2.1), acrescentando-se os complementos nutricionais a partir de soluções-estoque, previamente esterilizadas, após a autoclavação do meio.

Em cada frasco de 200ml de meio, foram acrescentados 1ml de solução-estoque. O frasco de meio controle (SM-meio suplementado) e os frascos de meios para teste de fontes de carbono (galactose e acetato) receberam todos os nutrientes.

Em cada frasco de meio seletivo para teste de uma marca nutricional, apenas o respectivo nutriente foi omitido, acrescentando-se todos os demais.

### **3.2.8. Suplementos para meios seletivos**

Os suplementos para meios seletivos foram preparados individualmente. Cada substância foi adicionada à água previamente esterilizada, em condições assépticas e o frasco foi aquecido em banho-maria fervente por 20 minutos. Após o resfriamento da solução, foram adicionados 5ml de clorofórmio a cada frasco de 100ml e mantido a 4°C.

A concentração de cada requisito na solução-estoque e no meio de cultura foram as seguintes:

| Solução-estoque       | Concentração<br>solução-estoque<br>(mg/100ml) | Concentração<br>final no meio<br>(µg/ml) |
|-----------------------|---|--|
| Adenina               | 500,0   | 25,00                                    |
| Ácido p-aminobenzóico | 5,0   | 0,25                                     |
| Ácido nicotínico      | 10,0  | 0,50                                     |
| Arginina              | 1000,0  | 50,00                                    |
| Biotina               | 0,4   | 0,02                                     |
| Cisteína              | 1000,0  | 50,00                                    |
| Metionina             | 1000,0  | 50,00                                    |
| n-propargilglicina    | 10,0  | 0,50                                     |
| Piridoxina            | 5,0   | 0,25                                     |
| Riboflavina           | 10,0  | 0,50                                     |
| Tiosulfato de sódio   | 2000,0  | 100,00                                   |

### 3.2.9. Meios seletivos para análise mitótica

Foram feitos meios com galactose (item 3.2.5) e com acetato (3.2.6) contendo todos os nutrientes. Foram preparados meios para teste das seguintes marcas nutricionais, segundo o item 3.2.7: biotina, metionina, piridoxina, tiosulfato, ácido nicotínico, riboflavina. No frasco para o teste da marca tiosulfato, além deste foi também omitida a metionina.

Para a detecção da marca *suB methG1*. foram feitos três meios seletivos:

meio sem metionina: meio mínimo, acrescido de todos os requisitos, exceto metionina;

meio com cisteína: meio sem metionina, mais cisteína;

meio com *n*-propargilglicina: meio sem metionina, mais *n*-propargilglicina.

Os meios para teste de fonte de carbono serão descritos em itens próprios.

### **3.2.10. Meios seletivos para análise meiótica**

Como a marca mapeadora foi *niaD*, os meios seletivos envolvendo fonte de nitrogênio (meio com nitrato e meio com nitrito) foram acrescidos de piridoxina, biotina e 0,25mM de metionina que são as marcas das duas linhagens. Estas marcas não foram ensaiadas porque não estão no cromossomo VIII.

### **3.2.11. Meio com nitrato**

Meio mínimo (item 3.2.1)

### **3.2.12. Meio com nitrito (COVE, 1976)**

Meio mínimo sem nitrato

0,1g de nitrito de sódio para 200ml de meio.

### **3.2.13. Meios seletivos para mapeamento intragênico**

Como este mapeamento envolveu as marcas *niiA*, *cnxA* e *cnxB*, foram feitos meios seletivos para a fonte de nitrogênio: meio com nitrato (3.2.11), meio com nitrito (3.2.12), meio com hipoxantina e meio com tartarato

de amônia), suplementados com biotina, piridoxina, ácido p-aminobenzóico, 0,25mM de metionina e 0, 25mM de arginina.

#### **3.2.14. Meio com hipoxantina (COVE, 1976)**

Meio mínimo (item 3.2.1) sem nitrato

Hipoxantina na concentração de 0,04g para 200ml de meio.

#### **3.2.15. Meio com tartarato de amônia (COVE, 1976)**

Meio mínimo (item 3.2.1) sem nitrato

Tartarato de amônia na proporção de 0,2g para 200ml de meio.

#### **3.2.16. Meio completo com NaCl (CLUTTERBUCK, 1972)**

O estabilizador osmótico escolhido foi o NaCl 0,5M. Para a confecção deste meio, foi feita uma solução estoque 5M de NaCl autoclavada e mantida a 4°C. Esta solução foi acrescentada ao meio completo (item 3.2.2) já autoclavado.

### 3.2.17. Meio para produção de cleistotécios (PONTECORVO et al., 1953)

Este meio consistiu na modificação de apenas dois ingredientes da formulação do meio mínimo (ítem 3.2.1):

|                   |       |
|-------------------|-------|
| NaNO <sub>3</sub> | 1,0g  |
| glicose           | 20,0g |

### 3.2.18. Meios para determinação das marcas nutricionais do mutante CLB3 (PONTECORVO et al., 1953)

Meio completo (ítem 3.2.2) (MC)

Meio mínimo (ítem 3.2.1) (MM)

Meio mínimo mais biotina (MM+BIO)

Meio mínimo mais biotina e metionina (MM+BIO+MET)

Meio mínimo mais biotina e 150 µg/ml de metionina (MM+BIO+MET 2X)

Meio mínimo mais biotina e cisteína (MM+BIO+CYS)

Meio mínimo mais biotina, metionina e 1,5 µg/ml de casaminoácidos (MM+BIO+MET+CASA)

Meio mínimo mais biotina, metionina e 1µl/ml de solução de vitaminas (MM+BIO+MET+VIT)

Meio mínimo mais biotina, metionina e 2,5µl/ml de solução de ácidos nucleicos

Meio mínimo mais biotina, metionina e 50µg/ml de um dos seguintes aminoácidos: arginina, alanina, asparagina, ácido glutâmico, fenilalanina, glicina, leucina, prolina, serina, tirosina, treonina e triptofano

Meio mínimo mais biotina, metionina e 50 $\mu$ g/ml de todos os aminoácidos citados

### **3.2.19. Meios para observação da intensidade de conidiogênese (CLUTTERBUCK, 1972)**

Meio mínimo (item 3.2.1) mais biotina e metionina;

Meio completo (item 3.2.2)

Meio completo com pH igual a 5,0

Meio completo com 0,5M de NaCl

Meio completo com pH igual a 5,0 e 0,5M de NaCl

Meio completo com 2% de glicose

Meio completo com 1% de ágar

Meio completo com 2,5% de ágar

### **3.2.20. Meios para haploidização**

Para haploidização dos diplóides heterozigotos foram utilizados dois meios:

Meio completo com Benlate;

Meio completo com pFA (parafluorofenilalanina).

### **3.2.21. Meio completo com Benlate (HASTIE, 1970)**

Meio completo (item 3.2.2)

Benlate, na concentração de 0,5 $\mu$ g do produto ativo por ml de meio;

### 3.2.22. Meio completo com pFA (LHOAS, 1961)

Meio completo (item 3.2.2)

pFA (*para*-fluorofenilalanina), na concentração de 50 $\mu$ g por ml de meio.

### 3.2.23. Solução salina

|                |         |
|----------------|---------|
| NaCl           | 0,9g    |
| Água destilada | 100,0ml |

### 3.2.24. Solução de Tween 80

|                |         |
|----------------|---------|
| Tween 80       | 0,1ml   |
| Água destilada | 100,0ml |

### 3.2.25. Solução de Benlate (HASTIE, 1970)

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Benlate (50% Benomyl) | 20,0mg |
| Água destilada        | 10,0ml |

O Benlate foi dissolvido em uma gota de acetona. Após este procedimento, foi completado o volume com água destilada. A solução foi então aquecida em banho-maria fervente por 15 minutos, esfriada e filtrada em papel de filtro esterilizado, sendo mantida a 4°C.

### 3.2.26. Solução de pFA (LHOAS, 1961)

|  |         |
|--|---------|
| pFA ( <i>para</i> -fluorofenilalanina) | 1,0g    |
| Água destilada                         | 100,0ml |

A solução foi aquecida em banho-maria fervente por 15 minutos e estocada a 4°C.

### 3.2.27. Solução de ácidos nucleicos

Solução 1:

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Ácido nucleico de levedura | 2,0g   |
| Solução 1N de NaOH         | 15,0ml |

Solução 2:

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Ácido nucleico de leveduras | 2,0g   |
| Solução 1N de HCl           | 15,0ml |

Ambas as soluções foram aquecidas por 20 minutos em banho-maria fervente, após o que, foram misturadas e o pH ajustado para 6,0. A solução foi então filtrada, utilizando funil, papel de filtro e frasco previamente esterilizados e seu volume, completado para 40ml com água destilada esterilizada. A solução assim preparada foi conservada com 2ml de clorofórmio, em frasco escuro, a 4°C.

### 3.3. Soluções para análises citológicas

#### 3.3.1. Lactofenol-azul algodão (DRING, 1971)

Solução-estoque:

|  |         |
|--|---------|
| Fenol em cristais                        | 20,0ml  |
| Solução aquosa saturada de ácido pícrico | 20,0ml  |
| Ácido láctico                            | 20,0ml  |
| Glicerol                                 | 40,0ml  |
| Azul algodão                             | 500,0mg |

Solução corante:

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Solução estoque | 1,0ml  |
| Água destilada  | 10,0ml |

O fenol foi dissolvido por aquecimento na solução aquosa de ácido pícrico. Após o resfriamento, foram adicionados os outros ingredientes e, no final, o azul algodão. Ambas as soluções foram mantidas à temperatura ambiente.

#### 3.3.2. Fixador para coloração de núcleos (TANAKA, 1980)

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| Álcool etílico absoluto | 6,0ml |
| Ácido acético glacial   | 2,0ml |

Esta solução foi preparada imediatamente antes do uso e descartada.

### 3.3.3. Tampão fosfato 0,2M pH=7,0

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| Solução A                        |         |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 5,68g   |
| água destilada                   | 200,0ml |
| Solução B                        |         |
| NaHPO <sub>4</sub>               | 2,72g   |
| água destilada                   | 100,0ml |

Foram adicionadas 7 partes da solução A a 3 partes da solução B. Após o ajuste do pH, o tampão foi estocado a 4°C.

### 3.3.4. Solução de Giemsa

|                  |         |
|------------------|---------|
| Solução estoque: |         |
| Giemsa           | 3,8g    |
| Metanol          | 250,0ml |
| Glicerol         | 250,0ml |

O corante foi dissolvido no metanol e em seguida, acrescentado o glicerol. Após o preparo, a solução estoque foi colocada em frasco escuro e permaneceu em repouso por 72 horas antes de usar.

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Solução corante:           |        |
| Solução estoque            | 1,0ml  |
| Tampão fosfato 0,2M pH=7,0 | 10,0ml |

A solução corante foi preparada imediatamente antes do uso e descartada.

### **3.3.5. Fixador para microscopia eletrônica de varredura**

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Glutaraldeído            | 2,0%   |
| paraformaldeído          | 2,0%   |
| CaCl <sub>2</sub> pH=7,2 | 0,001M |
| Tampão cacodilato        | 0,050M |

Após o preparo, esta solução foi mantida a 4°C.

### **3.3.6. Tampão cacodilato**

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| Solução estoque 0,2M  |          |
| Cacodilato de sódio   | 42,8g    |
| Água destilada q.s.p. | 1000,0ml |

O cacodilato de sódio foi dissolvido em 900,0ml de água destilada, o pH foi ajustado para 7,2 com 1N HCl e o volume foi completado para 1000,0ml com água destilada. Esta solução foi mantida a 4°C.

### 3.4. Soluções para metodologia molecular

#### 3.4.1. Tampão de Extração de DNA (RAEDER E BRODA, 1985)

|                       |                  |
|-----------------------|------------------|
| Tris HCl pH=8,0       | 200mM            |
| NaCl                  | 250mM            |
| EDTA                  | 25mM             |
| SDS (p/v)             | 1,0%             |
| Água destilada q.s.p. | 5ml/g de micélio |

Os ingredientes foram preparados previamente em soluções mais concentradas e autoclavadas por 20 minutos a 1 atmosfera de pressão. A solução foi então preparada em condições assépticas, imediatamente antes do uso e descartada.

#### 3.4.2. Solução de acetato de potássio

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Acetato de potássio 5M | 60,0ml |
| Ácido acético glacial  | 11,5ml |
| Água destilada         | 28,5ml |

A solução foi autoclavada por 20 minutos a 1 atmosfera de pressão e mantida à temperatura ambiente.

### 3.4.3. Clorofane

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| Fenol saturado pH=7,6 com Tris.HCl | 25,0ml |
| Clorofórmio                        | 24,0ml |
| Álcool isoamílico                  | 1,0ml  |

Esta solução foi estocada em frasco escuro a 4°C.

### 3.4.4. Clorofil

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Clorofórmio       | 24,0ml |
| Álcool isoamílico | 1,0ml  |

Esta solução foi estocada a 4°C.

### 3.4.5. RNase

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| RNase pancreática (RNase A) | 10,0mg/ml |
| Tris.HCl pH=7,5             | 10,0mM    |
| NaCl                        | 15,0mM    |

Após o preparo, a solução foi aquecida em banho-maria fervente por 15 minutos para inativar DNase e estocada a -20°C.

### 3.4.6. Tampão TE (SAMBROOK et al., 1985)

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Tris.HCl pH=7,6 | 10,0mM |
| EDTA pH=8,0     | 1,0mM  |

Este tampão foi preparado a partir de soluções dos 2 componentes, previamente autoclavadas. Após o preparo em condições assépticas, foi conservado à temperatura ambiente.

### 3.4.7. Enzimas de restrição

Foram utilizadas as seguintes enzimas comerciais da marcas Pharmacia e Gibco com seus respectivos tampões:

*Hae III*

*Mbo I*

*Bam HI*

*Taq I*

*Sma I*

### 3.4.8. Tampão de amostra para eletroforese de DNA (6X concentrado)

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Azul de bromofenol | 250,0mg |
| Xileno cianol FF   | 250,0mg |
| Ficoll             | 15,0g   |
| Água destilada     | 100,0ml |

Após o preparo, o tampão foi dividido em alíquotas de 1ml e estocado a 4°C.

### 3.4.9. Tampão TAE

|              |        |
|--------------|--------|
| Tris-acetato | 40,0mM |
| EDTA         | 1,0mM  |

Este tampão foi mantido à temperatura ambiente.

### 3.4.10. Primers

Os *primers* para amplificação do fragmento do gene *brlA* foram sintetizados pela Gibco, liofilizados e posteriormente ressuspensos em água MilliQ. Os *primers* escolhidos foram os seguintes:

*Upper primer* 5' GGT CGG GAG ATG AAG AAA TG 3'

Posição no gene: -991

*Lower primer* 5' AGG AAT GAA AGA GGG CTA AT 3'

Posição no gene: +145

Os *primers* para a PCR para análise do produto de ligação do fragmento no plasmídeo pUC 18 e para seleção dos clones de transformantes foram sintetizados pela Promega e foram os seguintes:

*Forward primer* 5'GTT TTC CCA GTC ACG AC 3'

*Reverse primer* 5'CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

Os *primers* para a reação de sequenciamento foram sintetizados pela Pharmacia e foram os seguintes:

*Forward primer* 5' Cy5-d [ CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'

*Reverse primer* 5' Cy5-d [ CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

### 3.4.11. Plasmídio

O plasmídio utilizado como vetor para a clonagem do fragmento do gene *brlA* foi pUC 18 sintetizado pela Pharmacia.

### 3.4.12. Reações de amplificação (PCR)

#### 3.4.12.1. Reação de amplificação para obtenção do fragmento do gene *brlA*

|  |         |
|--|---------|
| dNTP   | 0,2mM   |
| Primer 1   | 200,0nM |
| Primer   | 200,0nM |
| DNA genômico   | 200,0ng |
| Tampão da enzima (10mM Tris.HCl pH=8,6;<br>50mMKCl; 0,001% gelatina) | 1X      |
| Taq polimerase (Gibco)   | 0,5U    |
| MgCl <sub>2</sub>  | 0,1mM   |
| Água MilliQ q.s.p.   | 25,0μl  |

### 3.4.12.2. Reação de amplificação para seleção dos clones transformantes

|  |              |
|--|--------------|
| dNTP                                       | 0,2          |
| <i>Forward primer</i>                      | 200,0nM      |
| <i>Reverse primer</i>                      | 200,0nM      |
| DNA (diretamente de material das colônias) | 0,1 $\mu$ l  |
| Tampão da enzima                           | 1X           |
| Taq polimerase                             | 0,5U         |
| Água MilliQ q.s.p.                         | 25,0 $\mu$ l |

### 3.4.12.3. Reação de amplificação para sequenciamento

|                                    |              |
|------------------------------------|--------------|
| dNTP                               | 0,2mM        |
| <i>Primer (forward ou reverse)</i> | 10,0pmoles   |
| DNA                                | 1,0 $\mu$ g  |
| ddA                                | 2,0 $\mu$ l  |
| ddC                                | 2,0 $\mu$ l  |
| ddG                                | 2,0 $\mu$ l  |
| ddT                                | 2,0 $\mu$ l  |
| Tampão da enzima                   | 1X           |
| Taq polimerase                     | 0,5U         |
| Água MilliQ q.s.p.                 | 28,0 $\mu$ l |

**3.4.13. Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com prata**  
(SANTOS et al., 1993 modificado)

**3.4.13.1. Solução de fixação**

|                    |               |
|--------------------|---------------|
| Álcool absoluto    | 15,0ml        |
| Ácido acético      | 750,0 $\mu$ l |
| Água MilliQ q.s.p. | 150,0ml       |

Esta solução foi preparada imediatamente antes do uso e descartada.

**3.4.13.2. Solução de prata**

|                    |         |
|--------------------|---------|
| AgNO <sub>3</sub>  | 0,3g    |
| Água MilliQ q.s.p. | 150,0ml |

Esta solução foi preparada imediatamente antes do uso e descartada.

**3.4.13.3 Solução de revelação**

|                    |               |
|--------------------|---------------|
| NaOH               | 4,5g          |
| Formaldeído        | 450,0 $\mu$ l |
| Água MilliQ q.s.p. | 150,0ml       |

### 3.4.14. Meios de cultura para bactérias

#### 3.4.14.1. Meio LB

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| Peptona               | 10,0g    |
| Extrato de levedura   | 5,0g     |
| NaCl                  | 10,0g    |
| Água destilada q.s.p. | 1000,0ml |

O pH foi ajustado para 7,5, foram acrescentados 15g de agar e autoclavado a 1 atmosfera por 20 minutos. Após a autoclavagem, foi mantido à temperatura ambiente.

#### 3.4.14.2. Meio SOC

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| MgCl <sub>2</sub> . 0,1M | 1,0ml   |
| MgSO <sub>4</sub> 1M     | 10,0μl  |
| Glicose 10%              | 200,0μl |
| Meio SOB q.s.p.          | 10,0ml  |

As soluções foram preparadas e esterilizadas por filtração. O meio SOB foi autoclavado e adicionado frio às soluções em condições assépticas.

### 3.4.14.3. Meio SOB

|                      |          |
|----------------------|----------|
| Triptona             | 2,0%     |
| Extrato de leveduras | 0,5%     |
| NaCl                 | 584,0mg  |
| Kcl                  | 186,0mg  |
| Água MilliQ q.s.p.   | 1000,0ml |

Após o preparo, o meio foi autoclavado e mantido à temperatura ambiente.

### 3.4.15. Solução de Tris-cálcio

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Tris.HCl pH=7,5   | 10mM  |
| CaCl <sub>2</sub> | 100mM |

As soluções são preparadas previamente, autoclavadas e mantidas à temperatura ambiente. O preparo da solução é feito em condições assépticas.

### 3.5. Preparação das placas de meio sólido

O meio sólido fresco, recém-autoclavado foi vertido nas placas, na quantidade de 20ml por placa de 100mm de diâmetro. As placas com meio foram incubadas a 37°C por 24 horas para efeito de teste de esterilidade, antes de serem inoculadas.

Obs: Embora após este procedimento, as placas possam ser estocadas a 4°C por vários dias, tomamos o cuidado de apenas utilizar placas frescas porque a

desidratação progressiva do meio de cultura interfere na esporulação do fungo inoculado nesta placa (CLUTTERBUCK, 1970).

### **3.6. Inoculação e incubação**

As linhagens utilizadas foram inoculadas por quatro métodos, dependendo da finalidade. O primeiro, de semeadura, consiste em espalhar, com o auxílio de um alça de Drigalski, 0,1ml de uma suspensão de conídios ou de ascósporos, sobre a superfície de meio sólido em placa de Petri. No segundo, por picada, a inoculação foi feita em posições definidas da placa, em 1 ou 4 pontos, com o auxílio de um fio de níquel-cromo ou palito esterilizado, ou ainda 27 pontos com um replicador multifio, contendo 27 fios de níquel-cromo em um suporte de madeira. No terceiro método, *pour plate*, a suspensão de conídios foi adicionada ao meio de cultura a 45°C, portanto, ainda líquido e, em seguida, vertido em placas de Petri. O quarto tipo de inoculação, em estria, foi feito com o auxílio de palito ou fio de níquel-cromo, sobre a superfície de meio sólido. Um quinto tipo, para a obtenção de colônias monospóricas será descrito separadamente.

A incubação foi feita, via de regra, a 37°C, com exceção dos testes de temperatura, feitos a 25°C e 42°C.

### **3.7. Purificação das linhagens**

Colônias isoladas foram obtidas por estrias sobre meio completo sólido em placas de Petri, com o auxílio de um palito esterilizado ou fio de platina.

### **3.8. Técnicas de análise de crescimento vegetativo e conidiogênese**

#### **3.8.1. Obtenção de colônias monospóricas**

Foram feitas suspensões de conídios da linhagem em estudo (CLB3) e da controle (*biA1 methG1*) e inoculadas por semeadura sobre um pedaço de membrana de diálise que cobria totalmente a superfície do meio sólido na placa de Petri. A composição do meio foi a mesma do meio de análise para o qual a colônia monospórica foi transplantada. Estas placas foram incubadas por 24 horas à temperatura de 37°C, 25°C ou 42°C.

#### **3.8.2. Cultivo para análise macroscópica**

Colônias monospóricas obtidas de acordo com o item 3.8.1 foram transportadas, uma para cada placa. Cada condição foi ensaiada em 3 placas ao mesmo tempo. Os meios de cultura para uma bateria de testes era feito de uma só vez, autoclavado em conjunto e as placas, incubadas simultaneamente, na mesma estufa, espalhadas aleatoriamente.

Em todas as condições analisadas foram feitos cultivos da linhagem CLB3 e, como controle, da linhagem *biA1 methG1*. O tempo de incubação foi de três dias.

Foram observados os seguintes parâmetros:

diâmetro da colônia;

bordos da colônia;

cor do micélio;

presença de conídios;

quantidade de conídios;

cor dos conídios;

reverso da colônia;

exportação de melanina para o meio.

### **3.8.3. Observação ao microscópio estereoscópico**

As mesmas placas analisadas macroscopicamente foram também observadas ao microscópio estereoscópico.

Nestas condições, foram observados:

quantidade de conidióforos;

altura dos conidióforos;

tamanho da "cabeça";

número de cadeias por vesícula;

número de conídios por cadeia;

presença de hifas aéreas.

### **3.8.4. Observações ao microscópio ótico**

#### **3.8.4.1. Observação da colônia já desenvolvida**

Foram feitas suspensões de conídios da linhagem CLB3 e *biA1 methG1* e inoculadas por semeadura em placa com meio sólido. Após o espalhamento foram colocados 6 pedaços de membrana de diálise de 1cm<sup>2</sup> esterilizados sobre a superfície inoculada.

Após 48 horas de incubação, os pedaços de membrana de diálise foram retirados e colocados sobre lâmina com lactofenol-azul algodão ou com glicerina, cobertos com lamínula e analisados ao microscópio.

Foram observados os seguintes aspectos:

- quantidade de conidióforos;
- altura dos conidióforos;
- célula pé;
- diâmetro da haste;
- diâmetro da vesícula;
- número de métulas por vesícula;
- tamanho das cadeias de conídios;
- tamanho dos conídios;
- coloração dos conidióforos;
- presença de hifas aéreas;
- ramificações do micélio vegetativo.

#### **3.8.4.2. Observação das fases do desenvolvimento**

A preparação foi feita como no item 3.8.4.1.

A análise foi feita a partir da retirada de um pedaço de membrana de diálise nos seguintes tempos:

4 horas para observar a germinação do esporo;

10 horas para observar o crescimento vegetativo;

18 horas para observar o início da conidiogênese;

24 horas para observar o final da conidiogênese;

36 horas para observar a conidiogênese mais tardia.

#### **3.8.5. Estimativa de crescimento radial e peso úmido**

Colônias monospóricas obtidas como no item 3.8.1. foram transportadas para o centro de placas com meio sólido, sobre um pedaço de membrana de diálise do mesmo diâmetro da placa.

Foram feitas medições de diâmetro das colônias. A seguir, essas membranas foram removidas, e pesadas em balança de precisão. Para cada condição para obtenção de peso úmido havia 3 placas de CLB3 e 3 placas de *biA1 methG1*.

#### **3.8.6. Estimativa de quantidade de conídios**

As colônias obtidas sobre membrana de diálise no item 3.8.5. eram lavadas com 10 ml de 0,1% tween 80 em placa com pérolas de vidro de 3mm de diâmetro e a suspensão de conídios era analisada em hematímetro.

### **3.8.7. Observação da resposta a diferentes condições nutricionais**

Foram feitas análises macroscópica (item 3.8.2.), ao microscópio estereoscópico (item 3.8.3.), microscópica (item 3.8.4.), conidiogênese (item 3.8.4.2.), estimativa de crescimento radial e peso úmido (item 3.8.5.) e quantidade de conídios nas composições de meio descritas no item 3.8.6. A incubação foi feita a 37°C.

### **3.8.8. Observação da resposta a estabilizador osmótico e pH**

Foram feitas as mesmas análises no item 3.8.7. com os seguintes meios:

MM + biotina (MM + BIO);

MM + BIO + NaCl;

MM + biotina + metionina (MM + BIOMET);

MM + BIOMET + NaCl;

MC pH = 6,5;

MC + NaCl pH = 6,5;

MC pH = 5,0;

MC + NaCl pH = 5,0.

### **3.8.9. Observação da resposta a temperatura**

Foram feitas as mesmas análises do item 3.8.7, nas seguintes condições:

MC pH = 6,5 a 25°C, 37°C e 42°C;

MC + NaCl pH = 6,5 a 25°C, 37°C e 42°C.

### **3.8.10. Observação da resposta a carência de oxigênio**

Foram feitas análise macroscópica, observação ao microscópio estereoscópico, medida de diâmetro da colônia e peso úmido e contagem de conídios nas seguintes condições:

Placa 100mm com 20ml de MC;

Placa 100mm com 20ml de MC vedadas;

Placa 60mm com 20ml de MC.

A incubação ocorreu a 37°C por três dias.

### **3.8.11. Luz**

Foram analisadas macroscopicamente, placas de MC obtidas de acordo com o item 3.8.2., em presença e ausência de luz.

### **3.8.12. Análise da conidiogênese em meio com haploidizante**

Foi analisado macroscópica e microscopicamente, o comportamento de variação do mutante CLB3 em MC + *pFA*. A incubação foi feita a 37°C.

### **3.8.13. Análise da resposta a neomicina**

Para observar uma possível melhora na conidiogênese, o mutante CLB3 foi cultivado em MC com 600 $\mu$ M de neomicina e observado macroscopicamente. A temperatura de incubação foi de 37°C.

### **3.8.14. Técnica de coloração de núcleos**

Foram observados os núcleos nos conídios, nos conidióforos normais e afetados e nas hifas de CLB3 e do setor diplóide CLV3, em culturas destas linhagens em MC, conforme descrito no item 3.8.4.1. A seguir, as membranas de diálise com 36 horas de crescimento foram fixadas na solução de álcool e ácidos (item 3.3.2.) durante 30 minutos. As membranas passaram então, por uma série alcoólica (etanol 90%, 70% e 50%) de 5 minutos para cada concentração. A hidrólise foi feita em HCl 1N por 15 minutos a 63°C, em banho-maria. Após a hidrólise, as membranas foram lavadas em água destilada esterilizada, 3 vezes durante 10 minutos. A tamponagem foi feita em tampão fosfato (item 3.3.3.) por pelo menos 1 hora. Para finalizar, as membranas foram imersas na solução corante (item 3.3.4.) durante 20 minutos e lavadas em tampão fosfato para eliminar o excesso de corante. As membranas foram colocadas sobre lâmina e cobertas com lamínula, fotografadas em seguida, ao microscópio ótico.

### **3.9. Técnicas de Análise Genética**

#### **3.9.1. Obtenção de heterocário**

Foram coletados conídios de ambas as linhagens a serem cruzadas e colocados em 3ml de meio mínimo mais 2% de meio completo (item 3.2.4). Nos casos em que havia uma deficiência comum às duas linhagens, este nutriente foi acrescentado ao meio. Normalmente, este tubo contendo o inóculo foi mantido em repouso por 3 dias a 37°C para a formação de uma película na superfície do meio de cultura que é o heterocário. Quando o objetivo do cruzamento era a obtenção de diplóide heterozigoto e havia dificuldade para obtê-lo, este tubo foi incubado sob agitação, conforme a técnica de ROBERTS (1964).

#### **3.9.2. Obtenção de diplóide**

O heterocário obtido de acordo com o item 3.9.1 foi cortado em 4 partes que foram colocadas em pontos distintos de uma placa com meio mínimo e incubadas por 5 dias a 37°C. Quando as duas linhagens cruzadas apresentavam diferentes colorações de conídios, foi possível visualizar regiões de crescimento mais vigoroso, com esporos de uma só cor, de onde eram coletados conídios com a alça ou palito e purificado por inoculação em estria, em placas de MM.

No entanto, em alguns cruzamentos, o heterocário crescia indefinidamente sem originar tais setores. Nestes casos, após os 5 dias de incubação, as placas foram lavadas com 10ml de 0,1% tween 80 e enxaguadas com mais 10ml de solução salina 0,9%. Estes 20ml de suspensão de esporos foram filtrados em lã de vidro estéril. A seguir,  $2 \times 10^7$  conídios foram adicionados a 200ml de meio mínimo a 42°C e distribuídos em placas de Petri na quantidade de 15ml por placa. Após a solidificação do meio, mais 15ml de meio

mínimo a 42°C foram vertidos em cada placa (*top agar*). Finalmente, após 72 horas de incubação a 37°C, apenas os conídios diplóides foram capazes de originar colônias na superfície destas placas. Para confirmar que se tratava de uma colônia dipóide, os conídios foram analisados ao microscópio ótico, em grupos de 3 ou 4 para observação do diâmetro.

### **3.9.3. Haploidização**

Para obtenção de segregantes haplóides, o diplóide foi inoculado em quatro pontos nas placas com meio completo acrescido de pFA ou Benlate (item 3.2.15). Após 7 dias de incubação, os setores haplóides foram isolados e purificados em placas de meio completo por estrias. Após a purificação, cada setor foi inoculado em quatro pontos em uma placa de meio completo e incubado por 7 dias a 37°C para haploidizar espontaneamente os que ainda fossem aneuplóides. Uma segunda etapa de haploidização em presença de pFA ou Benlate foi seguida por novo teste de haploidização espontânea. Depois desta bateria de cultivos, o diâmetro dos conídios foi avaliado ao microscópio e só então, os segregantes estáveis, com conídios haplóides foram submetidos a análise genética.

### **3.9.4 Obtenção de cleistotécios**

Para obter cleistotécios híbridos, foi preparado o heterocário, conforme o item 3.10.1. A massa micelial formada na superfície do meio líquido no tubo de ensaio foi cortada em quatro partes e colocada em pontos distintos de uma placa de meio mínimo. Em seguida, a placa foi vedada e incubada a 37°C

por 15 a 18 dias. Ao final deste período, foram observados inúmeros cleistotécios autofecundados e híbridos sobre a película e no micélio crescido na placa.

### **3.9.5. Isolamento de cleistotécios híbridos**

Para obtenção dos produtos de cleistotécios híbridos, foram coletados com fio de platina, alguns dos maiores cleistotécios transportando-os para uma placa de ágar 3% (item 3.2.4). Com o auxílio do microscópio estereoscópico, cada cleistotécio foi rolado na superfície do ágar para limpá-los de restos de micélio, conídios e células de hülle. A seguir, cada cleistotécio foi transferido para um tubo de ensaio contendo 1ml de solução salina e esmagado para a liberação dos ascósporos.

### **3.9.6. Análise de complementação em heterocários e diplóides.**

Foram obtidos heterocários e diplóides (ítems 3.9.1 e 3.9.2) a partir do cruzamento de CLB3 que tem o alelo mutante e apresenta conídios verdes e as linhagens MSE e *niaD*, que são normais para conidiogênese e formam conídios brancos e amarelos, respectivamente. Nos heterocários, os conidióforos analisados foram preferencialmente os que apresentavam conídios das duas cores na mesma "cabeça" (conjunto de cadeias de conídios de um conidióforo)

Para análise de complementação, foram observados ao microscópio estereoscópico:

- tamanho da "cabeça"
- número de cadeias por vesícula
- número de conídios por cadeia
- presença de conidióforos secundários

presença de hifas aéreas

### **3.9.7. Teste de alelismo**

#### **3.9.7.1. Por complementação**

Obtivemos um heterocário e um diplóide pelo cruzamento da linhagem CLB3 e *brlA42*, a mesma utilizada por CLUTTERBUCK (1969a) para os testes de alelismo de todos os mutantes *brl* de sua coleção. O método está descrito nos itens 3.9.1, 3.9.2 e 3.9.3. A seleção foi feita em meio mínimo e a análise, ao microscópio estereoscópico. Observou-se a possível complementação, que resultaria em conidióforos normais.

#### **3.9.7.2. Por recombinação**

Foram cruzadas as linhagens CLB3 e *brlA42* e obtidos ascósporos, conforme os itens 3.9.1, 3.9.4 e 3.9.5. Foram semeados 0,1ml da suspensão de ascósporos em placas de meio completo e incubadas a 37°C por 48 horas. A suspensão de ascósporos foi diluída de forma a obter com este inóculo, em média, 25 colônias por placa.

Estas colônias foram analisadas para o desenvolvimento dos conidióforos. A ausência de recombinantes seria indicativo de alelismo. No caso destas duas linhagens, foi possível distinguí-las a olho nu. Os segregantes duvidosos foram observados ao microscópio estereoscópico.

### **3.9.8. Mapeamento por ciclo parassexual ou análise mitótica**

A linhagem CLB3 foi cruzada com a linhagem mestra MSE que apresenta marcadores em todos os cromossomos. Após a obtenção de segregantes haplóides (ítem 3.9.1, 3.9.2 e 3.9.3), estes foram inoculados um a um em 25 pontos definidos em placas contendo meio completo acrescido de 0,5M NaCl (ítem 3.3.12), pois este meio induz a esporulação nos segregantes oligosporogênicos. Estas placas mestras foram incubadas a 37°C por 3 dias. A seguir, foram feitas réplicas destas placas em meios seletivos para todos os marcadores da MSE e CLB3 (ítem 3.2.7, 3.2.8 e 3.2.9) com o auxílio de um replicador multifio.

Foram analisados 200 segregantes, dos quais, apenas 50 foram selecionados como sendo informativos.

### **3.9.9. Mapeamento por ciclo sexual ou análise meiótica**

Foram obtidos cleistotécios híbridos (ítem 3.9.1, 3.9.4 e 3.9.5). Em seguida, 0,1ml de diluição adequada da suspensão de ascósporos foi inoculada por semeadura em placas de meio completo, obtendo-se em torno de 60 colônias por placa. Após 3 dias de incubação a 37°C, estas colônias foram inoculadas, uma a uma, por picada em placas de 25 pontos com meio completo (placas mestras). Depois de outros 3 dias de incubação, foram feitas réplicas com multialça, destas colônias para meios seletivos (ítem 3.2.10). Foram analisados desta maneira, 3 cleistotécios, a partir de 125 segregantes de cada um.

### **3.9.10. Mapeamento intragênico**

#### **3.9.10.1. Por recombinação**

Empregando 3 linhagens mapeadoras que apresentavam duas marcas flanqueadoras do gene *brlA*: *niiA* e *cnxA* e *B*, e eram portadoras de diferentes alelos, um dos quais mutado na região inicial do gene, outro no meio e outro, na região correspondente à dos *zinc fingers* na proteína. A análise selecionava primeiramente, de grande número de segregantes meióticos, aqueles que apresentavam conidiogênese normal, resultantes, portanto da recombinação dentro do gene, de forma que a combinação da parte selvagem de cada alelo recuperava o alelo selvagem do gene *brl*. Analisando nestes segregantes, a posição das marcas flanqueadoras, era possível deduzir se a mutação do alelo em teste estava à esquerda ou à direita do alelo mapeador.

Obtivemos segregantes meióticos de cada um dos três cruzamentos conforme os itens (3.9.1, 3.9.4 e 3.9.5). Foram analisados 3 cleistotécios de cada cruzamento, a partir de 3000 colônias de cada cleistotécio.

#### **3.9.10.2. Por conversão gênica**

A análise dos alelos resultantes de conversão era feita a partir de segregantes meióticos com conidiogênese normal, como no item 3.9.10.1, a partir dos mesmos cruzamentos. No entanto, neste caso, os segregantes de interesse apresentavam as duas marcas flanqueadoras selvagens (conversão do alelo do mutante CLB3) ou mutantes (conversão do alelo da linhagem mapeadora). A maior frequência de conversão gênica do alelo do mutante CLB3 indicaria seu posicionamento à esquerda (5') do alelo mapeador e vice-versa.

### 3.10. Microscopia eletrônica de varredura

O fungo foi inoculado em meio completo e crescido por 48 horas a 37°C. Foram, então, cortados círculos do tamanho do suporte (*stub*), contendo o micélio e o meio de cultura abaixo dele. Estas amostras foram primeiramente mantidas no fixador (item 3.3.5..) em ausência de luz, por 3 horas. Seguiram-se 3 banhos com cacodilato 0,05% de 10 minutos cada um e a imersão em 1:1 ósmio/tampão cacodilato 0,1% por 1 hora. Após 3 lavagens de 10 minutos em água destilada, para retirada do excesso de ósmio, houve a desidratação, pela passagem do material em acetona 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, nesta ordem, durante 10 minutos em cada concentração. Foi feita, então, a secagem ao ponto crítico em CO<sub>2</sub> líquido. O material foi fixado ao suporte com fita adesiva especial e submetido à metalização com ouro (*sputtering*).

As amostras da linhagem CLB3 e *biA1 methG1* assim preparadas, foram analisadas ao microscópio eletrônico e fotografadas.

### 3.11. Técnicas de biologia molecular

#### 3.11.1. Extração de DNA (SPECHT et al., 1982)

Foi feita uma suspensão de conídios em 0,1% Tween 80 de  $10^7$  conídios por mililitro. Foram inoculados 2 ml desta suspensão em 300ml de meio completo líquido e incubados sob agitação de 120rpm, a 37°C por 18 horas. Após este período o micélio foi coletado por filtração em filtro de Büchner a vácuo e lavado com água destilada. O micélio foi pesado e transferido para um grau com nitrogênio líquido e pulverizado com pistilo. Para 2g de micélio foram acrescentados 10ml de tampão de extração (item 3.4.1). Depois de homogeneizar esta mistura, o material foi incubado a 65°C por 30 minutos. Em seguida, foram acrescentados 3ml de acetato de potássio (item 3.4.2) e mantido no gelo por 30 minutos a 1 hora. O material foi centrifugado a 11.950g por 10 minutos e filtrado em gaze para remoção dos restos celulares.

A precipitação do DNA ainda contaminado com proteínas foi feita com 2 volumes de isopropanol durante 30 minutos a -20°C e centrifugação a 11.950g por 20 minutos. O tubo foi invertido para descarte do sobrenadante e o sedimento foi seco à temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspenso gentilmente em 500ul de TE (item 3.4.6), transferido para um *ependorf* e submetido à ação de RNase (50ug/ml) (item 3.4.5) durante 1 hora a 37°C.

A extração das proteínas foi feita em três etapas: com 1 volume de fenol saturado (pH=7,6), com 1 volume de clorofane (item 3.4.3), com 1 volume de clorofil (3.4.4). Após o acréscimo da mistura, era feita a homogeneização pela inversão cuidadosa e lenta do *ependorf* várias vezes e centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente e coleta da fase superior. Finalmente, foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto gelado. Depois de 30 minutos a -

20°C, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante, descartado e o sedimento, seco à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 500ul de TE e quantificado em espectrofotômetro.

### **3.11.2. Amplificação (PCR) (*Polymerase Chain Reaction*)**

Foi amplificado, um fragmento de 1137pb que vai de -991 a +145 do gene *brlA* do mutante CLB3, da linhagem *biA1 methG1* (controle selvagem) e da linhagem *brlA42* (mutante *bristle* com o dano mapeado fora desta região). Após a montagem da reação (ítem 3.4.12.1), cada *epENDORF* recebeu uma gota de silicone e foi colocado no termociclador.

O programa constou dos seguintes passos:

Passo 1: 95°C por 2 minutos (desnaturação inicial)

Passo 2: 95°C por 40 segundos (desnaturação)

Passo 3: 57°C por 30 segundos (anelamento)

Passo 4: 72°C por 30 segundos (extensão)

Passo 5: repetição dos passos 2 a 4 por 35 ciclos

Passo 6: 72°C por 3 minutos (extensão final)

Passo 7: 4°C por tempo indefinido (final).

O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose de uma amostra de cada tubo de reação.

### 3.11.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose

As amostras foram preparadas acrescentando-se a 5 $\mu$ l de reação de amplificação, 3 $\mu$ l de tampão de amostra (item 3.4.8). A seguir, foram aplicadas cuidadosamente em um gel de agarose 1,5% em tampão de corrida (item 3.4.9), imerso no mesmo tampão. A corrida foi feita com 75V por 30 minutos. O gel foi corado por imersão em tampão de corrida suficiente, com 2 $\mu$ l de brometo de etídio por 20 minutos e fotografado no transiluminador.

### 3.11.4. RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism*)

O fragmento amplificado das linhagens CLB3 e *brlA42* e do controle selvagem (*biaA1 methG1*) foram submetidos à digestão por 5 das enzimas de restrição que apresentam sítios de reconhecimento nesta região (item 3.4.7). Após a digestão nas condições de temperatura específicas de cada enzima, por 1 hora, os *ependorfs* foram mantidos no gelo até a preparação da eletroforese.

O resultado das digestões foi analisado após eletroforese em gel de agarose (item 3.12.3), com diferença apenas na quantidade de cada amostra (10 $\mu$ l) e na concentração da agarose (2%).

### 3.11.5. Clonagem para sequenciamento

A clonagem do fragmento amplificado do gene *brlA* da linhagem CLB3 foi feita em três etapas: a fosforilação do produto de PCR, ligação ao plasmídeo pUC 18 e transformação de bactérias *E.coli* DH5 $\alpha$ . As duas primeiras etapas foram feitas empregando-se o *Sure Clone Ligation Kit* da Pharmacia.

### **3.11.5.1. Fosforilação do produto de PCR**

A fosforilação do fragmento amplificado foi feita adicionando-se 16µl da reação de PCR a 2µl de tampão da quinase, 1µl de DNA quinase e 1µl de Klenow, perfazendo um volume de 20µl. Esta reação foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após a reação de fosforilação, a enzima foi removida por uma extração com clorofane (ítem 3.4.3) seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto e coleta da fase aquosa.

### **3.11.5.2. Ligação do fragmento ao vetor**

O fragmento fosforilado foi ligado ao plasmídeo pUC 18, no sítio de *Bam HI* adicionando-se 2µl do produto obtido no ítem anterior a 1µl de vetor, 10µl de tampão de ligase, 1µl de T4 DNA ligase, 1µl de DTT (ditiotretitol) e 5µl de água MilliQ. A reação foi incubada durante uma noite (*overnight*) a 16°C. Após a reação, a enzima foi inativada a 60°C por 30 minutos.

### **3.11.5.3. Obtenção de bactérias competentes**

Bactérias *E.coli* DH5α foram incubadas em meio LB (ítem 3.4.14.1.) por 16 horas a 37°C sob agitação. A seguir, 1ml desta cultura era inoculada em 50ml de meio LB e incubada a 37°C sob agitação até que a densidade da cultura atingisse uma absorbância de 0,3 a 0,4 O.D. a 600 nm. Foi então feita a coleta das bactérias por centrifugação a 2500g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi esgotado ao máximo e foram acrescentados 15ml de solução tris-cálcio (ítem 3.4.15) para ressuspender delicadamente o sobrenadante. Após

20 minutos no gelo, foi feita nova centrifugação a 2500g por 15 minutos a 4°C e o sedimento foi ressuspendido em 1ml de solução tris-cálcio. As bactérias foram então, mantidas em gelo por 1 hora tempo necessário para estabelecer a competência.

#### **3.11.5.4. Congelamento de bactérias competentes**

Às bactérias competentes obtidas conforme o ítem anterior foram acrescentados 35µl de DMSO (dimetilsulfóxido) e colocadas no gelo por 5 minutos. Foram acrescentados outros 35µl de DMSO e distribuído em alíquotas de 100µl em frascos de congelamento e imersos em nitrogênio líquido. Após este procedimento, os frascos foram mantidos a -70°C.

#### **3.11.5.5. Transformação**

Foram descongelados 100µl de bactérias competentes no gelo. A seguir, foram acrescentados 5µl da reação de ligação (ítem 3.12.5.2) e mantidos no gelo por 30 minutos. O material foi então, submetido a um choque térmico de 42°C por 2 minutos, seguido de 2 minutos no gelo. A suspensão de bactérias transformadas foi transferida para 1ml de meio SOC pré aquecido a 37°C e incubada a 37°C por 1 hora sob agitação. Após este período, 100µl desta cultura foram inoculados por placa de meio LB com 25µg/ml de ampicilina e incubados a 37°C por 18 horas.

### **3.11.5.6. Seleção das bactérias transformantes contendo o inserto**

Para seleção dos clones de interesse, foi feita uma reação de PCR a partir do material das próprias colônias. Após o preparo da reação descrita no item 3.4.14.2, os tubos foram colocados no termociclador. O programa constou dos seguintes passos:

Passo 1: 95°C por 3 minutos (desnaturação inicial)

Passo 2: 55°C por 1 minuto (anelamento)

Passo 3: 72°C por 1 minuto (extensão)

Passo 4: 95°C por 45 segundos (desnaturação)

Passo 5: 55°C por 1 minuto (anelamento)

Passo 6: 72°C por 1 minuto (extensão)

Passo 7: repetição dos passos 4 a 6 por 30 ciclos

Passo 8: 55°C por 1 minuto (anelamento)

Passo 9: 72°C por 3 minutos (extensão final)

### **3.11.5.7. Eletroforese dos produtos de PCR dos transformantes**

As amostras foram preparadas acrescentando-se 5µl de cada produto de PCR a 5µl de tampão de amostra (item 3.4.8). A seguir foram aplicadas cuidadosamente em gel de poliacrilamida 8% , imersos no tampão de corrida (item 3.4.9). A corrida foi feita com 150V por 45 minutos.

### **3.11.5.8. Coloração de prata (SANTOS et al., 1993)**

O gel, após a corrida, foi colocado em solução de fixação (item 3.4.13.1) e agitado levemente durante 10 minutos. A solução foi decantada e reservada para reutilização no final do processo. Foi adicionada, então, a solução de prata (item 3.4.13.2) e agitada levemente durante 5 minutos. A solução foi decantada e descartada e o gel foi lavado rapidamente com água MilliQ por duas vezes. A solução de revelação (item 3.4.13.3) foi acrescentada e o recipiente, agitado levemente até o aparecimento das bandas, o que ocorreu com aproximadamente 5 minutos. A solução foi descartada e a solução de fixação foi novamente colocada e o gel permaneceu nestas condições, por 18 horas a 4°C para ser fotografado.

### **3.11.6. Sequenciamento**

O sequenciamento foi feito em três etapas: uma minipreparação de plasmídios contendo o fragmento a ser sequenciado, utilizando o *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System da Promega*, uma PCR para sequenciamento pelo método do dideoxi utilizando o *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cyclo sequencing kit* da Amersham e uma eletroforese em gel de poliacrilamida 6% no sistema de sequenciamento automático ALF EXPRESS, da Pharmacia.

### 3.11.6.1. Minipreparação de plasmídios

Um dos clones positivos foi inoculado em 5,0ml de LB acrescido de ampicilina e incubado a 37°C por 14 horas. 3,0ml da cultura foram centrifugados a 14.000rpm por 4 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 150µl de tampão de ressuspensão e as bactérias foram lisadas com 150µl de solução de lise. Foram adicionados, então, 150µl de solução de neutralização para precipitação dos restos celulares. Após uma centrifugação a 14.000rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado em outro tubo e a centrifugação foi repetida. Ao sobrenadante obtido, foram adicionados 500µl de resina e homogeneizados por inversão. A seguir, a resina com os plasmídios ligados foram vertidos na coluna e empacotados com a ajuda de uma seringa. A coluna foi lavada com 2,5ml de solução de lavagem e secas por centrifugação a 14.000rpm por 1 minuto. A coluna foi então colocada em tubo *ependorf* de 1,5ml e os plasmídios foram eluídos com 50µl de água MilliQ esterilizada aquecida a 70°C e centrifugação a 14000rpm por 1 minuto.

### 3.11.6.2. Reação de sequenciamento

Foram montadas duas reações de PCR para o sequenciamento, como descrito no item 3.4.12.3, sendo uma com o *primer forward* e outra, com o *primer reverse* do plasmídio pUC 18. Após o preparo das reações, os tubos foram colocados no termociclador. O programa constou dos seguintes passos:

Passo 1: 95°C por 1 minuto e 30 segundos (desnaturação inicial)

Passo 2: 60°C por 36 segundos (anelamento)

Passo 3: 72°C por 76 segundos (extensão)

Passo 4: 95°C por 1 minuto (desnaturação)

Passo 5: repetição dos passos 2 a 4 por 28 ciclos

Passo 6: 60°C por 3 minutos (anelamento)

Passo 7: 72°C por 5 minutos (extensão final)

Após o término da reação no termociclador, foram adicionados 4µl da solução *stop* e feita a desnaturação a 95°C por 3 minutos. Imediatamente após a desnaturação, os tubos foram colocados no gelo, onde foram mantidos até o momento da aplicação no gel, para evitar a renaturação.

### **3.11.6.3. Eletroforese dos produtos da PCR de sequenciamento**

Foi preparada uma placa de eletroforese para sequenciamento com o gel de poliacrilamida 6% *Ready Mix Gel* da Pharmacia. Foram aplicados 10µl de cada tubo na respectiva canaleta na ordem A-C-G-T. A corrida foi feita com 125V. Após a corrida, o gel foi submetido à leitura no aparelho e o resultado foi impresso.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Caracterização do fenótipo do mutante CLB3**

#### **4.1.1. Análise macroscópica**

Em meio completo e 37°C, o mutante CLB3 apresentou um crescimento vegetativo menor que o normal. O diâmetro de uma colônia com 3 dias foi de 3,0cm, enquanto o da linhagem *biA1 methG1* foi de 5,7cm. Com 5 dias, a maior parte das linhagens selvagens já cobriu a superfície de uma placa de 100mm, e CLB3 atingiu 5,2cm de diâmetro com 7 dias.

O micélio apresentou-se espesso e resistente, com grande quantidade de melanina, o que torna a superfície da colônia marron claro e o seu reverso, marron escuro. Em condições de carência nutricional e de oxigênio, o meio de cultura também foi escurecido pela secreção do pigmento.

Uma grande quantidade de hifas aéreas conferia-lhe um aspecto aveludado. A esporulação era esparsa e os conídios, verdes.

#### 4.1.2. Análise ao microscópio estereoscópico

A quantidade de conidióforos mostrou-se reduzida e as cabeças, pequenas, muito menores que as da linhagem *biA1 methG1*, tanto no número de cadeias por vesícula, quanto no número de conídios por cadeia. Observou-se conidióforos diferentes quanto à quantidade de conídios e à altura das hastes. Havia um grande número de hifas aéreas que, nas linhagens normais, são quase imperceptíveis à lupa.

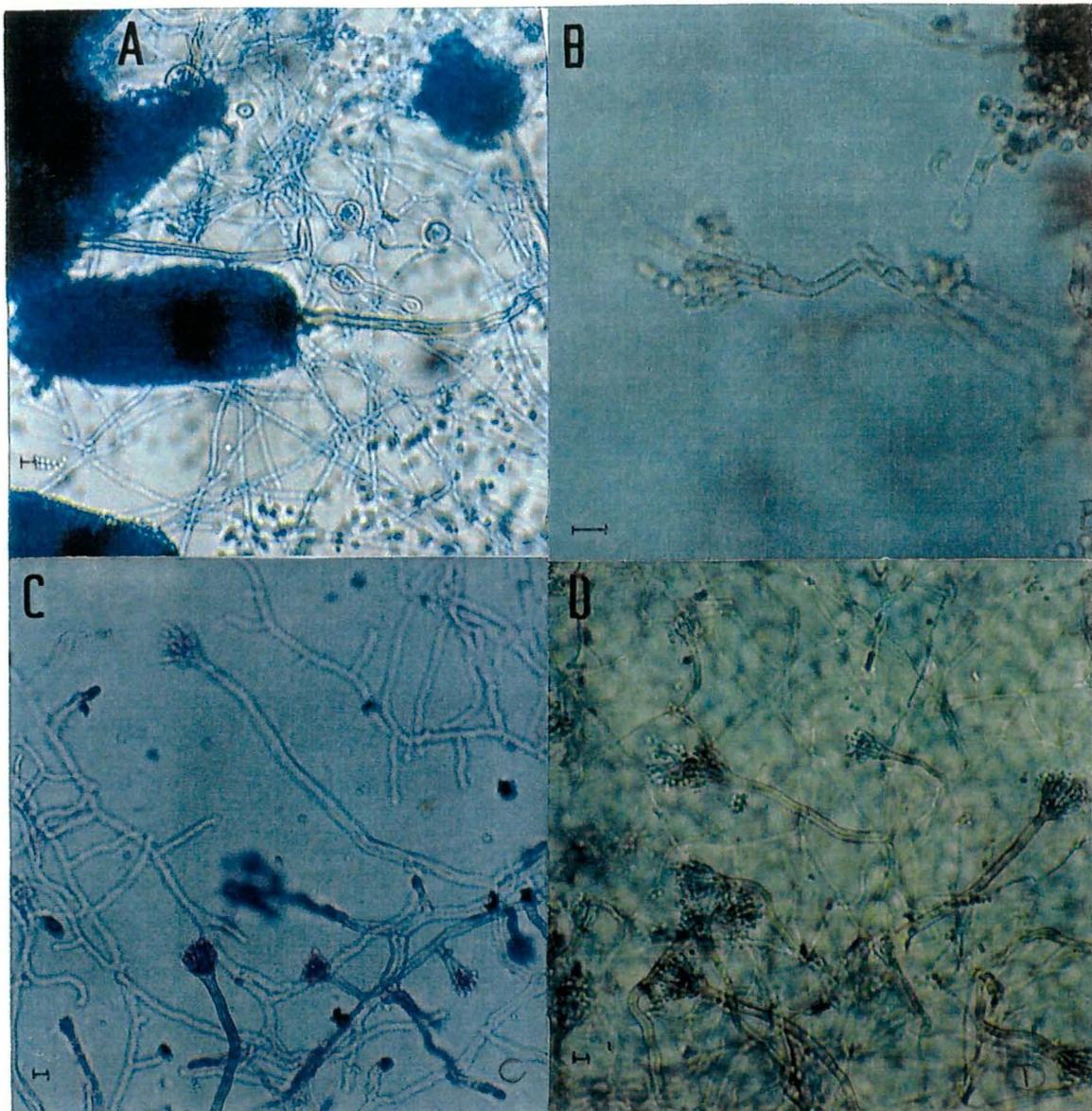
O micélio era marron e, com frequência, observava-se gotículas de exudato marron sobre a superfície da colônia.

#### 4.1.3. Análise ao microscópio ótico

A quantidade de conidióforos, em meio completo a 37°C era menor do que a das linhagens controle.

A Figura 5 apresenta as anormalidades dos conidióforos. O conjunto mostrou-se muito heterogêneo, pois foram observados diversos tipos de alterações, como:

- . hastes normais, ao lado de hastes longas e curtas;
- . vesículas normais, outras malformadas e, algumas vezes, inexistentes;
- . número de métulas, geralmente menor que o normal, em alguns casos três ou quatro, enquanto em uma linhagem normal, este número chega a sessenta.
- . falta de sincronismo na diferenciação das estruturas de um conidióforo; em uma vesícula era possível se observar uma métula ainda brotando, uma métula já com fiálide e uma métula com fiálide e o primeiro conídio;



**Figura 5.** Conidióforos da linhagem controle e da linhagem CLB3 com 36 horas. A. linhagem normal; B. linhagem CLB3, mostrando conidióforos secundários; C. linhagem CLB3, mostrando conidióforos de diferentes comprimentos de haste; D. linhagem CLB3, visão geral, com conidióforos normais e afetados. A barra corresponde a 10 $\mu$ m.

- . alguns conidióforos eram muito aberrantes, com métulas que se desdiferenciavam e cresciam como novas hastes sem estruturas subsequentes, parecendo longos dedos;
- . outros conidióforos apresentavam métulas normais com fiálides e cadeias de conídios, ao lado de novas hastes que formam nova vesícula, com métulas, fiálides e conídios;
- . algumas vezes havia até quatro etapas, em que uma vesícula originava uma 2<sup>a</sup> haste com vesícula, desta brotava uma 3<sup>a</sup> haste com vesícula e uma 4<sup>a</sup> haste com vesícula, métulas, fiálides e conídios;
- . havia grande quantidade de hifas aéreas, principalmente nas regiões em que os conidióforos são mais aberrantes;
- . foram observados, embora em pequeno número, conidióforos absolutamente normais, o que caracteriza variação;

A pigmentação dos conidióforos era normal, como ocorre normalmente nos mutantes intermediários já descritos na literatura.

Uma característica muito importante na caracterização citológica deste mutante foi a ausência de cadeias de métulas em qualquer condição testada. Ficou bem definido que a diferenciação de vesícula para métula podia estar afetada, mas nunca, a passagem de métula para fiálide. Não há nenhum alelo *brl* descrito com este comportamento, o que torna este mutante original.

O micélio vegetativo mostrava-se abundante, com células de parede espessada, mais curtas e de maior diâmetro e com ramificações a intervalos menores que o observado nas linhagens controle. Estas observações justificam o aspecto macroscópico de rigidez.

Apesar da abundância precoce de células de hülle, o ciclo sexual parecia normal, com cleistotécios pequenos e ascósporos viáveis.

## **4.2. Caracterização do fenótipo do segregante CLY14**

O segregante meiótico CLY14 foi obtido com a finalidade de observação do alelo *brlA* de CLB3 em uma linhagem com crescimento vegetativo normal.

### **4.2.1. Análise macroscópica**

Em meio completo e 37°C, o segregante CLY14 apresentou um crescimento vegetativo normal, equivalente ao da linhagem controle.

O micélio vegetativo não era espessado, fazendo lembrar o das linhagens normais, facilmente cortado com uma alça, o que era impossível para CLB3. A quantidade de melanina era normal e o reverso da colônia apresentava-se amarelado, como em *biA1 methG1*. O número de hifas aéreas era reduzido e o de conidióforos, bem maior que o de CLB3 nestas condições.

### **4.2.2. Análise ao microscópio estereoscópico**

A quantidade de conidióforos mostrou-se igual à do controle, mas as cabeças eram menores e havia conidióforos com diversos comprimentos de haste, característica das estruturas de CLB3.

As hifas vegetativas apresentavam-se claras e hialinas. As hifas aéreas estavam presentes em quantidade normal, compatível com a das linhagens normais.

### **4.2.3 Observação ao microscópio ótico**

A quantidade de conidióforos e hifas aéreas mostrou-se normal. As anormalidades dos conidióforos, no entanto, eram as mesmas que caracterizam o mutante CLB3.

O micélio vegetativo era normal, as células apresentam o tamanho, diâmetro e quantidade de pigmento característicos de *biA1 methG1*.

### **4.3. Observação da resposta de CLB3 a diferentes condições nutricionais**

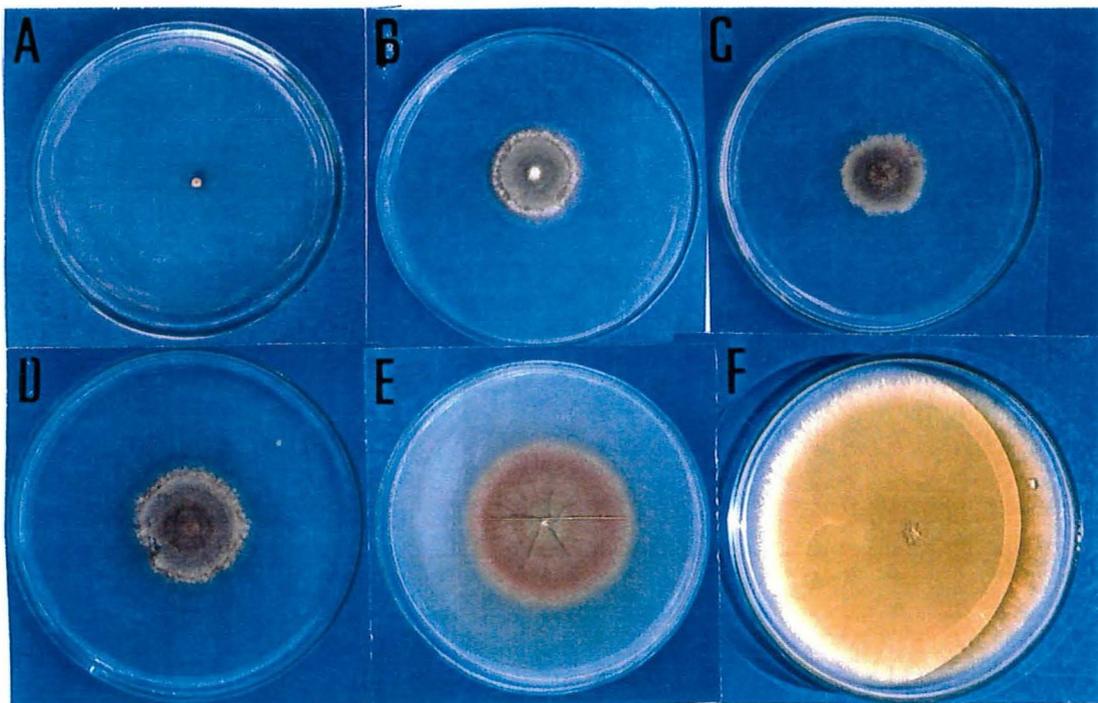
Com o objetivo de analisar o possível efeito de fatores nutricionais sobre os problemas na conidiogênese de CLB3, foram analisados os parâmetros já citados, em meio com diferentes formulações, sempre relacionadas às deficiências nutricionais de CLB3.

#### **4.3.1. Análise macroscópica**

Figura 6 apresenta estes resultados.

MM + BIO: colônias muito pequenas, sem esporos, bordos mergulhados no meio, com pigmento marron no reverso da colônia, mas sem exportação para o meio. Houve uma demora significativa na germinação. Microcolônias que aparecem com 24 horas nos outros meios, neste só podiam ser vistas com 48 horas.

MM + BIO + MET: colônias com tamanho intermediário, bordos irregulares, pigmento marron no micélio, sem exportação para o meio, esporulação esparsa, conídios verdes.



**Figura 6.** CLB3 crescido em diferentes composições de meio por 3 dias.

A. MM + BIO; B. MM + BIO + MET; C. MM + BIO + MET (2x);  
D. MM + BIO + MET + CASA; E. MC; F. Controle (*biA1 methG1*).

MM + BIO + MET (2x): colônias de tamanho e aspecto iguais à anterior, mas com esporulação bem visível.

MM + BIO + MET + CASA: colônias com diâmetro maior, de bordos irregulares, esporulação esparsa, reverso marron, sem exportação.

MM + BIO + MET + 1 AA: colônias com o mesmo aspecto das crescidas em MM + BIO + MET.

MM + BIO + MET + 13 AA: colônia com o mesmo aspecto das crescidas em MM + BIO + MET.

MC: colônias de maior tamanho que em meio com caseína hidrolizada, de bordos mais regulares, esporulação esparsa, reverso marron, com pouca exportação de pigmento para o meio.

#### **4.3.2. Análise ao microscópio estereoscópico**

Estes resultados estão resumidos na Tabela 1.

MM + BIO: raros conidióforos, de diferentes alturas, com cabeça pequena, o que indicava poucas cadeias de conídios e poucos conídios por cadeia; muitas hifas aéreas.

MM + BIO + MET: muitos conidióforos com diferentes tamanhos de cabeça, com predomínio das menores, hastes de diversos comprimentos e muitas hifas aéreas.

MM + BIO + MET (2x): conidióforos em maior número que em MM + BIO + MET; cabeças de diferentes tamanhos, mas predominando as pequenas, hastes de diversos tamanhos; menos hifas aéreas do que em MM + BIO + MET.

MM + BIO + MET + CASA: maior número de conidióforos do que

**Tabela 1.** Crescimento vegetativo e produção de hifas aéreas e conidióforos da linhagem CLB3 em resposta a diferentes composições de meio, após 48 horas de crescimento.

| linhagens | meios                    | crescimento do micélio vegetativo* | hifas aéreas* | número de conidióforos* |
|-----------|--------------------------|------------------------------------|---------------|-------------------------|
| CLB3      | MM+BIO                   | +                                  | +++           | +                       |
|           | MM+BIO +MET              | ++                                 | +++           | ++                      |
|           | MM+BIO +MET 2X           | ++                                 | ++            | +++                     |
|           | MM+BIO+MET +1AA          | ++                                 | +++           | ++                      |
|           | MM+BIO+MET +13AA         | ++                                 | ++            | ++                      |
|           | MM+BIO+MET +CASA         | +++                                | ++            | +++                     |
|           | MC                       | +++                                | ++            | +++                     |
|           | MC + 2%GLICOSE           | ++++                               | +++           | ++                      |
|           | <i>biA1 methG1</i> TODOS | ++++                               | +             | ++++                    |
|           | CLY14 TODOS              | ++++                               | +             | ++++                    |

(\*) + : raras estruturas

++ : poucas estruturas

+++ : muitas estruturas

++++ : quantidade de estruturas igual à das linhagens selvagens

em MM + BIO + MET e menor que em MM + BIO + MET (2x); características dos conidióforos semelhante aos dos dois meios e o número de hifas, intermediário.

MM + BIO + MET + 1 AA: idêntico ao do MM + BIO + MET.

MM + BIO + MET + 13 AA: idêntico ao do MM + BIO + MET.

MC: muito parecido com o do MM + BIO + MET + CASA..

MC + 2% GLICOSE: menor número de conidióforos e maior quantidade de hifas aéreas que em MC.

### **4.3.3. Análise ao microscópio ótico**

#### **4.3.3.1. Colônias já desenvolvidas**

A Tabela 2 apresenta os resultados destas observações.

MM + BIO: grande número de esporos ainda em fase de germinação e colônias jovens com ausência de conidióforos; nas colônias mais velhas, havia poucos conidióforos, com poucas métulas, muitas hifas aéreas e micélio vegetativo espessado com células curtas e muitas ramificações.

MM + BIO + MET e

MM + BIO + MET + 1 AA: micélio mais desenvolvido, com colônias maiores e maior número de hifas, embora permanecesse o caráter de espessamento de parede e muitas ramificações; grande número de conidióforos normais e anômalos. Os normais representavam a minoria, assim como os muito aberrantes; em torno de 60%, no entanto, apresentavam alterações de comprimento de haste, vesícula mal desenvolvida e pequeno número de cadeias de conídios; muitas hifas aéreas.

**Tabela 2.** Observação ao microscópio ótico das estruturas desenvolvidas por CLB3 e controles após 48 horas de crescimento em diferentes condições de meio.

| linhagens | meios               | quantidade de estruturas presentes* |                  |           |         |          |          |
|-----------|---------------------|-------------------------------------|------------------|-----------|---------|----------|----------|
|           |                     | esporos                             | micélio<br>jovem | vesículas | métulas | fiálides | conídios |
|           | MM+BIO              | +++                                 | +                | -         | -       | -        | -        |
|           | MM+BIO<br>+MET      | -                                   | -                | +         | +       | ++       | ++       |
|           | MM+BIO+<br>MET(2X)  | -                                   | -                | +         | +       | ++       | +++      |
| CLB3      | MM+BIO+<br>MET+1AA  | -                                   | -                | +         | +       | ++       | +++      |
|           | MM+BIO+<br>MET+13AA | -                                   | -                | +         | +       | ++       | +++      |
|           | MM+BIO+<br>MET+CASA | -                                   | -                | +         | +       | ++       | +++      |
|           | MC                  | -                                   | -                | +         | +       | ++       | +++      |
|           | MC+2%<br>GLICOSE    | -                                   | -                | +         | +       | ++       | ++       |
|           | <i>biA1 methG1</i>  | TODOS                               | -                | -         | +       | +        | ++       |
| CLY14     | TODOS               | -                                   | -                | +         | +       | ++       | +++      |

(\*) - : ausentes

+ : presentes em pequena quantidade

++ : presentes em quantidade moderada

+++ : presentes em grande quantidade

MM + BIO + MET (2x): os resultados foram muito semelhantes aos do meio anterior, mas o número de hifas aéreas era menor e o de conidióforos, sensivelmente maior; no entanto, as proporções de normais, aberrantes e intermediários permaneceram as mesmas.

MM + BIO + MET + 13 AA: estruturas semelhantes às encontradas no MM + BIO + MET.

MM + BIO + MET + CASA: colônias maiores que nos meios anteriores, mas a conidiogênese foi parecida à que ocorreu em MM + BIO + MET.

MC: parece muito com o anterior em crescimento vegetativo, mas a conidiogênese é um pouco melhor em número de conidióforos.

MC + 2% GLICOSE: crescimento vegetativo maior que o do MC, mas o número de conidióforos foi muito reduzido; os conidióforos mostraram-se tão afetados quanto os dos meios anteriores, mas estavam concentrados em algumas regiões da colônia, enquanto em outras partes, eram completamente ausentes.

#### **4.3.3.2. Análise da conidiogênese**

Os resultados da conidiogênese em diferentes meios estão apresentados na Tabela 3.

O crescimento vegetativo inicial foi muito comprometido em MM + BIO, a ponto de retardar a própria conidiogênese.

Nas demais composições de meio, as diferenças não se expressaram em termos de tempo para o aparecimento das estruturas, mas em quantidade de crescimento micelial e de conidióforos.

**Tabela 3.** Conidiogênese das linhagens CLB3 e controles em diferentes composições de meios de cultura

| linhagem          | meio     | conídios | esporos em<br>germinação | conidióforos |          |        |         |         |
|-------------------|----------|----------|--------------------------|--------------|----------|--------|---------|---------|
|                   |          |          |                          | haste        | vesícula | métula | fiálide | conídio |
|                   | MM+BIO   | 0-36     | 10-36                    | 40           | 42       | 43     | 44      | 45      |
|                   | MM+BIO+  | 0-10     | 4-18                     | 20           | 22       | 23     | 24      | 25      |
|                   | MET      |          |                          |              |          |        |         |         |
|                   | MM+BIO+  | 0-8      | 4-10                     | 20           | 21       | 22     | 23      | 24      |
|                   | MET(2X)  |          |                          |              |          |        |         |         |
|                   | MM+BIO+  | 0-10     | 4-10                     | 20           | 22       | 23     | 24      | 25      |
| CLB3              | MET+1AA  |          |                          |              |          |        |         |         |
|                   | MM+BIO+  | 0-8      | 4-10                     | 20           | 21       | 22     | 23      | 24      |
|                   | MET+13AA |          |                          |              |          |        |         |         |
|                   | MM+BIO+  | 0-8      | 4-10                     | 20           | 21       | 22     | 23      | 24      |
|                   | MET+CAS  |          |                          |              |          |        |         |         |
|                   | MC       | 0-8      | 4-10                     | 20           | 21       | 22     | 23      | 24      |
|                   | MC+2%    | 0-8      | 4-10                     | 20           | 21       | 22     | 23      | 24      |
|                   | GLICOSE  |          |                          |              |          |        |         |         |
| <i>biAlmethG1</i> | TODOS    | 0-8      | 4-10                     | 20           | 21       | 22     | 23      | 24      |
| CLY14             | TODOS    | 0-8      | 4-10                     | 20           | 21       | 22     | 23      | 24      |

Obs.: Os números referem-se ao tempo em horas em que as estruturas foram observadas.

#### **4.3.4. Estimativa de crescimento radial, peso úmido e número de conídios por colônia**

Estes resultados encontram-se na tabela 4.

O crescimento vegetativo foi menor em todas as composições de MM + BIO + MET + 1 AA.

O número de conídios por colônia e por cm<sup>2</sup> mostraram que a maior concentração de metionina aumenta o número de conidióforos por colônia, enquanto no MC + 2% GLICOSE o número de conídios é menor que no MC e MM + BIO + MET + CASA.

#### **4.4. Resposta a estabilizador osmótico e pH**

CLUTTERBUCK (1969 e 1970) observou uma melhora da conidiogênese em alguns mutantes brandos, quando crescidos em presença de estabilizador osmótico, o que era potencializado pelo pH baixo.

##### **4.4.1. Análise macroscópica**

A Figura 7 ilustra a resposta de CLB3 a 0,5M de NaCl.

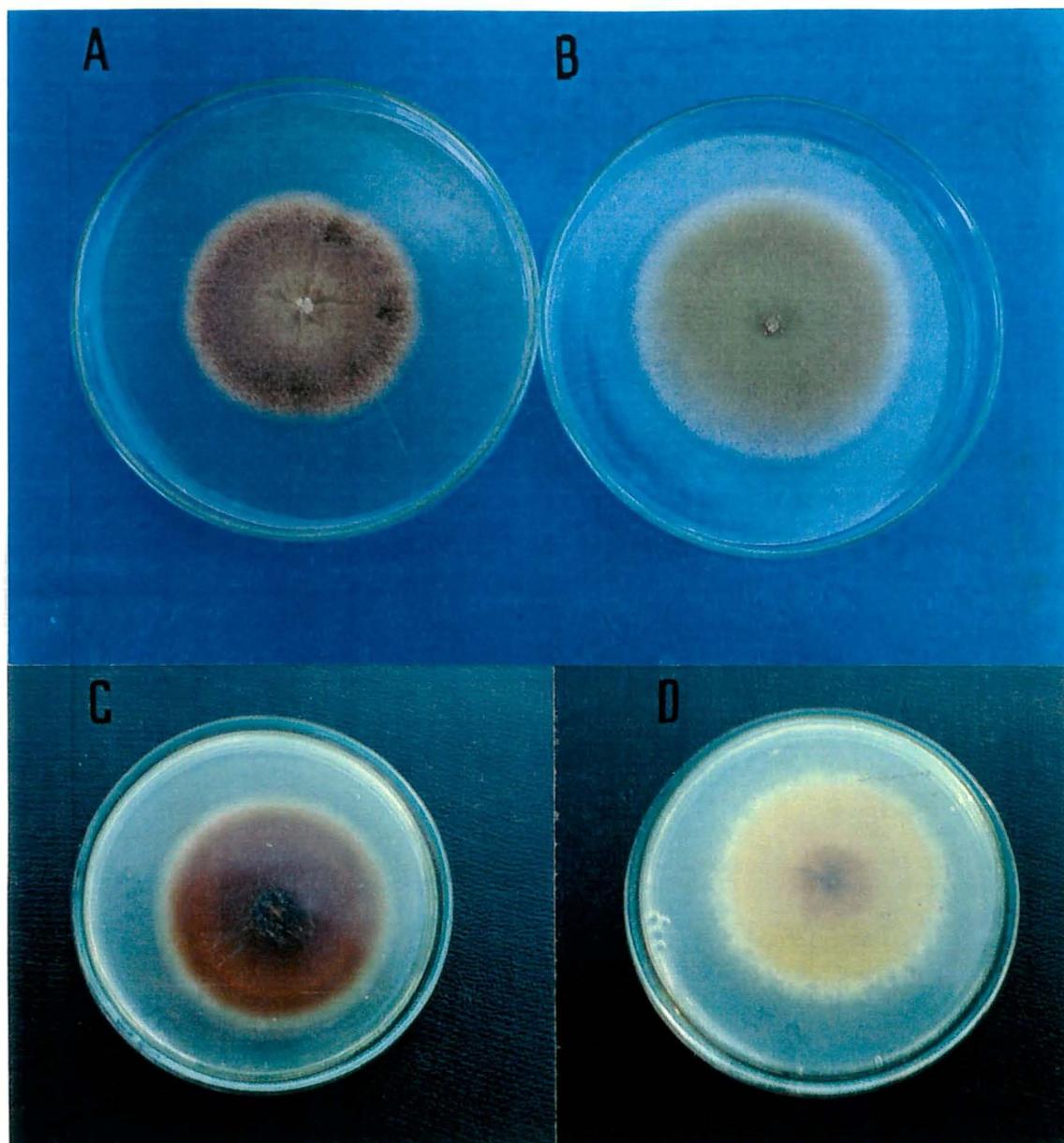
Em todos os meios com NaCl o crescimento vegetativo foi maior que o do seu correspondente sem NaCl.

A esporulação foi maior em presença de estabilizador osmótico, de forma mais evidente no MC e o pigmento marron devido ao excesso de melanina também desapareceu.

**Tabela 4.** Estimativa do crescimento radial e do peso úmido do micélio crescido em meio sólido de diferentes composições.

| Linhagem          | Meio                | Diâmetro da colônia | Peso úmido | Diâmetro/Peso | Diâmetro corrigido | Conídios $\times 10^5/\text{cm}^2$ |
|-------------------|---------------------|---------------------|------------|---------------|--------------------|------------------------------------|
|                   | MM+BIO+             | 0,60                | 0,05       | 12,00         | 0,54               | 0,0●                               |
|                   | MM+BIO+<br>MET      | 2,40                | 0,21       | 11,43         | 2,28               | 10,70                              |
|                   | MM+BIO+<br>MET (2X) | 2,50                | 0,24       | 10,42         | 2,60               | 22,81                              |
| CLB3              | MM+BIO+<br>MET+IAA  | 2,40                | 0,24       | 10,00         | 2,6●               | 11,25                              |
|                   | MM+BIO+<br>MET+13AA | 2,6●                | 0,25       | 10,40         | 2,71               | 10,33                              |
|                   | MM+BIO+<br>MET+CASA | 3,30                | 0,31       | 10,65         | 3,36               | 23,05                              |
|                   | MC                  | 3,80                | 0,35       | 10,85         | 3,80               | 24,55                              |
|                   | MC+2%<br>GLICOSE    | 4,20                | 0,43       | 9,77          | 4,66               | 18,11                              |
| <i>biA1methG1</i> | TODOS               | 7,80                | 0,60       | 13,00         | 6,51               | 520,13                             |
| CLY14             | TODOS               | 7,50                | 0,59       | 12,70         | 6,40               | 491,65                             |

Obs.: A relação diâmetro/peso e o diâmetro corrigido pela relação diâmetro/peso de CLB3 em MC permitiu uma comparação de crescimento em termos de massa micelial. O número de conídios por colônia foi obtido a partir da média dos valores de três colônias monospóricas, semeadas uma por placa.



**Figura 7.** Resposta de CLB3 a 0,5M NaCl como estabilizador osmótico.

A. MC; B. MC + NaCl mostrando o aumento de esporulação em NaCl.;

C. reverso de A, mostrando o excesso de melanina característico de CLB3;

D. reverso de B, mostrando a diminuição da melanização do micélio em presença de NaCl.

O micélio cultivado com NaCl, independentemente da composição do meio, era claro, pouco ramificado, facilmente cortado com alça, como o das linhagens controle. Este fato é devido à normalização da produção de melanina.

#### **4.4.2. Análise ao microscópio estereoscópico**

Além das estruturas já relatadas nas análises de composição nutricional, ficou muito evidente, em todos os meios com estabilizador osmótico, um aumento no número de conidióforos e uma diminuição na quantidade de hifas aéreas.

#### **4.4.3. Análise ao microscópio ótico**

##### **4.4.3.1. Colônias já desenvolvidas**

A observação ao microscópio confirmou as análises feitas no item 4.4.2, ou seja, um aumento no número de conidióforos e diminuição das hifas aéreas em resposta ao NaCl. Um dado muito importante é que, embora a esporulação pareça muito melhor, esta melhora foi apenas quantitativa, pois a frequência de conidióforos malformados foi a mesma em presença e em ausência de estabilizador osmótico.

#### **4.4.3.2. Análise da conidiogênese**

A Tabela 5 resume os resultados desta análise.

Uma observação relevante e inesperada foi o estabilizador osmótico provocar um atraso no desenvolvimento vegetativo da linhagem CLB3 e *biA1 methG1* e um pequeno atraso também na conidiogênese.

#### **4.4.4. Estimativa de crescimento radial, peso úmido e número de conídios por cm<sup>2</sup>**

Estes resultados estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 5.** Conidiogênese das linhagens CLB3 e controles em diferentes condições de osmolaridade e pH para observação do possível efeito de estabilizador osmótico e pH sobre o relógio da diferenciação dos conidióforos.

| Linhagem | Meio                              | Esporos | Esporos em germinação | Conidióforos |          |        |         |         |
|----------|-----------------------------------|---------|-----------------------|--------------|----------|--------|---------|---------|
|          |                                   |         |                       | haste        | vesícula | métula | fiálide | conídio |
| CLB3     | MM+ BIO+ MET                      | 0-10    | 4-18                  | 20           | 22       | 23     | 24      | 25      |
|          | MM+BIO+ MET+NaCl                  | 0-10    | 4-18                  | 22           | 24       | 25     | 26      | 27      |
|          | MC pH=6,5                         | 0-8     | 4-10                  | 20           | 21       | 22     | 23      | 24      |
|          | MC pH=6,5 + NaCl                  | 0-8     | 4-10                  | 22           | 24       | 25     | 26      | 27      |
|          | MC pH=5,0                         | 0-8     | 4-10                  | 20           | 21       | 22     | 23      | 24      |
|          | MC pH=5,0 +NaCl                   | 0-8     | 4-10                  | 22           | 24       | 25     | 26      | 27      |
|          | MC pH=6,5                         | 0-8     | 4-10                  | 20           | 21       | 22     | 23      | 24      |
|          | <i>biA1methG1</i> MC pH=6,5 +NaCl | 0-8     | 4-10                  | 22           | 24       | 25     | 26      | 27      |
| CLY14    | MC pH=6,5                         | 0-8     | 4-10                  | 20           | 21       | 22     | 23      | 24      |
|          | MC pH=6,5 +NaCl                   | 0-8     | 4-10                  | 22           | 24       | 25     | 26      | 27      |

Obs.: Os números referem-se ao tempo em horas em que as estruturas foram observados.

**Tabela 6.** Estimativa do crescimento radial e do peso úmido do micélio crescido em meio sólido em diferentes condições de osmolaridade e pH.

| Linagem           | Meio                | Diâmetro | Peso úmido | Diâmetro/<br>Peso | Diâmetro corrigido | Conídios x 10 <sup>5</sup> /cm <sup>2</sup> |
|-------------------|---------------------|----------|------------|-------------------|--------------------|---|
| CLB3              | MM+BIO+<br>MET      | 2,40     | 0,21       | 11,43             | 2,28               | 10,70                                       |
|                   | MM+BIO+<br>MET+NaCl | 2,50     | 0,22       | 11,36             | 2,39               | 20,12                                       |
|                   | MC pH=6,5           | 3,80     | 0,35       | 10,85             | 3,80               | 24,55                                       |
|                   | MC pH=6,5<br>+NaCl  | 4,40     | 0,37       | 12,00             | 4,01               | 288,05                                      |
|                   | MC pH=5,0           | 4,50     | 0,40       | 11,25             | 4,34               | 25,03                                       |
|                   | MC pH=5,0<br>+NaCl  | 5,40     | 0,33       | 16,36             | 3,58               | 300,12                                      |
|                   | MC pH=6,5           | 7,80     | 0,65       | 11,99             | 7,05               | 520,13                                      |
| <i>biA1methG1</i> | MC pH=6,5<br>+NaCl  | 8,00     | 0,66       | 12,00             | 7,16               | 535,02                                      |
|                   | MC pH=5,0           | 7,80     | 0,63       | 12,30             | 6,84               | 518,23                                      |
|                   | MC pH=5,0<br>+NaCl  | 8,10     | 0,61       | 13,20             | 6,62               | 536,77                                      |
|                   | MC pH=6,5           | 7,50     | 0,62       | 12,10             | 6,73               | 491,65                                      |
| CLY14             | MC pH=6,5<br>+NaCl  | 7,70     | 0,65       | 11,80             | 7,05               | 503,28                                      |
|                   | MC pH=5,0           | 7,40     | 0,62       | 12,00             | 6,73               | 493,75                                      |
|                   | MC pH=5,0<br>+NaCl  | 7,80     | 0,63       | 12,30             | 6,84               | 498,00                                      |
|                   | MC pH=6,5           | 7,50     | 0,62       | 12,10             | 6,73               | 491,65                                      |

A relação diâmetro/peso e o diâmetro corrigido pela relação diâmetro/peso de CLB3 em MC permitem uma comparação de crescimento em termos de massa micelial. O número de conídios por colônia foi obtido a partir da média dos valores de 3 colônias monospóricas, semeadas uma por placa.

O crescimento vegetativo em presença de estabilizador osmótico parecia maior, analisando-se o diâmetro da colônia. A relação entre o diâmetro e o peso, no entanto, mostrou que a massa micelial formada pelos meios sem estabilizador foi maior.

A quantidade de conídios, no entanto, foi claramente maior em meios com estabilizador osmótico. O pH sozinho não teve efeito no crescimento ou na esporulação, mas juntamente com o NaCl, aumentou os efeitos do estabilizador osmótico.

#### **4.5. Resposta a temperatura**

##### **4.5.1. Análise macroscópica**

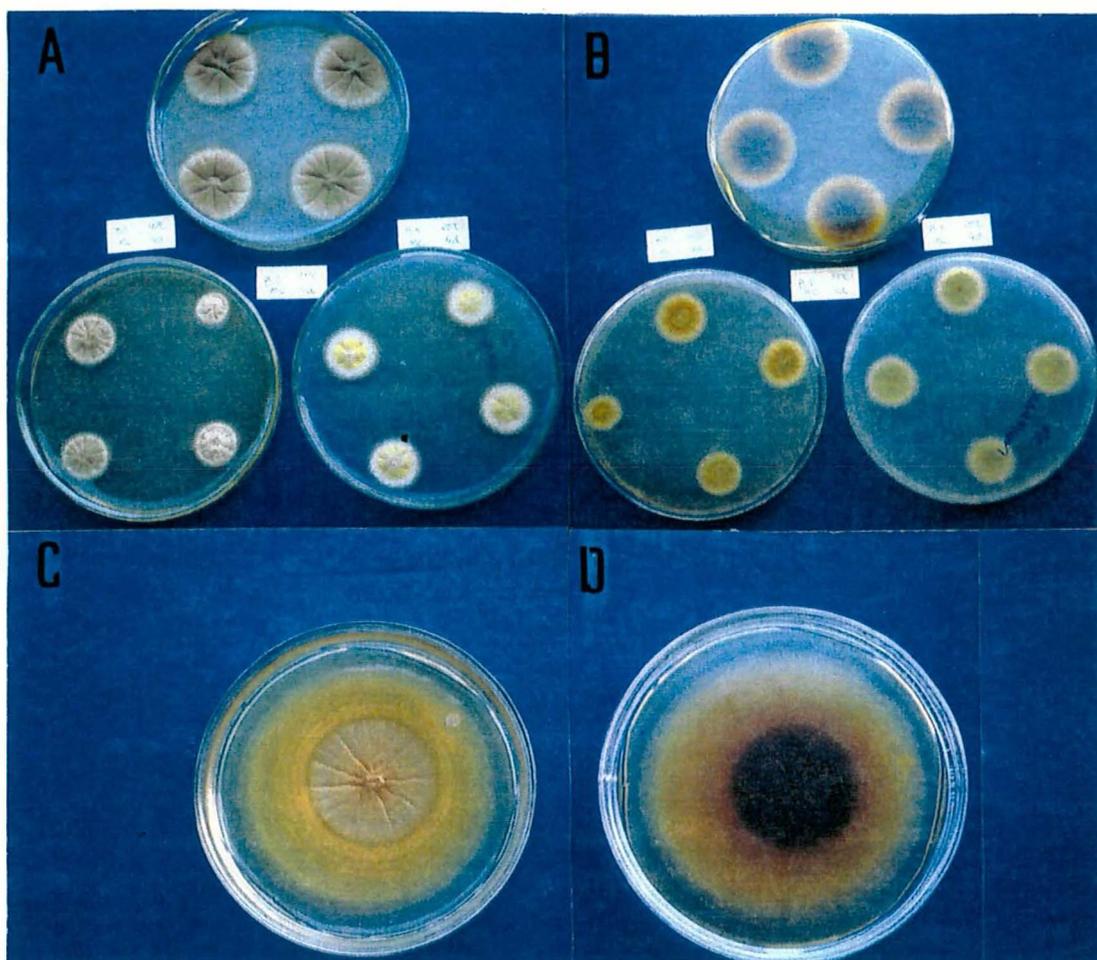
Estes resultados podem ser observados na Figura 8.

A 25°C, o crescimento foi menor, mas a produção de esporos aumentou muito em relação ao que ocorreu a 37°C. Outro taço importante foi o desaparecimento do pigmento marron no reverso. Estes dois aspectos foram observados também nas placas incubadas por 5 dias a 37°C e mais 5 dias a 25°C.

O meio com estabilizador osmótico a 25°C não pareceu melhorar a condição de esporulação além do que a temperatura já havia feito, mas apresentou efeito positivo em relação ao crescimento vegetativo.

A 42°C, o crescimento foi o menor de todos, mas sem esporulação nenhuma e com a manutenção do pigmento, como ocorreu a 37°C.

A adição de estabilizador osmótico a 42°C não melhorou o crescimento vegetativo nem a esporulação.



**Figura 8.** Análise da resposta de CLB3 a temperatura.

A. aspecto da colônia a 37°C (superior), 42°C (inferior esquerda) e 25°C (inferior direita); B. reverso das colônias de A; C. colônia crescida em MC durante 5 dias a 37°C e 5 dias a 25°C, mostrando a intensa esporulação a 25°C; D. reverso de C, mostrando a diminuição da melanização a 25°C.

## **4.5.2. Análise ao microscópio ótico**

### **4.5.2.1. Colônias já desenvolvidas**

A 25°C observou-se um número maior de conidióforos e menor de hifas aéreas. No entanto, a proporção de conidióforos malformados foi a mesma encontrada em todas as situações.

A 42°C não houve diferenciação de conidióforos. O máximo de desenvolvimento observado foi algumas hastes com vesícula pouco desenvolvida e início de métulas de diferentes tamanhos.

### **4.5.2.2. Análise da conidiogênese**

A temperatura de 25°C provocou um atraso semelhante ao ocorrido em resposta a estabilizador osmótico.

A presença dos dois fatores simultaneamente apresentou um efeito sinérgico aumentando em uma hora, o atraso no início de cada fase, de forma que, com 24 horas em MC + NaCl a 25°C, havia apenas hastes de conidióforos.

Esta resposta a temperatura também foi verificada na linhagem controle.

## **4.5.3. Estimativa do crescimento radial, peso úmido e número de conídios por cm<sup>2</sup>**

Os resultados estão sumarizados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Estimativa do crescimento radial e do peso do micélio crescido em meio sólido a diferentes temperaturas.

| Temperatura | Linhagem         | Meio    | Diâmetro | Peso úmido | Diâmetro/Peso | Conídios x 10 <sup>5</sup> / cm <sup>2</sup> |
|-------------|------------------|---------|----------|------------|---------------|--|
| 25°C        | CLB3             | MC      | 3,0      | 0,34       | 8,82          | 250,25                                       |
|             |                  | MC+NaCl | 4,5      | 0,38       | 11,84         | 252,00                                       |
|             | <i>biA1methG</i> | MC      | 3,7      | 0,30       | 12,30         | 528,78                                       |
|             |                  | MC+NaCl | 4,0      | 0,33       | 12,12         | 530,64                                       |
|             | CLY14            | MC      | 3,5      | 0,29       | 12,06         | 490,98                                       |
|             |                  | MC+NaCl | 3,7      | 0,29       | 12,76         | 488,78                                       |
| 37°C        | CLB3             | MC      | 3,8      | 0,35       | 10,85         | 24,55  |
|             |                  | MC+NaCl | 4,4      | 0,37       | 12,00         | 288,05                                       |
|             | <i>biA1methG</i> | MC      | 7,8      | 0,65       | 11,99         | 535,02                                       |
|             |                  | MC+NaCl | 8,0      | 0,66       | 12,00         | 533,65                                       |
|             | CLY14            | MC      | 7,5      | 0,62       | 12,10         | 491,65                                       |
|             |                  | MC+NaCl | 7,7      | 0,65       | 11,80         | 492,07                                       |
| 42°C        | CLB3             | MC      | 3,4      | 0,40       | 8,50          | 0,00   |
|             |                  | MC+NaCl | 4,4      | 0,40       | 11,00         | 0,00   |
|             | <i>biA1methG</i> | MC      | 6,0      | 0,53       | 11,30         | 534,00                                       |
|             |                  | MC+NaCl | 7,5      | 0,62       | 12,10         | 530,93                                       |
|             | CLY14            | MC      | 5,5      | 0,47       | 11,70         | 480,13                                       |
|             |                  | MC+NaCl | 6,5      | 0,54       | 12,04         | 482,26                                       |

A relação diâmetro/peso permite uma comparação de crescimento em termos de massa micelial. O número de conídios por colônia foi obtido a partir da média dos valores de três colônias monospóricas, semeadas uma por placa.

## **4.6. Resposta à carência de oxigênio**

### **4.6.1. Análise macroscópica**

A Figura 9 ilustra estes resultados.

A análise macroscópica mostrou que a carência de oxigênio nas duas condições levou a uma diminuição de crescimento vegetativo e reprimiu drasticamente, a esporulação. O micélio ficou mais escuro, enrugado e houve uma exportação significativa de melanina para o meio de cultura.

### **4.6.2. Análise ao microscópio estereoscópico**

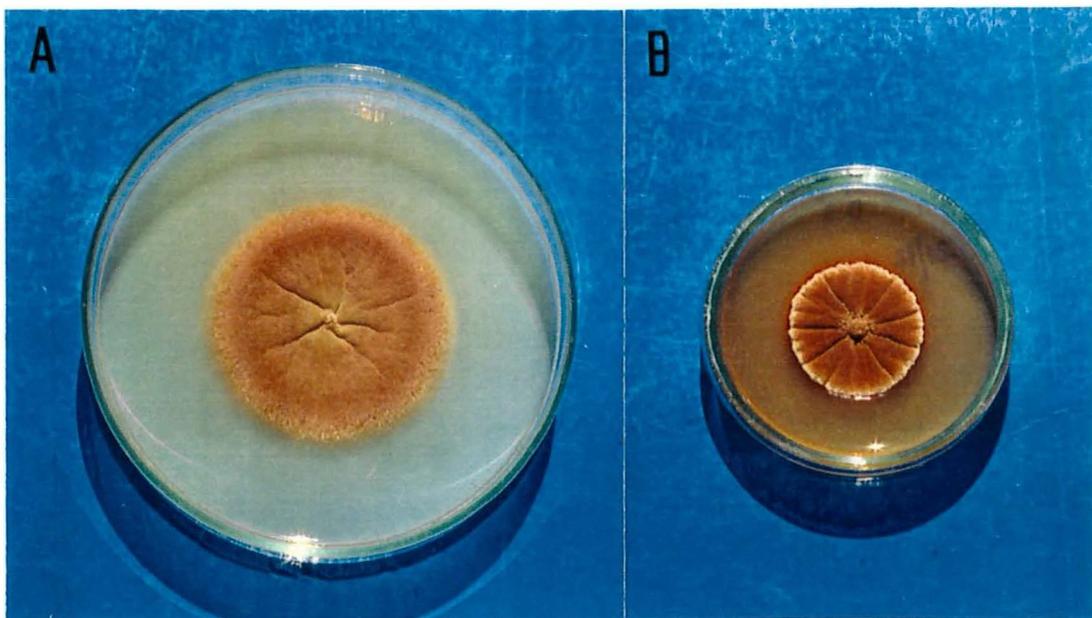
A observação ao microscópio estereoscópico confirmou a análise macroscópica. Houve uma grande diminuição no número de conidióforos e um grande aumento na quantidade de hifas aéreas.

### **4.6.3. Análise ao microscópio ótico**

A diminuição do número de conidióforos não alterou a frequência de estruturas malformadas.

### **4.6.4. Estimativa do crescimento radial, peso úmido e número de conídios por colônia**

Estas medidas estão apresentadas na Tabela 8.



**Figura 9.** Análise da resposta de CLB3 à carência de oxigênio. A. 20ml de MC em placa de 10cm de diâmetro, permitindo maior quantidade de oxigênio na placa; B. 20ml de MC em placa com 6cm de diâmetro, deixando pouco espaço para o oxigênio, levando à sua carência. A resposta é uma menor esporulação e maior produção de melanina, com exportação para o meio.

**Tabela 8.** Estimativa do crescimento radial, peso úmido e produção de conídios das linhagens CLB3 e *biA1methG1* crescida em MC sólido em presença e carência de oxigênio.

| Linhagem         | Meio | Oxigênio | Diâmetro | Peso | Diâmetro/<br>Peso | Conídios<br>$\times 10^5 / \text{cm}^2$ |
|------------------|------|----------|----------|------|-------------------|---|
| CLB3             | MC   | presença | 3,8      | 0,35 | 10,85             | 24,55                                   |
|                  | MC   | carência | 2,5      | 0,31 | 8,06              | 5,01                                    |
| <i>biA1methG</i> | MC   | presença | 7,8      | 0,65 | 11,99             | 535,02                                  |
|                  | MC   | carência | 6,5      | 0,59 | 11,02             | 480,51                                  |

Novamente foi observada, uma diminuição do diâmetro da colônia em associação com o espessamento do micélio, o que foi confirmado pela relação diâmetro/peso.

#### 4.7. Resposta à luz

Todas as análises a nível macroscópico e microscópico demonstraram ausência de resposta à luz nas linhagens CLB3, *biA1 methG1* e CLY14.

## **4.8. Análise da conidiogênese em meio com haploidizante Benlate**

### **4.8.1. Linhagens CLB3, CLY14 e *biA1 methG1***

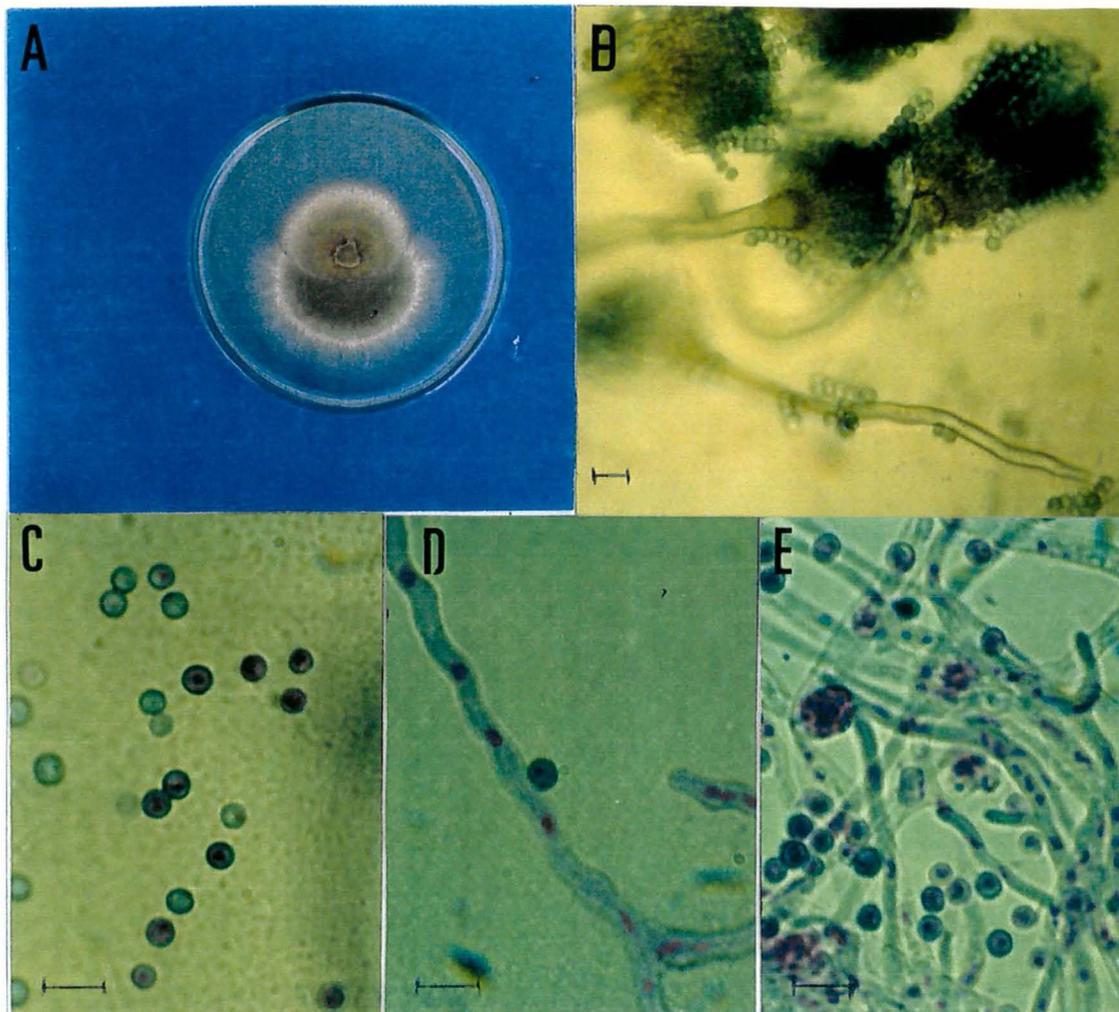
Todas as três linhagens responderam com um encurtamento das células do micélio vegetativo, das hastes dos conidióforos e até mesmo das métulas e fiálides.

O dado mais relevante, no entanto, foi a diminuição da variação nas linhagens CLB3 e CLY14. Pela primeira vez, nos testes, a proporção de conidióforos normais para anormais foi alterada, com desaparecimento dos normais.

### **4.8.2. Linhagem CLV3**

Esta linhagem foi obtida espontaneamente, como um setor melhorado diplóide de CLB3, como mostra a figura 10A. Após algumas repicagens do setor melhorado, surgiu um setor marron com aspecto típico de CLB3, mas com grande instabilidade, gerando setores melhorados diplóides com grande frequência.

Em presença de Benlate, a linhagem CLV3 marron manteve-se estável por até 10 dias, sem originar setores, embora mantivesse o aspecto variegado. A confirmação do estado diplóide e haplóide destas etapas foi feita pela análise do diâmetro dos conídios que podem ser vistos na Figura 10 C, D e E.



**Figura 10.** Análise de ploidia das linhagens CLB3 e CLV3 antes e depois de tratamento com Benlate.

A. Aspecto macroscópico da linhagem CLB3 originando um setor diplóide CLV3, após 3 dias de crescimento; B. Conidióforos normais do setor CLV3, corado com lactofenol-azul-algodão; C. Conídios haplóides e diplóides de CLB3; D. Conídios diplóides de CLV3; E. Conídios haplóides de CLV3 após o tratamento com Benlate. C, D e E foram coradas com Giemsa (item 3.8.14). A barra corresponde a 5 $\mu$ m.

#### **4.9. Análise da resposta a neomicina**

Em presença de neomicina, o crescimento vegetativo foi menor que o típico para a linhagem CLB3, mas a esporulação respondeu como a estabilizador osmótico, quando analisada macroscopicamente.

Ao microscópio, os conidióforos aberrantes estavam menos representados que de costume, indicando uma supressão parcial do fenótipo *bristle*.

#### **4.10. Técnica de coloração de núcleos**

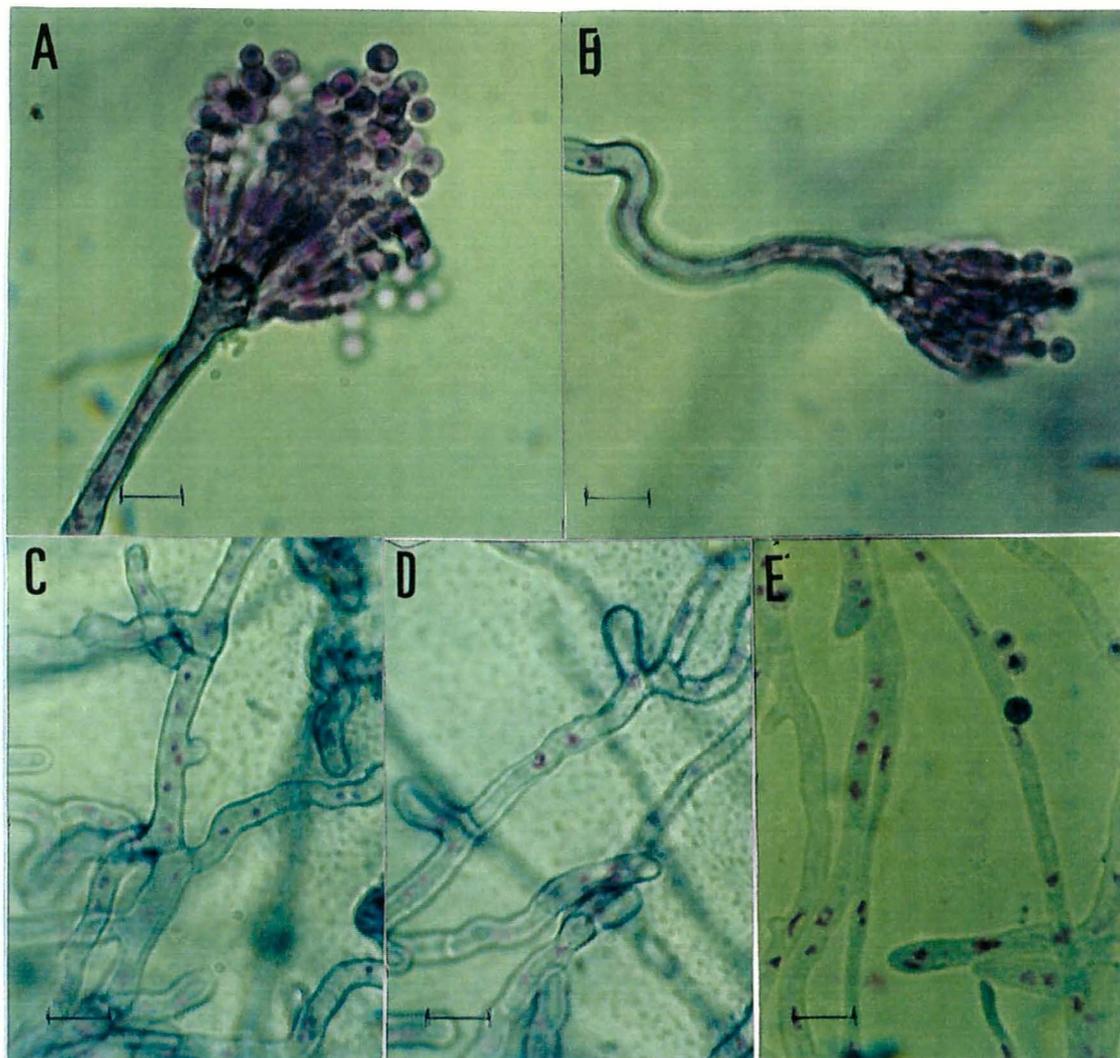
A figura 11 mostra os resultados da coloração de núcleos para confirmação da heterocariose haplóide-diplóide na linhagem CLB3 e da diploidia no setor melhorado CLV3.

Os conídios da linhagem CLB3 eram de diferentes tamanhos, o que indicava serem haplóides e diplóides. Este fato não pode ser confirmado pela análise do tamanho dos núcleos, devido á heterogeneidade de diâmetro dos núcleos, decorrente de outros fatores.

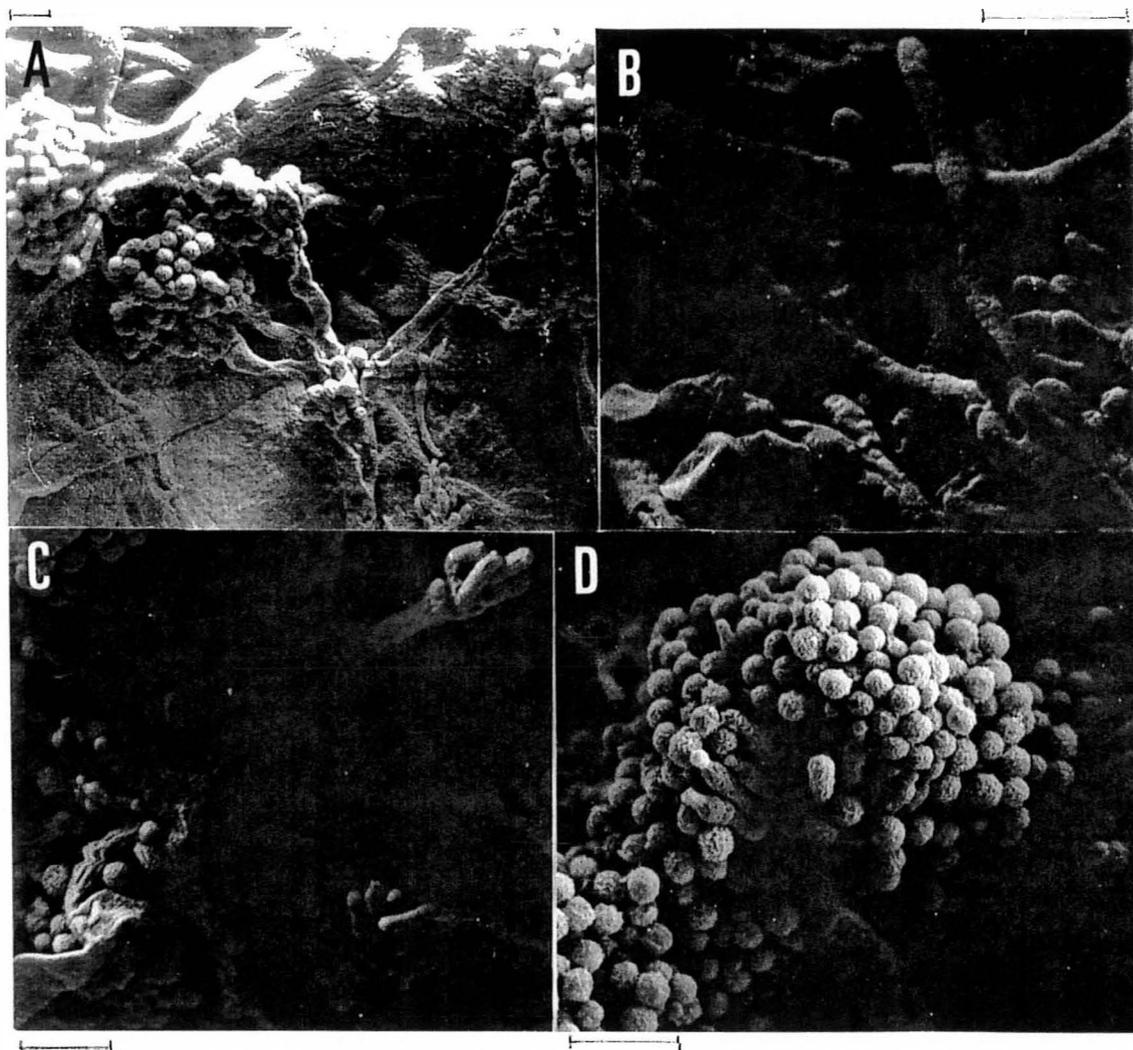
No entanto, o número de núcleos por hifa que, segundo CLUTTERBUCK (1969b), é um parâmetro mais confiável para este tipo de diagnóstico, demonstrou a heterocariose de CLB3 e a diploidia de CLV3.

#### **4.10. Microscopia eletrônica de varredura**

A Figura 12 apresenta os principais aspectos das aberrações de conidiogênese da linhagem CLB3: os conidióforos secundários, partindo de uma



**Figura 11.** Observação da heterocariose haplóide-diplóide na linhagem CLB3 com coloração de Giemsa (ítem 3.8.14). A. Conidióforo normal de CLB3; B. Conidióforo anômalo de CLB3; C. Hifas haplóides de CLB3; D. Hifas diplóides de CLB3; E. Hifas da linhagem haplóide *biA1methG1* (controle). A barra corresponde a 5 $\mu$ m.



**Figura 12.** Conidióforos de CLB3 e controle, crescidos em MC por 3 dias, em Microscopia Eletrônica de Varredura. A. Conidióforos secundários com métulas, fiálides e conídios, brotando a partir da vesícula de um conidióforo, juntamente com métulas não desenvolvidas. Na parte superior e à direita, aparecem conidióforos normais. B. Conidióforo aberrante, em que uma vesícula apresenta algumas métulas e longas hastes indiferenciadas. C. Conidióforo aberrante, com uma estrutura secundária, ao lado de métulas normais com fiálides e conídios. D. Conidióforo normal da linhagem *biA1methG1*. A barra corresponde a 10 $\mu$ m.

vesícula, um conidióforo normal no mesmo campo, indicando variação, estruturas com diversos graus de comprometimento de vesícula e métulas ao MEV.

É importante salientar que nos conidióforos malformados que conseguem diferenciar métulas, estas imediatamente produzem fiálides funcionais e conídios, não sendo observadas cadeias de métulas, como ocorre com a totalidade dos mutantes *bristle* intermediários, descritos na literatura.

#### **4.11. Análises genéticas**

##### **4.11.1. Complementação em heterocários e diplóides**

Em heterocários, foram observados conidióforos típicos de CLB3 e da linhagem normal (MSE e *niaD*). Nos conidióforos híbridos, o alelo mutante apresentou complementação a nível de vesícula, pois estes desenvolveram métulas e fiálides normais e cadeias de conídios de ambas as cores (verde e branca; verde e amarela, respectivamente).

Nos diplóides entre essas mesmas linhagens, os conidióforos eram normais, com cadeias de conídios diplóides verdes, demonstrando que o alelo *brl* mutante é recessivo em relação ao selvagem, o que ocorria também com os alelos já descritos por CLUTTERBUCK (1969).

#### 4.11.2. Teste de alelismo

##### 4.11.2.1. Por complementação

O teste de alelismo, normalmente é feito pela análise de heterocários resultantes do cruzamento entre o mutante novo e um mutante já conhecido para o referido gene. Se o heterocáριο apresenta um fenótipo normal, houve complementação e os dois marcadores são genes distintos, não alelos de um mesmo gene.

CLUTTERBUCK (1969a) observou que não é possível fazer tal estudo com heterocários de linhagens *brl* porque este gene atua em fase posterior à vesícula, onde as células são uninucleadas e os núcleos das duas linhagens não podem coexistir. A consequência deste fato é que só se pode estudar complementação, para teste de alelismo, em diplóides heterozigotos destas linhagens.

Os conidióforos do diplóide *CLB3//brlA42* mostravam-se malformados, indicando que não houve complementação no diplóide. Este resultado comprovou que o gene responsável pelo fenótipo de CLB3 é um alelo do gene *brlA*, como o *brlA42*. Como o fenótipo do diplóide é o mesmo do mutante CLB3, concluiu-se que o alelo novo é dominante sobre o *brlA42*, embora ambos sejam recessivos em relação ao alelo selvagem.

#### 4.11.2.2. Por recombinação

A análise dos segregantes meióticos do cruzamento CLB3 x *brlA42* mostrou 0,5% de recombinação entre eles. Isoladamente, este resultado poderia indicar que os genes responsáveis pelo bloqueio na conidiogênese destes dois mutantes, não são alelos. No entanto, em vista dos demais resultados, concluímos que os 2 recombinantes encontrados entre 375 segregantes analisados devem ser resultantes de recombinação intragênica ou de conversão gênica.

#### 4.11.3. Mapeamento por ciclo parassexual (análise mitótica)

Os resultados do mapeamento das marcas *brl*, *suB*, *methG* e *mel* estão nas Tabelas 9, 10 e 11, respectivamente.

A análise de recombinação indicou que o gene *brl* está no cromossomo VIII porque apresentou ligação absoluta com a marca *ribo*.

O gene responsável pela supressão à marca *methG1(cys)* foi mapeado, por ciclo parassexual, no cromossomo V, tratando-se, portanto de *cysA* ou *C*.

O gene que determina o excesso de pigmento no micélio (*mel*) apresentou maiores dificuldades para o mapeamento, pois a expressão do pigmento não é constante, dependendo de muitos fatores, como temperatura,

**Tabela 9.** Mapeamento mitótico da marca *brl* pela análise de segregantes haplóides do diplóide CLB3//MSE.

|              | <i>bi</i> + | <i>bi</i> - | <i>w</i> + | <i>w</i> - | <i>gal</i> + | <i>gal</i> - | <i>meth</i> | <i>meth</i> - | <i>pyro</i> + | <i>pyro</i> - | <i>fac</i> + | <i>fac</i> - | <i>tio</i> + | <i>tio</i> - | <i>nic</i> + | <i>nic</i> - | <i>ribo</i> + | <i>ribo</i> - |
|--------------|-------------|-------------|------------|------------|--------------|--------------|-------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| <i>brl</i> + | 4           | 10          | 6          | 8          | 9            | 5            | 4           | 10            | 10            | 4             | 1            | 13           | 1            | 13           | 9            | 5            | ●             | 14            |
| <i>brl</i> - | 12          | 24          | 19         | 17         | 27           | 9            | 11          | 25            | 25            | 11            | 23           | 13           | 17           | 19           | 29           | 7            | 36            | 0             |

**Tabela 10.** Mapeamento mitótico da marca *suB methG1 (cys)* pela análise dos segregantes haplóides do diplóide CLB3//MSE.

|             | <i>bi+</i> | <i>bi-</i> | <i>w+</i> | <i>w-</i> | <i>gal+</i> | <i>gal-</i> | <i>meth</i> | <i>meth</i> | <i>meth</i> | <i>pyro+</i> | <i>pyro-</i> | <i>fac+</i> | <i>fac-</i> | <i>tio+</i> | <i>tio-</i> | <i>nic+</i> | <i>nic-</i> | <i>ribo+</i> | <i>ribo-</i> |
|-------------|------------|------------|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| <i>cys+</i> | 7          | 20         | 12        | 14        | 14          | 12          | 8           | 18          | 18          | 8            | 8            | 0           | 26          | 5           | 21          | 15          | 11          | 14           | 12           |
| <i>cys-</i> | 9          | 14         | 13        | 11        | 22          | 2           | 7           | 17          | 17          | 7            | 7            | 24          | 0           | 13          | 11          | 23          | 1           | 23           | 1            |

**Tabela 11.** Mapeamento mitótico da marca *mel* pela análise de segregantes haplóides do diplóide CLB3//MSE.

|             | <i>bi+</i> | <i>bi-</i> | <i>w+</i> | <i>w-</i> | <i>gal+</i> | <i>gal-</i> | <i>meth+</i> | <i>meth-</i> | <i>pyro+</i> | <i>pyro-</i> | <i>fac</i> | <i>fac</i> | <i>tio+</i> | <i>tio-</i> | <i>nic+</i> | <i>nic-</i> | <i>ribo+</i> | <i>ribo-</i> | <i>cys+</i> | <i>cys-</i> | <i>brl</i> | <i>brl-</i> |
|-------------|------------|------------|-----------|-----------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| <i>mel</i>  | 7          | 7          | 3         | 11        | 11          | 3           | 5            | 9            | 9            | 5            | 5          | 9          | 7           | 7           | 8           | 6           | 12           | 2            | 8           | 6           | 2          | 12          |
| <i>mel-</i> | 9          | 27         | 22        | 14        | 25          | 11          | 10           | 26           | 26           | 10           | 19         | 17         | 11          | 25          | 30          | 6           | 25           | 11           | 19          | 17          | 12         | 24          |

composição de meio, etc. Por este motivo, não foi possível atribuir uma localização a este gene. Um dado relevante desta análise, no entanto, foi a independência de segregação da marca *melanina* em relação às marcas *suBmethG1* (*cys*) e *brlA*.

#### **4.11.4. Mapeamento por ciclo sexual (análise meiótica)**

A Tabela 12 apresenta os resultados da análise dos 125 segregantes de um dos três cleistotécios analisados. A frequência de recombinação entre os genes *brl* e *niaD*, segundo estes dados, foi de  $11,2 \pm 2,82\%$ . Estes resultados coincidem com a frequência de recombinação descrita na literatura, entre os genes *niaD* e *brlA* (CLUTTERBUCK, 1970b), o que confirma que o gene responsável pela anormalidade na conidiogênese do mutante CLB3 é o gene *brlA*.

A Tabela 13 mostra a análise meiótica da marca *cys* (*suBmethG1*), indicando que se trata do gene *cysC*, pois apresentou  $36 \pm 4,29\%$  de recombinação com *facA*, como foi descrito por CYBIS et al. (1988). Para todos os outros marcadores a recombinação foi muito superior a este valor.

#### **4.11.5. Mapeamento intragênico**

##### **4.11.5.1. Por recombinação**

ROPER (1952) obteve as primeiras análise de recombinação intragênica, entre diferentes alelos do gene para deficiência de biotina (*biA1*). CLUTTERBUCK (1992), de forma elegante, mapeou os 36 mutantes para o gene *brlA*, cruzando cada um deles com três linhagens previamente escolhidas, em que a mutação se localizava em partes distintas do gene. Observou os segregantes com

conidiogênese normal, resultantes de recombinação intragênica, de forma que a combinação da parte selvagem de cada alelo recuperava o alelo selvagem do gene *brl*. Analisando nestes segregantes, a posição das marcas flanqueadoras *niiA* e *cnxA/B*, foi possível determinar a posição do alelo em relação ao alelo mapeador. Desta forma, todos os 36 mutantes foram agrupados em 7 regiões do gene.

Os resultados do mapeamento intragênico do alelo *brl* de CLB3 encontram-se na Tabela 14. Estes dados indicaram que a mutação do alelo *brl* do mutante CLB3 está localizada próximo à do alelo *brlA17*, à esquerda (5') do ponto de mutação das duas outras linhagens mapeadoras (*brlA39* e *brlA9*).

**Tabela 12.** Mapeamento meiótico da marca *brl* pela análise dos segregantes do cruzamento CLB3 x *niaD*.

|                         | <i>niaD</i> <sup>+</sup> | <i>niaD</i> <sup>-</sup> |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>brl</i> <sup>+</sup> | 9                        | 40                       |
| <i>brl</i> <sup>-</sup> | 71                       | 5                        |

**Tabela 13.** Mapeamento meiótico da marca *cys* (*suB methG1*) pela análise dos segregantes do cruzamento CLB3 x MSE.

|                         | <i>nic</i> <sup>+</sup> | <i>nic</i> <sup>-</sup> |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>cys</i> <sup>+</sup> | 33                      | 59                      |
| <i>cys</i> <sup>-</sup> | 21                      | 12                      |

**Tabela 14.** Mapeamento intragênico do gene *brl*, a partir do cruzamento de CLB3 com as linhagens *brlA17*, *brlA39* e *brlA9*. O número de recombinantes de cada cruzamento representa as colônias com conidiogênese normal, entre os 3.000 ascósporos analisados de cada cleistotécio, de um total de 50.000 ascósporos viáveis de cada cleistotécio.

|      | <i>brlA17</i> |    | <i>brlA39</i> |    | <i>brlA9</i> |    |
|------|---------------|----|---------------|----|--------------|----|
|      | 5'            | 3' | 5'            | 3' | 5'           | 3' |
| CLB3 | 23            | 20 | 20            | 0  | 10           | 05 |

As linhagens apresentavam a seguinte composição no cromossomo VIII

Linhagem mapeadora:  $ni\bar{i}$  ----- *brlA* -----  $cnx\bar{c}$

Linhagem CLB3:  $nii^+$  ----- *brlA* -----  $cnx^+$

5': segregantes  $ni\bar{i}cnx^+$  indicativos de que a mutação está a 5' do alelo mapeador.

3: segregantes  $nii^+cnx\bar{c}$  indicativos de que a mutação está a 3' do alelo mapeador.

#### 4.11.5.2. Por conversão gênica

Embora CLUTTERBUCK (1992) tenha conseguido agrupar os alelos em diferentes sítios dentro do gene, os resultados de recombinação para efeito de determinação de distância entre sítios de mutação apresentavam muitas distorções. Isto se deve, em parte, ao fato das distâncias serem muito pequenas, a ponto de haver provavelmente, nesta região, apenas um nódulo de recombinação, e em parte, por uma alta frequência de interferência negativa, por conversão gênica (ORR-WEAVER & SZOSTAK, 1985; PRITCHARD, 1955 e 1960).

Neste mesmo trabalho, CLUTTERBUCK (1992) observou uma grande frequência de conversão gênica. A polaridade na conversão, ou seja, a

tendência dos alelos mais próximos do nódulo de recombinação converterem mais, determina uma razão direta entre a distância de dois alelos e a frequência de conversão (PUTRAMENT et al., 1971 e THIJS et al., 1995). Em decorrência destas indicações, foram analisados os resultados de conversão gênica com o objetivo de mapeamento do alelo *brl* de CLB3.

Considerando os resultados apresentados na Tabela 15, observamos que os dados de conversão gênica confirmaram o mapeamento do novo alelo *brl* na região inicial do gene (5'). A frequência de conversão foi capaz de mapear o novo alelo a 5' do alelo *brlA17*, enquanto os dados de recombinação foram capazes apenas de mapeá-lo no grupo A, nas proximidades do sítio de *brlA17* (CLUTTERBUCK, 1992).

A comparação das frequências de recombinação intragênica e de conversão gênica apresentada na Tabela 16 mostrou que, para distâncias pequenas como os limites de um gene, o simples cálculo das frequências de recombinação com alelos já mapeados não é conclusiva. Na ausência de marcas flanqueadoras como sugerido por CLUTTERBUCK (1992), para análise de recombinação dos dois lados do alelo mapeador, que permite a distinção de parte dos resultantes de conversão gênica, as frequências de recombinação ficariam ainda menos informativas.

**Tabela 15.** Mapeamento intragênico do gene *brl* a partir da análise dos recombinantes que sofreram conversão gênica, resultantes dos cruzamentos de CLB3 com as linhagens *brlA17*, *brlA39* e *brlA9*. O número de recombinantes de cada cruzamento representa as colônias com conidiogênese normal, entre 3.000 ascósporos analisados, de um total de 50.000 ascósporos viáveis de cada cleistotécio.

|      | <i>brlA17</i> |    | <i>brlA39</i> |    | <i>brlA9</i> |    |
|------|---------------|----|---------------|----|--------------|----|
|      | 5'            | 3' | 5'            | 3' | 5'           | 3' |
| CLB3 | 1%            | 0% | 0,5%          | 0% | 0,4%         | 0% |

As linhagens apresentavam a seguinte composição no cromossomo VIII

Linhagem mapeadora:  $ni\bar{i}$  ----- *brlA* -----  $cnx^-$

Linhagem CLB3:  $nii^+$  ----- *brlA* -----  $cnx^-$

5': segregantes  $nii^+ cnx^+$  indicativos de conversão do alelo de CLB3.

3': segregantes  $ni\bar{i} cnx^-$  indicativos de conversão do alelo mapeador.

**Tabela 16.** Comparação dos resultados obtidos pela análise de recombinantes entre o alelo de CLB3 e os alelos mapeadores e dos obtidos pela análise da conversão gênica, mostrando a concordância de ambos os métodos. Se os recombinantes que sofreram conversão gênica não fossem excluídos da amostra, os resultados ficariam mais distantes dos da recombinação, indicando uma distância de mapa que não é compatível com regiões dentro de um gene.

|   | <i>brlA17</i> | <i>brlA39</i> | <i>brlA9</i> |
|---|---------------|---------------|--------------|
| Recombinação                                  | 1,5%          | 0,6%          | 0,5%         |
| Conversão                                     | 1,0%          | 0,5%          | 0,4%         |
| Recombinação sem exclusão da conversão gênica | 2,5%          | 1,1%          | 0,9%         |

## 4.12. Metodologia molecular

### 4.12.1. RFLP

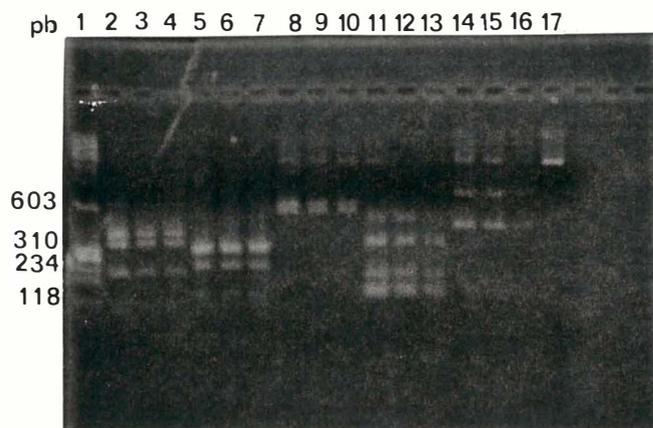
A análise eletroforética dos fragmentos resultantes da digestão do fragmento amplificado do gene *brlA* das linhagens CLB3, *biA1 methG1* e *brlA42* pelas 5 enzimas de restrição indicou ausência de polimorfismo para estes sítios de restrição. Estes resultados estão apresentados na Figura 13.

#### 4.12.2. Clonagem

A análise eletroforética do produto de PCR das regiões flanqueadoras do sítio de ligação do inserto no vetor pUC18, permitiu a seleção dos clones de bactérias transformantes que receberam o plasmídeo com o fragmento do gene *brlA*. A Figura 14 apresenta os resultados de alguns clones.

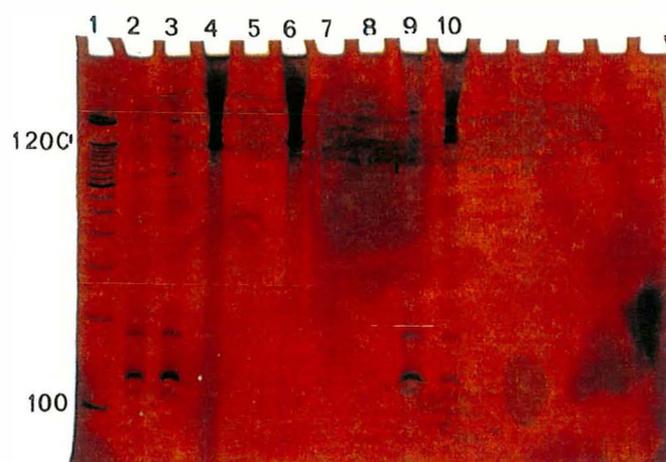
#### 4.12.3. Sequenciamento

A comparação da sequência de nucleotídeos do fragmento do gene *brlA* da linhagem CLB3 e a sequência do alelo selvagem descrito em PRADE & TIMBERLAKE (1993) demonstrou que a mutação do novo alelo ocorreu na posição -881 (-24 da origem de transcrição do transcrito  $\beta$ ) e na posição -71(28 do intron). Ambas as sequências estão representadas nas Figuras 15e16.



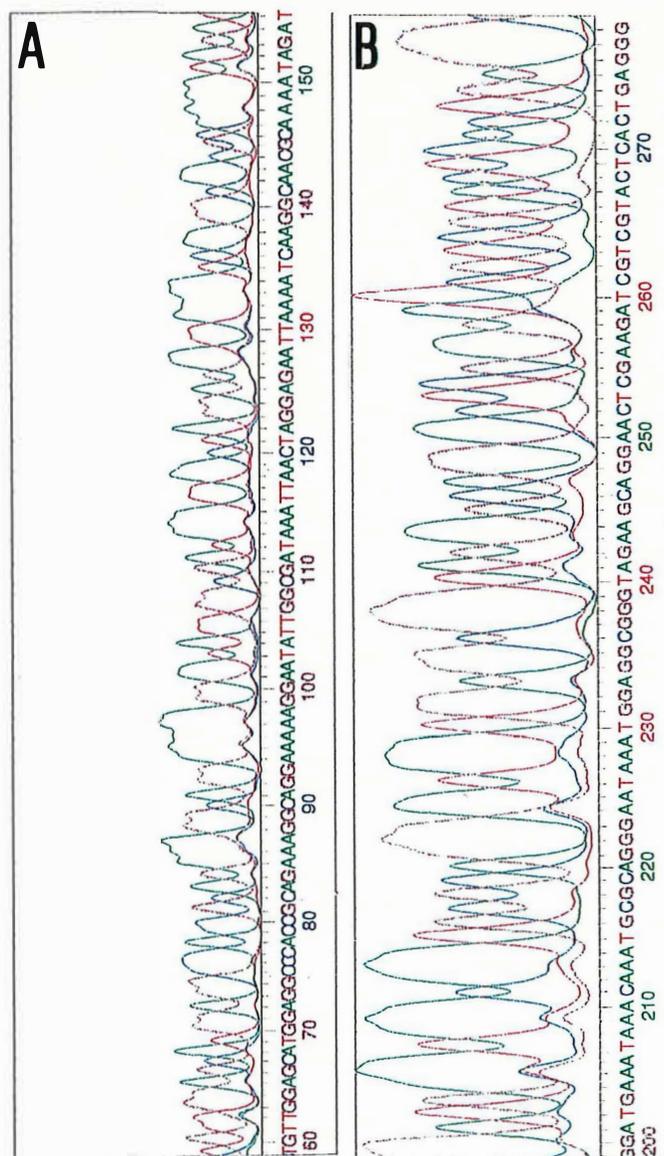
**Figura 13.** Eletroforese dos fragmentos de restrição do produto de PCR para amplificação de parte do gene *brlA* das linhagens CLB3, *biA1methG1* e *brlA42*.

1:  $\phi$ X174/*HaeIII*; 2: CLB3/*HaeIII*; 3: *biA1methG1*/*HaeIII*; 4: *brlA42*/*HaeIII*;  
 5: CLB3/*MboI*; 6: *biA1methG1*/*MboI*; 7: *brlA42*/*MboI*; 8: CLB3/*BamHI*;  
 9: *biA1methG1*/*BamHI*; 10: *brlA42*/*BamHI*; 11: CLB3/*TaqI*; 12: *biA1methG1*/*TaqI*;  
 13: *brlA42*/*TaqI*; 14: CLB3/*SmaI*; 15: *biA1methG1*/*SmaI*; 16: *brlA42*/*SmaI*;  
 17: CLB3 sem digestão.



**Figura 14.** Eletroforese dos produtos de PCR das regiões flanqueadoras do sítio de ligação do inserto no vetor pUC18 dos clones transformantes.

1: Padrão de peso molecular; 2 a 10: clones 1 a 9, respectivamente.



**Figura 15.** Resultado do sequenciamento das regiões portadoras de mutação no alelo *brlA* da linhagem CLB3.

A: Sequência de nucleotídeos -991 (11) a -849 (153) da fita senso que corresponde a uma parte da região promotora do transcrito  $\beta$ ; B: Sequência de nucleotídeos -104 (278) a +17 (154) da fita molde, que inclui a região do *intron*.



## 5. DISCUSSÃO GERAL

O mutante CLB3, cuja característica principal é a coloração marron do micélio e a escassez de esporos, foi obtido pela autora por tratamento com luz ultravioleta da linhagem *biA1 methG1* e faz parte de uma pequena coleção de supressores *methG* do laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos da Universidade Estadual de Maringá.

A análise microscópica resultou na detecção de anormalidades na formação dos conidióforos, como a presença de conidióforos secundários a partir de métulas desdiferenciadas. Este fenótipo é característico tanto de mutantes *bristle* leves ou intermediários (*leaky*) quanto de mutantes *medusa*. Estes últimos, no entanto, apresentam diminuição de pigmentação dos conidióforos e cadeias de métulas, duas características ausentes em CLB3. Portanto, a princípio, as características sugeriam tratar-se de um mutante *bristle*.

Os testes de alelismo, mapeamento por ciclo parassexual e por ciclo sexual confirmaram que o fenótipo do mutante é devido a um alelo do gene *brlA*.

A partir desta definição, foi analisado o comportamento do mutante em diversas condições, cuja interferência na conidiogênese estão descritas e permitem a caracterização do alelo frente a todos os demais, já conhecidos e documentados na literatura.

A primeira preocupação, no entanto, envolveu marcadores

nutricionais. MARTINELLI & CLUTTERBUCK (1970) estimaram em 83%, a frequência de linhagens com problemas na conidiogênese que resultam da ação de outros genes denominados "de suporte". Este foi o motivo da adoção, por sugestão destes autores, do critério de condicionar o estudo do desenvolvimento ao crescimento vegetativo normal do mutante.

CLUTTERBUCK (comunicação pessoal) admitiu que atualmente, com os conhecimentos disponíveis sobre boa parte dos genes envolvidos na regulação da conidiogênese, é possível analisar um mutante com crescimento vegetativo deficiente. A condição, no entanto, é a averiguação cuidadosa e exaustiva de todos os fatores nutricionais e fisiológicos para traçar o perfil do mutante e garantir que não haja interferência destes fatores nas análises do desenvolvimento.

Em vista deste critério, embora fosse evidente que o mutante CLB3 era portador de um alelo *brl*, foram analisadas todas as possíveis interferências nutricionais ou fisiológicas.

Esta linhagem apresenta três deficiências nutricionais: *biA1* (biotina), *methG1* (metionina) e *cysC* (cisteína). Além dessas marcas, existe uma deficiência no transporte de metionina do meio para o micélio. Todas estas funções são extremamente importantes para o fungo. Carência parcial de biotina impede a germinação dos conídios (SERLUPI-CRESCENZI et al., 1983). Metionina é um constituinte insubstituível, quer nos processos de síntese proteica, quer na produção de cisteína pela via catabólica, ou como precursor de S-adenosil-metionina (SAM) que é doador de grupos metil nos processos de metilação de RNA e DNA em *Aspergillus nidulans* (CLUTTERBUCK & SPATHAS, 1984). A cisteína, além da importância na conformação das proteínas que apresentam pontes dissulfeto, parece ser a molécula que controla o metabolismo do enxofre neste fungo (PASZEWSKI & PRAZMO, 1977 e

NATORFF et al., 1993). Em *Neurospora*, um dos genes envolvidos na regulação da biossíntese de cisteína é homólogo ao protooncogene *fos*, indicando assim, uma relação em nível maior, com os processos de controle da proliferação celular (APTE et al., 1974). Além de todas estas indicações, são conhecidas, as interferências sobre a conidiogênese das carências totais e parciais de vários aminoácidos (KASATKINA, 1961), de arginina (SERLUPI-CRESCENZI et al., 1983), de triptofano (YELTON et al., 1983), de fontes de nitrogênio (CLUTTERBUCK, 1974), de elementos-traço, como sulfato de zinco (MOLINA, 1993).

A comparação do fenótipo *bristle* em diferentes condições nutricionais, envolvendo aminoácidos e fonte de carbono, levaram a algumas conclusões importantes sobre o comportamento nutricional de CLB3.

*Aspergillus nidulans* tem 2 vias para a síntese da metionina. A principal envolve a produção de cisteína, que é convertida em metionina, tendo como intermediários, a cistationina e a homocisteína. A outra via promove a transulfuração da *O*-acetil homoserina a homocisteína e esta é convertida a metionina e, em sentido inverso à primeira via, a cisteína. Esta via, no entanto, habitualmente está desativada pela inibição que a cisteína produzida na via principal promove na enzima homocisteína-sintetase (PASZEWSKI & GRABSKI, 1973 e 1974). Os mutantes *methG1* que não convertem cistationina a homocisteína, produzem cisteína mas são incapazes de sintetizar metionina, a não ser que haja uma mutação anterior à síntese de cisteína (PASZEWSKI & GRABSKI, 1975) ou que promova a sua degradação por outra via (PASZEWSKI et al., 1994).

CLB3 cresceu em ausência de metionina, demonstrando supressão e não cresceu em ausência de metionina e presença de cisteína ou de *n*-propargilglicina, o que caracteriza a presença de um alelo *cys* (PIOTROWSKA &

PASZEWSKI, 1986). Pelo mapeamento meiótico (tabela 13) ficou definido que este é um alelo do gene *cysC*.

Na ausência de metionina, houve pouco crescimento vegetativo e praticamente nenhuma esporulação. Este resultado indica que a produção endógena de metionina em CLB3 foi insuficiente. É provável que a mutação no gene *cysC* detectada em CLB3 esteja permitindo alguma síntese de cisteína, o que impede uma produção adequada de metionina pela via alternativa.

Quando há suplementação de metionina no meio, o fungo normalmente faz o transporte ativo de uma quantidade muito maior desse aminoácido do que uma linhagem selvagem é capaz de produzir e necessita para seu metabolismo (NATORFF et al., 1993). No entanto, a suplementação de 50µg de metionina por mililitro de meio (0,33mM) não é suficiente para uma esporulação adequada de CLB3. Para que isto ocorra, é necessário, pelo menos, o dobro desta concentração. Linhagens deficientes para arginina precisam de maior quantidade destes aminoácidos para promover a esporulação (4mM) do que para crescer vegetativamente (0,25mM) (CLUTTERBUCK, 1992). Para metionina, no entanto, esta exigência não ocorre, uma vez que a linhagem *biA1 methG1* cresce e esporula normalmente com 0,33mM de metionina. A conclusão, neste caso, é que o transporte deste aminoácido não foi normal em CLB3, havendo necessidade de um excesso de metionina para induzir a permease.

Foi detectada mais uma deficiência para aminoácido nesta linhagem, pois a diferença de crescimento entre o meio suplementado com metionina e o meio completo pode ser reparada pela adição de caseína hidrolizada, que é fonte de aminoácidos, o que não aconteceu com a adição de vitaminas, ou de ácidos nucleicos. No entanto, dos 13 aminoácidos testados, nenhum mostrou-se eficiente, nem qualquer combinação entre eles, pois os 13 juntos não provocaram melhora no desenvolvimento.

Apesar destas deficiências, as análises feitas ao microscópio estereoscópico e ao microscópio ótico demonstraram claramente que nenhum destes nutrientes ou sua ausência alteraram a expressão do fenótipo *bristle*. Mesmo quando ocorreu a diferença de esporulação entre as duas concentrações de metionina, o que mudou foi o número de conidióforos e não a expressão do alelo *brl*.

CLUTTERBUCK (1969a) analisou o efeito de estabilizadores osmóticos e de temperatura sobre a conidiogênese de mutantes *bristle*. Algumas linhagens apresentavam sensível melhora na conidiogênese, desenvolvendo conidióforos menos aberrantes e com maior quantidade de conídios. Como a proteína Brl liga-se ao DNA, pois é um regulador a nível de transcrição, sugeriu-se posteriormente que este efeito podia ser explicado pela melhora nas condições de afinidade ao DNA, da proteína Brl produzida por certos mutantes (TIMBERLAKE & CLUTTERBUCK, 1994). Em todos os casos, a melhora ocorria na estrutura dos conidióforos, portanto, era qualitativa.

A linhagem CLB3 respondeu ao estabilizador osmótico e à temperatura de 25°C, aumentando a esporulação. Esta melhora, no entanto, ocorreu apenas em relação ao número total de conidióforos, portanto, era quantitativa, não alterando o nível de comprometimento destas estruturas, conforme foi comprovado ao microscópio estereoscópico e microscópio ótico. A indicação, porém, de que a resposta ao estabilizador osmótico não era devida à ação deste sobre a proteína Brl, ocorreu quando foi analisada, a linhagem CLY14. Este segregante de CLB3 apresentou um crescimento vegetativo normal, conidióforos anormais característicos do alelo *brl* de CLB3, assim como a proporção de estruturas malformadas em relação ao total. No entanto, o número de conidióforos desta linhagem era semelhante ao de uma linhagem controle ou de CLB3 em presença de estabilizador osmótico. A comparação entre as

estruturas de CLB3 e de CLY14 ou entre CLB3 em ausência e em presença de estabilizador osmótico mostrou uma relação inversa entre a quantidade de hifas aéreas e o número total de conidióforos. Uma vez que a linhagem CLY14 é portadora do alelo *brl* de CLB3, conclui-se que a determinação da quantidade de hifas aéreas não é determinada por este gene. Portanto, qualquer que seja o mecanismo de ação do estabilizador osmótico e da temperatura de 25°C, é improvável que haja uma interação com os níveis de proteína Brl ou com sua afinidade com o DNA.

Outra característica que responde à presença de estabilizador osmótico, é a superprodução de pigmento marron que caracteriza o micélio espessado e escuro de CLB3. Este traço desaparecia em presença de NaCl e a 25°C, portanto, em associação com o aumento da esporulação.

Quando estão presentes em um mesmo mutante, deficiências nutricionais, menor crescimento em relação ao normal, micélio marron e esporulação deficiente, comumente as características morfológicas são consideradas consequências da deficiência nutricional não complementada adequadamente pelo meio de cultura (KASATKINA, 1960 e LILLY, 1965).

A ocorrência de linhagens de fenótipo muito semelhante, os chamados setores deteriorados, originados a partir de linhagens com duplicações e translocações foi descrita por AZEVEDO & ROPER (1970). Neste caso, a perda de partes do fragmento duplicado pode levar a uma situação melhor do que a da linhagem duplicada (setor melhorado) ou pior (setor deteriorado). O fator genético responsável por esta morfologia, o determinante de deterioração pode ser um gene, um conjunto de genes ou um fragmento cromossômico (AZEVEDO, 1971; PACCOLA, 1982; POSSIEDE, 1985 e QUEIROZ, 1993).

Curiosamente, linhagens deterioradas, semelhantes fenotipicamente, mas diferentes genotipicamente, são melhoradas quando cultivadas em meio com

estabilizador osmótico (MOLINA, 1993). Esta melhora é considerada uma fenocópia porque o fenótipo normal só se mantém em meio com estabilizador. Estes resultados indicam que esta morfologia deteriorada é passível de ser corrigida com o aumento da osmolaridade do meio e determinada por um gene ou fator genético, como a presença de uma translocação, com efeito pleiotrópico.

Qual seria, no entanto, a origem da associação dos fatores crescimento vegetativo, excesso de pigmento e esporulação deficiente? O pigmento marron é melanina, importante componente da parede de *Aspergillus nidulans*, ao lado de quitina,  $\alpha(1,3)$ -glucana,  $\beta(1,3)$ -glucana, galactose e galactosamina (ZONNEVELD, 1971 e POLACHECK & ROSENBERGER, 1977). É um composto indólico (PIRT & ROWLEY, 1969 e BULL, 1970) e é sintetizado por uma fenoloxidase específica - a tirosinase (BULL & CARTER, 1973 e MARTINELLI & BAINBRIDGE, 1974). É secretada e, em seguida, depositada sobre a superfície externa da hifa, provavelmente para proteção contra lise por outros microrganismos (OLIVER, 1972).

A observação de dois outros fatores associados ao pigmento marron em CLB3, indicaram um novo caminho na análise desta questão: a temperatura de 25°C tem efeito semelhante ao do NaCl na produção de melanina e a carência de oxigênio, faz o contrário. Existem relatos de que a produção de melanina é favorecida por limitação de carbono, pH entre 7 e 8, temperatura entre 30 e 37°C e baixa tensão de oxigênio (ROWLEY & PIRT, 1972; ROWLEY & BULL, 1978 e GRIFFITH, 1994). MARTINELLI & BAINBRIDGE (1974) descreveram a existência de isoenzimas para a síntese de melanina com expressão relacionada com o desenvolvimento. Analisando a produção destas isoenzimas em diferentes mutantes, observaram em uma linhagem superprodutora de melanina, a inexistência de uma fração que é termosensível. Este gene foi denominado *mela* e mapeado no cromossomo VII. Outro aspecto relevante é que a produção de

melanina depende da diminuição no padrão de crescimento e não da exaustão do meio, o que não condiz com a idéia da origem na carência nutricional (ROWLEY & PIRT, 1972). De fato, nas placas crescidas durante 5 dias a 37°C e outros 5 dias a 25°C foi observado que, embora o meio estivesse mais pobre, o micélio não apresentou excesso de melanina nos 5 dias a 25°C. As análises microscópicas identificaram um padrão de crescimento mais lento, em presença de NaCl e a 25°C, o que está de acordo com os relatos de ROWLEY E PIRT (1972). Além disso, em presença de NaCl, todas as composições de meio apresentaram uma melhora apenas proporcional de crescimento, apesar do desaparecimento do pigmento marron ou seja, a deficiência nutricional existe e limita o crescimento vegetativo, com ou sem estabilizador osmótico, mas, no caso de CLB3, parece que foi a eliminação do pigmento que resultou na melhora da esporulação. As justificativas para esta relação causal são diversas. A melanização do micélio confere-lhe rigidez e impermeabilidade, o que dificulta as trocas com o meio, de nutrientes e oxigênio, ambos vitais para a conidiogênese (GRIFFITH, 1994). São conhecidos também, pelo menos 2 tipos de moléculas que são primeiramente secretadas para o meio para depois induzir as hifas próximas a desenvolverem conidióforos - fator psiA e o produto do gene acoD (CHAMPE et al., 1987; MAZUR et al, 1990; 1991 e ADAMS et al, 1992).

Existe ainda, a possibilidade de que a produção de melanina provoque uma diminuição na síntese do fator psiA por competição, uma vez que ambas as vias utilizam compostos fenólicos (BUTNICK et al, 1984b).

A resposta ao NaCl não ocorreu apenas na linhagem CLB3. Isto se deve ao fato de que, embora o *Aspergillus nidulans* seja classificado como um fungo xerotolerante (GRIFFIN, 1981) o crescimento radial sobre o meio sólido é ideal quando a este meio é acrescido 0,5M de NaCl. A resposta fenotípica é determinada pelo aumento da quantidade interna de glicerol, o osmorregulador

mais importante para os Ascomicotyna (HOCKING & NORTON, 1983; LUARD, 1982a; b e BEEVER & LARACY, 1986). Esta melhora é imediatamente refletida na mudança de padrão de septação e de ramificação das hifas vegetativas. Com a diminuição das ramificações, o crescimento apical da hifa é maior, uma vez que a síntese de parede torna-se diminuída nas regiões não apicais (CLUTTERBUCK, 1970a e KATZ & ROSENBERGER, 1971). Este padrão de menor ramificação e maior distância entre os septos também foi observado em CLB3 em todos os meios que continham NaCl e a 25°C. O efeito desta modificação de padrão de crescimento pode ser avaliado na relação diâmetro/peso úmido da colônia (Tabelas 4,6,7 e 8). TRINCI (1969), BAINBRIDGE & TRINCI (1969) e KATZ et al. (1976) demonstraram que a simples medida de crescimento radial sobre meio sólido não era uma boa estimativa de crescimento vegetativo, pois o aumento do número de ramificações do micélio reduzem o crescimento radial sem, contudo, diminuir obrigatoriamente o aumento da massa micelial. Nas Tabelas 4 e 6, foi calculado um crescimento radial para cada condição de meio, ponderando as medidas observadas, pela razão diâmetro/peso em meio completo. Desta maneira, foi possível mostrar que colônias de diâmetro maior, em alguns casos, tinham desenvolvimento menor, o que já tinha sido determinado pelo peso úmido da colônia, um parâmetro mais adequado.

A partir destas considerações e observações, parece razoável afirmar que o mutante CLB3 apresenta hipermelanização devido a um alelo mutante do gene *mela* ou de outro gene envolvido na síntese de melanina. A produção e estabilização da isoenzima ou de um regulador da sua produção, poderia ocorrer em presença de estabilizador osmótico, o que seria reforçado em pH igual a 5,0 ou pela temperatura de 25°C. A carência de oxigênio ou aumento de temperatura, por outro lado, induziria o aumento da produção de melanina, acarretando o espessamento do micélio e, em consequência, agravando a

deficiência de esporulação. Desta forma, poderia ser explicado o fato de que o estabilizador osmótico e a temperatura não exercem influência sobre o fenótipo *brl* deste mutante, apesar de aumentar o número de conidióforos.

A luz não provocou qualquer resposta em CLB3, CLY14, ou *biA1 methG1*, o que era previsto, uma vez que a maioria das linhagens mantidas em laboratório são mutantes para o gene *veA*.

Durante a caracterização da expressão do novo alelo, o primeiro aspecto que sobressaiu na análise citológica de CLB3 foi a heterogeneidade de anormalidades de conidióforos como também, a presença de conidióforos normais. Este caráter sugere variação. Normalmente, em todos os mutantes intermediários, há uma pequena variabilidade de morfologia nos conidióforos aberrantes. No entanto, não há qualquer registro na literatura, de um mutante com todas as gradações entre o normal e o afetado grave, em uma mesma colônia. CLUTTERBUCK (1969a e 1970b) descreveu o único *brl* variegado de sua coleção, o mutante *brlA12*, portador de uma translocação de parte do cromossomo VIII, com o ponto de quebra no início do gene *brlA* para o cromossomo III, próximo ao telômero. A maioria absoluta das estruturas (99%) era formada por hifas aéreas que cresciam indefinidamente, sem diferenciação posterior. Cerca de apenas 1% dos conidióforos eram normais ou próximos do normal. O mapeamento do gene responsável por esta anomalia mostrou ligação com marcadores do grupo III e VIII (CLUTTERBUCK, 1969; 1970b e CLUTTERBUCK & SPATHAS, 1984).

CLB3 apresentou um perfil muito diferente: havia grande número de hifas aéreas, em torno de 20% de conidióforos muito aberrantes com conidióforos secundários ou estruturas quase sem vesícula, com métulas lembrando longos dedos, sem fiálides ou conídios, 60% de conidióforos

intermediários, com poucas métulas por vesícula, mas com o restante do desenvolvimento normal, com poucos conídios e 20% de conidióforos normais.

O mapeamento mostrou ausência de translocação. Este fato impossibilita discutir a inativação do gene *brl* por efeito de posição, como ocorreu com *brlA12*.

As hifas aéreas e os conidióforos normais apresentavam-se como grandes complicadores na definição do comprometimento do novo alelo. À medida que os resultados sobre a superprodução de melanina no micélio foram se somando, o problema das hifas aéreas foi esclarecido. As hifas aéreas são conidióforos não diferenciados por ausência completa da expressão do gene *brlA* ou por falta de outros fatores envolvidos na indução da conidiogênese, antes da ação de *brl*, impedindo a sua expressão. Os mutantes *fluffy*, por exemplo, inicialmente descritos como mutantes com grande proliferação de hifas vegetativas, atualmente são reconhecidos como devidos a grande quantidade de hifas aéreas, em função da ausência do produto de um dos diversos genes *flu* ou *flb* já descritos (DORN, 1970 ;LEE & ADAMS, 1994a, WIESER & ADAMS, 1995). As linhagens selvagens para o gene *veA* são sensíveis à luz para a indução da conidiogênese, de maneira que, em presença de luz, desenvolve grande número de conidióforos e praticamente nenhuma hifa aérea, enquanto, no escuro, faz exatamente o contrário (MOONEY & YAGER, 1990). Esta foi a primeira indicação de que a haste do conidióforo se alonga até atingir um limite determinado, quando a expressão da proteína Brl provoca a diferenciação da vesícula e das demais estruturas. Se não há a produção desta proteína por conta da ausência de indução de VeA, a haste cresce indefinidamente, sem diferenciar.

SOM & KOLAPARTHI (1994), em uma série de experimentos com o produto do gene *Aras*, homólogo ao protooncogene *ras*, obtiveram, por transformação, a expressão de níveis controlados da forma ativa (que se liga a

GTP) e da forma inativa (que se liga a GDP) da proteína. Concluíram que esta proteína é responsável pelas decisões da diferenciação durante todo o ciclo do fungo. Durante a germinação, os níveis da forma ativa são altos e, durante o desenvolvimento, estes níveis vão diminuindo progressivamente para que cada nova etapa seja iniciada. Se os níveis permanecem mais altos do que o normal durante a indução da conidiogênese, há formação de uma grande quantidade de hifas aéreas e poucos conidióforos. Como acontece com a luz, a expressão de níveis baixos de ARas ativa induz a diferenciação maciça de conidióforos, sem hifas aéreas. Se a proteína Stu é imprescindível para o controle espacial da expressão de *brl*, provavelmente ARas é a proteína responsável por deflagrar o primeiro pulso de tradução de Brl, para a formação da vesícula.

De acordo com estas evidências, as hifas aéreas desenvolvem-se devido à ausência de Brl nesta região do micélio. Este fato pode ser determinado por três causas: primeira, a presença de um alelo *brlA* que condicione um fenótipo *bristle grave*; segunda, a presença de um alelo mutado para um dos genes que induzem *brlA*; terceira, a ausência de algum fator ambiental que induz a conidiogênese ou mutações gênicas que interfiram na recepção destes estímulos, como *veA* ou *mela*.

Desta forma, se uma mutação no gene *brl* é responsabilizada pela carência desta proteína, é improvável que um alelo que condicione um fenótipo intermediário, levando algumas estruturas à diferenciação, possa estar totalmente inativo em outras, a não ser por uma translocação, como foi descrito para *brlA12*.

Em CLB3, os experimentos de inibição do pigmento no micélio resultaram no desaparecimento das hifas aéreas. Estes resultados indicam que o bloqueio que determina a produção destas estruturas é anterior à expressão de *brl*. A análise do segregante CLY14 veio confirmar esta conclusão, excluindo, portanto, as hifas indiferenciadas da responsabilidade do novo alelo.

Neste trabalho, ao se estudar os conidióforos intermediários, encontramos sempre malformações a nível de vesícula e/ou métulas. As deficiências de métula restringiram-se à fase anterior à sua diferenciação. Segundo observações de OLIVER (1972), logo depois do primeiro pulso de proteína Brl, há a diferenciação da vesícula e o brotamento das métulas. Só então, os núcleos migram para as métulas e a sua diferenciação é concluída de maneira autônoma. Estes resultados sugerem que a quantidade de proteína Brl que é encaminhada para cada métula juntamente com o citoplasma, durante o seu brotamento, vai induzir os genes para a etapa final da sua diferenciação e brotamento das fiálides. Logicamente, quando há pouca expressão de proteína Brl na vesícula, uma métula poderia receber uma quantidade insuficiente para o pulso de indução e esta métula bioquimicamente se comportaria como a haste que a originou e começaria a crescer como uma nova haste. Esta interpretação justificaria também, o fato de algumas vesículas apresentarem uma métula não diferenciada, crescendo como haste secundária, ao lado de métulas diferenciadas, com fiálides e conídios. O pequeno número de métulas que brota de uma vesícula deficiente consegue desenvolver métulas normais, fiálides e cadeias de conídios. Se a quantidade de métulas não fosse associada ao desenvolvimento da vesícula, e houvesse um grande número de métulas para receber uma quantidade deficiente de proteína Brl, provavelmente nenhum destes conidióforos chegariam a formar conídios. A falta de sincronismo também deve ser resultante das diferentes quantidades de proteína Brl em cada métula. Esta observação indica que o sincronismo encontrado normalmente, na diferenciação das estruturas de um conidióforo, depende de um mínimo de proteína Brl produzida na vesícula que garanta uma sobra nas métulas, suficiente para contornar pequenos desvios na distribuição deste produto durante o brotamento.

O transcrito de *brl* que é traduzido nesta fase, é o  $\beta$ . Uma mutação na região dos *zinc fingers* é capaz de provocar o mesmo efeito que foi descrito, pois este tipo de mutação altera a afinidade da proteína Brl com o DNA nos promotores dos genes que ela regula. Isto resultaria na produção de níveis normais da proteína nas vesículas e mótulas, no entanto, uma proteína com atividade insuficiente. Todos os mutantes de CLUTTERBUCK (1969a e 1992), com exceção de 2, possuem a mutação nesta região do gene. No entanto, como os dois transcritos ( $\alpha$  e  $\beta$ ) apresentam a região estrutural em comum, uma mutação deste tipo, compromete também o transcrito  $\alpha$  e a proteína que é produzida na mótula e vai para a fiálide para promover a sua diferenciação autônoma, como ocorreu com a mótula. Se a proteína não tem atividade normal, a fiálide se comporta como uma mótula e fica repetindo esta fase, originando uma cadeia de mótulas.

O mutante CLB3 não apresentou esta aberração. Sempre que uma mótula conseguiu se diferenciar, ela originou uma fiálide funcional e uma cadeia de conídios. Esta característica indica que o problema ocorre a nível de transcrito  $\beta$  somente, como acontecia com uma linhagem construída por PRADE & TIMBERLAKE (1993), com expressão apenas de transcrito  $\alpha$ . Como CLB3 tem a maioria dos conidióforos menos aberrantes que o do mutante construído, concluiu-se que há uma diminuição na quantidade, não a ausência completa da proteína sintetizada a partir do transcrito  $\beta$ . Se fosse admitido este raciocínio, a mutação neste alelo estaria fora da região estrutural, em algum ponto do promotor, de maneira a diminuir a transcrição de  $\beta$  ou na região que regula a tradução deste transcrito, na região  $\mu$ ORF ou na sua proximidade.

O mapeamento intragênico foi feito para testar esta hipótese. As análises de recombinação e de conversão gênica mapearam o alelo novo a 5'

dos três alelos mapeadores, no mesmo grupo do mutante *brlA17*. Procurando maiores informações sobre o fenótipo de *brlA17*, encontramos o relato de que é um dos dois mutantes intermediários de CLUTTERBUCK (1969a) que não mapeiam na região dos *zinc-fingers*. Um deles é o *brlA12*, portador da translocação, e *brlA17* que, além de mapear muito distante desta região, apresenta uma característica curiosa: é normalmente grave, mas se apresenta com fenótipo intermediário em presença de paramomicina.

O mutante CLB3 foi, então, submetido ao teste da neomicina. Este aminoglicosídeo, como a paramomicina, atua a nível ribossômico, suprimindo mutações de ponto do tipo "*nonsense*" e "*missense*". Como consequência, algumas proteínas inativas por substituição de apenas 1 aminoácido ou por serem menores em função de um codon de terminação prematuro, passam a ser traduzidas na sua forma nativa, funcional. O mRNA carregando a cópia da mutação pode ser traduzido de forma a suprimir os efeitos desta mutação, uma vez que o ribossomo atacado pelo antibiótico lê de forma incorreta, alguns codons. O mesmo efeito acontece quando os ribossomos apresentam um fenótipo supersupressor (ROBERTS et al., 1979 e MARTINELLI & ROBERTS, 1983).

A linhagem CLB3 respondeu a neomicina, melhorando a esporulação, suprimindo parcialmente, o fenótipo *bristle*, pelo aumento da produção de proteína Brl, o que foi comprovado pela diminuição relativa de conidióforos afetados.

Para a localização da mutação por metodologia molecular, foi amplificada apenas a região 5' do gene, desde o final do promotor, até a proximidade da região estrutural, por indicação dos resultados obtidos pelas análises citológicas e genéticas.

A análise de RFLP não evidenciou polimorfismo de sítios de restrição para 5 enzimas que têm sequências de reconhecimento nesta parte do gene. Restou, então, sequenciar este fragmento de 1137 pares de base.

O sequenciamento localizou duas mutações: uma transição C→T no nucleotídeo -881 e uma transição T→C no nucleotídeo -71. A primeira está situada a -24 do início de transcrição do transcrito  $\beta$  e a segunda, na região do *intron*. A mutação no *intron* poderia dificultar o processamento do transcrito e levar a sua instabilidade ou à tradução de uma proteína inativa. Como há evidências de um controle na expressão de Brl a nível de processamento, este tipo de dano poderia resultar em um desajuste na regulação temporal do aparecimento de Brl traduzida a partir de  $\beta$ . No entanto, os resultados citológicos e fisiológicos demonstraram uma deficiência parcial de Brl, sem comprometimento temporal de sua expressão. A mutação a -24 do início de transcrição poderia ocasionar uma diminuição nos níveis de transcrição, que resultaria em menor quantidade de Brl na vesícula de cada conidióforo. Em consequência de todas as observações apresentadas neste trabalho, é provável que esta última, seja a mutação responsável pelo fenótipo característico da conidiogênese na linhagem CLB3.

Entretanto, se CLB3 não apresenta qualquer comprometimento na tradução, não deveria responder a neomicina. O transcrito  $\beta$  é regulado, como já foi mencionado, a nível de transcrição, de processamento e de tradução. O controle de tradução é feito pelo início da leitura do  $\mu$ ORF, não podendo faltar o codon AUG. Após o reconhecimento deste codon de iniciação, há uma preservação do transcrito  $\beta$  de maneira a formar um gradiente de mRNA ao longo da haste, com maior concentração na extremidade, para promover um grande pulso de tradução no momento da diferenciação da vesícula. Como o mecanismo de controle a nível de tradução não é conhecido, é possível que a neomicina seja

capaz de subverter parcialmente a repressão da tradução, promovendo um aumento na síntese proteica a partir de cada molécula de mRNA. Isto justificaria a supressão observada em CLB3.

Há um aspecto importante de CLB3 a esclarecer - a variação. Este mutante apresentava 20% de conidióforos normais. Como explicar tal fato sem translocação e sem o concurso de alguma interação com outro gene? Um dos achados no início da caracterização do mutante foi a existência de dois tamanhos de conídios, compatíveis com uma mistura de haplóides e diplóides. Este caráter também foi visto em suspensão de conídios de CLY14. Supondo-se uma capacidade aumentada de fusão de núcleos no micélio deste mutante, o resultado seria um heterocário com núcleos haplóides e diplóides. Se eventualmente um núcleo diplóide estivesse envolvido na formação de um conidióforo, a produção de proteína Brl a partir dos núcleos desta haste seria o dobro em relação a outra contendo apenas núcleos haplóides. Como a deficiência deste alelo envolve quantidade de proteína traduzida, a consequência natural deste desenvolvimento seria um conidióforo normal com os conídios diplóides. Para testar esta hipótese, foram observados, os núcleos em diferentes partes do micélio e o diâmetro dos conídios. CLUTTERBUCK & ROPER (1966) analisaram a distribuição de núcleos em heterocários haplóide-diplóide de *Aspergillus nidulans*. O tamanho dos núcleos haplóides e diplóides só pode ser comparado quando presentes na mesma hifa, pois a variabilidade não permitiu comparação segura entre núcleos de diferentes partes da colônia. Desta forma, o diagnóstico da ploidia nas diferentes hifas de CLB3 não pode seguir o critério do diâmetro de seus núcleos. CLUTTERBUCK (1969b) observou que o número de núcleos por hifa intersticial era um parâmetro seguro para a determinação da ploidia de um micélio, pois há uma relação direta de volume de citoplasma por lote cromossômico. Seguindo este critério, foi possível demonstrar que o micélio de CLB3 era, de fato, um

heterocário haplóide-diplóide, o que indiretamente já havia sido confirmado pela grande quantidade de conídios com diâmetro próprio de diplóides.

Outra confirmação surgiu de forma inesperada. Um heterocário, se não estiver sob pressão nutricional, tende a dar setores com um só dos dois tipos de núcleos. Embora seja um evento raro, CLB3 originou setores melhorados, exclusivamente diplóides. A análise citológica de um desses setores, CLV3, confirmou a diferença apenas a nível de ploidia entre o setor e CLB3. Este setor originou um setor de morfologia idêntica a CLB3, mas com grande capacidade de diploidizar. Este comportamento foi totalmente eliminado pelo repique uma única vez em meio com o haploidizante Benlate.

Se for considerada, a afirmação de CLUTTERBUCK (1969a e 1970b) de que o estudo da variação em *Aspergillus nidulans* é original e muito relevante, as informações sobre o mutante CLB3 constituem uma contribuição importante neste campo, pois abre uma nova possibilidade para uma linha de pesquisa, até então desconhecida.

Como *brl* é o gene para diferenciação mais estudado e, conseqüentemente, mais conhecido em *Aspergillus nidulans*, este trabalho, além de apresentar a corroboração ao modelo de HAN et al (1993) e algumas contribuições adicionais, vem trazer também, dois pontos de reflexão: o primeiro é que um sistema ou um gene nunca está esgotado para o estudo genético, principalmente quando se trata da diferenciação em eucariotos; segundo, que a metodologia molecular, que veio enriquecer tanto a capacidade de observação do geneticista, não pode substituir a exaustiva, trabalhosa, mas generosa metodologia clássica.

## 6. CONCLUSÕES

Em consequência dos resultados apresentados neste trabalho, foram estabelecidas as seguintes conclusões:

1. O mutante CLB3 é portador de um novo alelo do gene *brlA* que determina o desenvolvimento de conidióforos anormais caracterizados por diferentes comprimentos de haste, pequeno número de métulas, ausência de sincronismo no desenvolvimento e presença de conidióforos secundários;
2. É provável que a deficiência na conidiogênese do mutante CLB3 seja devida a uma mutação na região promotora, a -24pb do início de transcrição do mRNA $\beta$  resultando na diminuição da transcrição deste mRNA e consequente deficiência da produção de proteína Brl a nível de vesícula;
3. O crescimento vegetativo deficiente não interfere no fenótipo *bristle*;
4. A diminuição do número total de conidióforos, observada em CLB3, e seu aumento, em resposta ao estabilizador osmótico e temperatura de 25°C mostra relação direta com a superprodução de melanina no micélio;
5. A variação representada pela presença de 20% de conidióforos muito aberrantes (hifas aéreas), 60% de conidióforos intermediários com poucas métulas e conídios e 20% de conidióforos normais é devida à manutenção de CLB3 como um heterocário haplóide-diplóide estável.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, T.H.; BOYLAN, M.T.; TIMBERLAKE, W.E. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. **Cell**, v.54, p. 353-62, 1988.

ADAMS, T.H.; DEISING, H.; TIMBERLAKE, W.E. *brlA* requires both zinc fingers to induce development. **Molecular and Cellular Biology**, v.10, p. 1815-17, 1990.

ADAMS, T.H.; HIDE, W.A.; YAGER, L.N.; LEE, B.N. Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. **Molecular and Cellular Biology**, v.12, p. 3827-33, 1992.

ADAMS, T.H.; TIMBERLAKE, W.E. Developmental repression of growth and gene expression in *Aspergillus*. **Proceedings of National Academy of Science U.S.A.**, v.87, p. 5405-09, 1990.

AGUIRRE, J. Spatial and temporal controls of the *Aspergillus nidulans brlA* developmental regulatory gene. **Molecular Microbiology**, v.8, p. 211-18, 1993.

- AGUIRRE, J.; ADAMS, T.H.; TIMBERLAKE, W.E. Spatial control of developmental regulatory genes in *Aspergillus nidulans*. **Experimental Mycology**, v.14, p. 290-93, 1990.
- ANDRIANOPOULOS, A.; TIMBERLAKE, W.E. The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. **Molecular and Cellular Biology**, v.14, p.2503-15, 1994.
- APIRION, D. A general system for the automatic selection of auxotrophs and prototrophs and vice-versa in microorganisms. **Nature**, v.195, p. 959-61, 1962.
- APIRION, D. Formal and physiological genetics of ascospore colour in *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v.4, p. 276-283, 1963.
- APTE, B.N.; BHAVSAR, P.N.; SIDDIQI, O. The regulation of aryl sulphatase in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Molecular Biology**, v.86, p. 637-48, 1974.
- ARST, H.N., Jr. Regulation of gene expression by oxygen, phosphorus and pH. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. ed. ***Aspergillus: 50 years on***. New York: Elsevier, 1994. p.369-80.
- AXELROD, D.E. Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v.73, p. 181-84, 1972.

- AXELROD, D.E.; GEALT, M.; PASTUSHOK, M. Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. **Developmental Biology**, v.34, p. 9-15, 1973.
- AZEVEDO, J.L. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. Sheffield, 1971 p. 240. Tese (PhD) - University of Sheffield.
- AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. *Aspergillus nidulans*. In: COSTA, S.O.P.; AZEVEDO, J.L. ed. **Exercícios Práticos de Genética**. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 1973. Apêndice, p.257.
- AZEVEDO, J.L.; OLIVEIRA, A.; ROCHA CAMPOS, A.J. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. **Summa Phytopathologica**, v.2, p. 237-41, 1976.
- AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; DANTAS-DARCE, M.M.C. Survival of haploid, diploid and disomic conidia of *Aspergillus nidulans* to mutagenic agents. **Revista de Biologia**, v.12, p. 271-8, 1983.
- AZEVEDO, J.L.; ROPER, J.A. Mitotic nonconformity in *Aspergillus nidulans*: successive and transposable genetic changes. **Genetical Research**, v.16, p. 79-93, 1970.
- BAGGA, P.S.; SHARMA, S.; SANDHU, D.K. Developmentally related changes in the production and expression of endo- $\beta$ -1,4-glucanases in *Aspergillus nidulans*. **Genome**, v.32, p. 288-92, 1989.

- BAINBRIDGE, B.W. A simple and rapid technique for obtaining a high proportion of hybrid cleistothecia in *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v.23, p. 115-17, 1974.
- BAINBRIDGE, B.W.; TRINCI, P.J. Colony and specific growth rates of normal and mutant strains of *Aspergillus nidulans*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.53, p. 473-75, 1969.
- BALL, C.; AZEVEDO, J.L. A "fluffy" mutant in *Aspergillus nidulans*. **Aspergillus Newsletter**, v.5, p. 9, 1964.
- BARACHO, I.R.; VANCOVSKY, R.; AZEVEDO, J.L. Correlations between size and hybrid or selfed state of cleistothecia in *Aspergillus nidulans*. **Transaction of British Mycological Society**, v.54, p. 109-16, 1970.
- BARBATA, G.; VALDERS, L.; SERMONTI, G. **Molecular and General Genetics**, v.126, p. 227-32, 1973. Citado por YAGER (1992).
- BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Ascospore number and viability in hybrid and selfed cleistothecia of *Aspergillus nidulans*. **Revista Brasileira de Genética**, v.12, p. 211-7, 1989.
- BEEVER, R.E.; LARACY, E.P. Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, v.168, p. 1358-65, 1986.
- BENJAMIN, C.R. Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycologia**, v.47, p. 669-87, 1955.

- BORGIA, P.T. Roles of the *orlA*, *tsE*, and *bimG* genes of *Aspergillus nidulans* in chitin synthesis. **Journal of Bacteriology**, v.174, p. 384-9. 1992.
- BOYLAN, M.T.; MIRABITO, P.M.; WILLETT, C.E.; ZIMMERMANN, C.R.; TIMBERLAKE, W.E. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. **Molecular and Cellular Biology**, v.7, p. 3113-18, 1987.
- BRODY, H.; CARBON, J. Electroforetic karyotype of *Aspergillus nidulans*. **Proceedings of National Academy of Science U.S.A.**, v. 86, p. 6260-63, 1989.
- BRODY, H.; GRIFFITH, J.; CUTICCHIA, A.J.; ARNOLD, J.; TIMBERLAKE, W.E. Chromosome-specific recombinant DNA libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. **Nucleic Acids Research**, v.19, p. 3105-08, 1991.
- BULL, A.T. Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. **Journal of General Microbiology**, v.63, p. 75-94, 1970.
- BULL, A.T.; CARTER, B.L.A. The isolation of tyrosinase from *Aspergillus nidulans*, its kinetic and molecular properties and some consideration of its activity *in vivo*. **Journal of General Microbiology**, v.75, p. 61-73, 1973.

- BUSBY, T.M.; MILLER, K.Y.; MILLER, B.L. Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans medusa* mutation by altered dosage of the *bristle* and *stunted* genes. **Genetics**, v.143, p. 155-63, 1996.
- BUTNICK, N.Z.; YAGER, L.N.; KURTZ, M.B.; CHAMPE, S.P. Genetic analysis of mutants of *Aspergillus nidulans* blocked at an early stage of sporulation. **Journal of Bacteriology**, v.160, p. 541-45, 1984a.
- BUTNICK, N.Z.; YAGER, L.N.; HERMANN, T.E.; KURTZ, M.B.; CHAMPE, S.P. Mutants of *Aspergillus nidulans* blocked at early stage of sporulation secrete an unusual metabolite. **Journal of Bacteriology**, v.160, p. 533-34, 1984b.
- CADDICK, M.X.; BROWNLEE, A.G.; ARST, H.N., Jr. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. **Molecular and General Genetics**, v.203, p. 346-53. 1986.
- CHAMPE, S.P.; EL-ZAYAT, A.A.E. Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, v.171, p. 3982-88, 1989.
- CHAMPE, S.P.; KURTZ, M.B.; YAGER, L.N.; BUTNICK, N.J.; AXELROD, D.E. Spore formation in *Aspergillus nidulans*: competence and other developmental processes. In: TURIAN, G.; HOHL, H. ed. **The fungal spore: morphogenetic controls**. New York: Academic Press, 1981. p. 255-76.

- CHAMPE, S.P.; NAGLE, D.L.; YAGER, L.N. Sexual sporulation. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. ed. *Aspergillus: 50 years on*. New York: Elsevier, 1994. c.17, p. 429-54.
- CHAMPE, S.P.; RAO, P.; CHANG, A. An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v.133, p. 1383-87, 1987.
- CHAMPE, S.P.; SIMON, L.D. Cellular differentiation and tissue formation in the fungus *Aspergillus nidulans*. In: ROSSOMANDO, E.F.; ALEXANDER, S. ed. **An analyses of the development of biological structure**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1992. p. 63-91.
- CHANG, Y.C.; TIMBERLAKE, W.E. Identification of *Aspergillus* brlA response elements (BREs) by genetic selection in yeast. **Genetics**, v.135, p. 29-38, 1992.
- CLUTTERBUCK, A.J. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v.63, p. 317-27, 1969a.
- CLUTTERBUCK, A.J. Cell volume per nucleus in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v.55, p. 291-99, 1969b.
- CLUTTERBUCK, A.J. Further comments on gene symbols. *Aspergillus Newsletter*, v.10, p. 26-28, 1969c.

- CLUTTERBUCK, A.J. Synchronous nuclear division and septation in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v.60, p. 133-35, 1970a.
- CLUTTERBUCK, A.J. A variegated position effect in *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v.16, p. 303-16, 1970b.
- CLUTTERBUCK, A.J. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v.70, p. 423-435, 1972.
- CLUTTERBUCK, A.J. *Aspergillus nidulans*. In: KING, R.C., ed. **Handbook of Genetics**. New York: Plenum Publishing, 1974. cap. 26, p. 447-510.
- CLUTTERBUCK, A.J. Cyclic AMP levels during growth and conidiation. **Aspergillus News Letters**, v.12, p. 13-5, 1975.
- CLUTTERBUCK, A.J. The genetics of conidiation in *Aspergillus nidulans*. In: PATEMAN, J.A.; SMITH, J.E. ed. **Genetics and physiology of Aspergillus**. New York: Academic Press, 1977. p. 305-17.
- CLUTTERBUCK, A.J. The genetics of conidiophore pigmentation in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v.136, p. 1731-38, 1990.
- CLUTTERBUCK, A.J. Linkage map and locus list. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. ed. **Aspergillus: 50 years on**. New York: Elsevier, 1994. appendix I, p.791-824.

- CLUTTERBUCK, A.J.; ROPER, J.A. A direct determination of nuclear distribution in heterokaryons of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v.7, p. 185-94, 1966.
- CLUTTERBUCK, A.J.; SPATHAS, D.H. Genetic and environmental modification of gene expression in the *brlA12* variegated position effect mutant of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v.43, p. 123-38, 1984.
- CLUTTERBUCK, A.J.; STARK, M.S.; GUPTA, G. An intragenic map of the *brlA* locus of *Aspergillus nidulans*. **Molecular and General Genetics**, v.231, p. 212-16, 1992.
- CLUTTERBUCK, A.J.; TIMBERLAKE, W.E. Genetic regulation of sporulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. In: RUSSO, V.E.A.; BRODY, S.; COVE, D.; OTTOLENGHI, S. ed. **Development**. London: Springer-Verlag, 1992. cap. 7, p. 103-18.
- COOTE, J.G., MANDELSTAM, J. Use of constructed double mutants for determining the temporal order of expression of sporulation genes in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 114, p. 1254-63, 1973.
- COVE, D.J. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*. Studies of mutants altered in nitrate assimilation. **Molecular and General Genetics**, v.146, p. 147-59, 1976.
- CYBIS, J.; NATORFF, R.; LEWANDOWSKA, I.; PRAZMO, W.; PASZEWSKI, A. Mutations affecting cysteine synthesis in *Aspergillus nidulans*:

- characterization and chromosome mapping. **Genetical Research**, v.51, p. 85-8, 1988.
- DANGEARD, P.A. L'origine du périthèce chez les ascomycetes. **Botaniste**, v.10, p. 1-385, 1907. Citado por PONTECORVO et al. (1953).
- DIETZEL, C.; KURJAN, J. Pheromonal regulation and sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* SST2 gene: a model for desensitization to pheromone. **Molecular and Cell Biology**, v.7, p. 4169-77, 1987.
- DORN, G. Genetic analysis of the phosphatases in *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v.6, p. 13-26, 1965a.
- DORN, G. Phosphatase mutants in *Aspergillus nidulans*. **Science**, v.150, p.1183-4 1965b,
- DORN, G.L. Genetic and morphological properties of undifferentiated and invasive variants of *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v.66, p. 267-79, 1970.
- DORN, G.L.; MARTIN, G.M.; PURNELL, D.M. Genetic and cytoplasmic control of undifferentiated growth in *Aspergillus nidulans*. **Life Sciences**, v.6, p. 629-33, 1967.
- DRING, D.M. Techniques for microscopic preparation. In: BOOT, G. ed **Methods in Microbiology**. London: Academic Press, 1971, v.4, p. 95-111.

- EIDAM, E. Zur kenntniss der entwicklung bei den Ascomyceten. III Sterigmatocystis nidulans n. sp. **Cohn. Beitr. Biol. Pfl.**, v.3, p. 392-411, 1883. Citado por PONTECORVO et al. (1953).
- ELLIOT, C.G. The cytology of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v.1, p. 462-76, 1960.
- FIDDY, C.; TRINCI, A.P.J. Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiol.**, v.97, p. 169-84, 1976.
- FORBES, E. Use of mitotic segregation for assigning genes to linkage groups in *Aspergillus nidulans*. **Heredity**, v.13, p. 67-80, 1959.
- GEALT, M.A.; AXELROD, D.E. Coordinate regulation of enzyme inducibility and developmental competence in *Aspergillus nidulans*. **Developmental Biology**, v.41, p. 224-32, 1974.
- GEMS, D.H.; CLUTTERBUCK, A.J. Enhancers of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v.137, p. 79-85, 1994.
- GEMS, D.H.; JOHNSTONE, I.L.; CLUTTERBUCK, A.J. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. **Gene**, v.98, p. 61-67, 1991.

- GIMENO, C.J.; LJUNGDAHL, P.O.; STYLES, C.A.; FINK, G.R. Unipolar cell divisions in the yeast *S.cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and Ras. **Cell**, v.68, p. 1077-90, 1992.
- GRIFFIN, D.M. Water and microbial stress. **Advances on Microbiology and Ecology**, v.5, p. 91-136, 1981.
- GRIFFITH, G.W. Phenoloxidases. In: MATINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. *Aspergillus: 50 years on*. London: Elsevier, 1994, c.28, p. 763-88.
- GRIFFITH, G.W.; JENKINS, G.I.; MILNER-WHITE, E.J.; CLUTTERBUCK, A.J. Homology at the amino acid level between plant phytochromes and a regulator of asexual sporulation in *Emericella* (=Aspergillus) *nidulans*. **Photochemistry and Photobiology**, v.59, p. 252-6, 1994.
- GUEHMANN, S.; VORBRUEGGEN, G.; KALKBRENNER, F.; MOELLING, K. Reduction of a conserved Cys is essential for Myb DNA-binding. **Nucleic Acids Research**, v.9, p. 2279-2286, 1992.
- HALL, N.E.L.; AXELROD, D.E. Interference of cellular ferric ions with DNA extraction and the application to methods of DNA determination. **Analytical Biochemistry**, v.79, p. 425-30, 1977.
- HALL, N.E.L.; AXELROD, D.E. Sporulation competence in *Aspergillus nidulans*: a role for iron in development. **Cell Differentiation**, v.7, p. 73-82, 1978.

- HAN, S.; NAVARRO, J.; GREVE, R.A.; ADAMS, T.H. Translational repression of *brlA* expression prevents premature development in *Aspergillus*. **EMBO Journal**, v.12, p. 2449-57, 1993.
- HASTIE, A.J. Benlate induced instability of *Aspergillus nidulans* diploids. **Nature**, v.226, p. 271, 1970.
- HENRARD, P. Polarité heredité, et variation chez diverses espèces d'*Aspergillus*. **Cellule**, v.43, p. 351-424, 1934. Citado por PONTECORVO et al. (1953).
- HERMANN, T.E.; KURTZ, M.B.; CHAMPE, S.P. Laccase localized in hülle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, v.154, p. 955-64, 1983.
- HINNEBUSCH, A.G. Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.81, p. 6442-46, 1984.
- HOCKING, A.D.; NORTON, R.S. Natural-abundance <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies on the internal solutes of xerophilic fungi. **Journal of General Microbiology**, v.129, p. 2915-25, 1983.
- HOUGHTON, J.A. A new class of slow-growing non-perithecial mutants of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v.16, p. 285-292, 1970.

- HOUGHTON, J.A. Biochemical investigation of the slow-growing non-perithecial (sgp) mutants of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v.17, p. 237-44, 1971.
- JOHNSTONE, I.L.; HUGHES, S.G.; CLUTTERBUCK, A.J. Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. **EMBO Journal**, v.4, p. 1307-11, 1985.
- JUNG, V.; CHEN, L.; HOFMANN, S.L.; WIGLER, M.; POWERS, S. Mutations in the SHR5 gene of *Saccharomyces cerevisiae* suppress Ras function and block membrane attachment and palmitoylation of Ras proteins. **Molecular and Cellular Biology**, v.15, p. 1333-42, 1995.
- JURGENSON, J.E.; CHAMPE, S.P. The sexual and asexual spores of *Aspergillus nidulans* contain partially overlapping sets of mRNAs. **Experimental Mycology**, v.14, p. 89-93, 1990.
- KÄFER, E. An 8-chromosomal map of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v.9, p. 105-45, 1958.
- KÄFER, E. The origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v.52, p. 217-32, 1965.
- KÄFER, E. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. **Advances in Genetics**, v.19, p. 33-131, 1977.

- KÄFER, E.; CHEN, T.L. Translocations and recessive lethals induced in *Aspergillus nidulans* by ultraviolet light and gamma rays. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.6, p. 249-54, 1964.
- KASATKINA, I.D. The morphology of aminoacid deficient variants of *Aspergillus nidulans* as a function of the composition of the medium. **Mikrobiologiia**, v.29, p. 367-70, 1961.
- KATZ, D.; GOLDSTEIN, D.; ROSENBERGER, R.F. Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters. **Journal of Bacteriology**, v. 109, p. 1097- 1100, 1972.
- KATZ, D; ROSENBERGER, R.F. Hyphal wall synthesis in *Aspergillus nidulans*: effect of protein synthesis inhibition and osmotic shock on chitin insertion and morphogenesis. **Journal of Bacteriology**, v.108, p. 184-90, 1971.
- KIRK, K.E.; MORRIS, N.R. The tubB  $\alpha$ -tubulin gene is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans*. **Genes & Development**, v.5, p. 2014-23, 1991.
- KURTZ, M.B. Regulation of fructose transport during growth of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v.118, p. 389-96, 1980
- KURTZ, M.B.; CHAMPE, S.P. Genetic control of transport loss during development of *Aspergillus nidulans*. **Developmental Biology**, v.70, p. 82-88, 1979.

- KURTZ, M.B.; CHAMPE, S.P. Dominant spore color mutants of *Aspergillus nidulans* defective in germination and sexual development. **Journal of Bacteriology**, v.148, p. 629-38, 1981.
- KWIATOWSKI, Z.; BOHDANOWICZ, K. New mycelial mutants in *Aspergillus nidulans*. **Acta Microbiologica Polonica**, v.11, p. 17-20, 1962.
- LAW, D.J.; TIMBERLAKE, W.E. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, v.144, p. 509-17, 1980.
- LEE, B.N.; ADAMS, T.H. The *Aspergillus nidulans* fluG gene is required for production of an extracellular developmental signal. **Genes and Development**, v.8, p. 641-51, 1994a.
- LEE, B.N.; ADAMS, T.H. Overexpression of flbA, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of brlA and premature initiation of development. **Molecular Microbiology**, v.14, p. 323-34, 1994b.
- LEE, B.N.; ADAMS, T.H. *fluG* and *flbA* function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* $\beta$  activation. **EMBO Journal**, v.15, p. 299-309, 1995.
- LHOAS, P. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with p-fluorophenylalanine. **Nature**, v.190, p. 744, 1961.

- LILLY, L.J. An investigation of the suitability of the suppressors of *meth1* in *Aspergillus nidulans* for the study of induced and spontaneous mutation. **Mutation Research**, v.2, p. 192-95, 1965.
- LOCKINGTON, R.A.; SEALY-LEWIS, H.M.; SCAZZOCCHIO, C.; DAVIES, R.W. Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*, **Gene**, v.33, p. 137-49, 1985.
- LOSICK, R.; KROOS, L.; ERRINGTON, J.; YOUNGMAN, P. Pathways of developmentally regulated gene expression in *Bacillus subtilis*. In: HOPWOOD, D.A.; CHATER, K.F. ed. **Genetics of bacterial diversity**. San Diego: Academic Press, 1989. p. 221-242.
- LUARD, E.J. Accumulation of intracellular solutes by two filamentous fungi in response to growth at low steady state osmotic potential. **Journal of General Microbiology**, v.128, p. 2563-74, 1982a.
- LUARD, E.J. Effect of osmotic shock on some intracellular solutes in two filamentous fungi. **Journal of General Microbiology**, v,128, p. 2575-81, 1982b.
- LUNA, E.A. Condição nuclear em *Pleospora raetica* em cultura. Recife, 1977. p. 66. Tese (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- MARSHALL, M.A.; TIMBERLAKE, W.E. *Aspergillus nidulans* wetA regulates spore-specific gene expression. **Molecular and Cellular Biology**, v.11, p. 55-62, 1991.

- MARTINELLI, S.D. Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged culture. **Transaction of the British Mycological Society**, v.67, p. 121-28, 1976.
- MARTINELLI, S.D. Phenotypes of double conidiation mutants of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v.114, p. 277-87, 1979.
- MARTINELLI, S.D. *Aspergillus nidulans* as an experimental organism. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R., ed. ***Aspergillus: 50 years on***. New York: Elsevier, 1994. cap. 4, p. 33-58.
- MARTINELLI, S.D.; BAINBRIDGE, B.W. Phenoloxidasas of *Aspergillus nidulans*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.67, p. 121-28, 1974.
- MARTINELLI, S.D.; CLUTTERBUCK, A.J. A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v.69, p. 261-68, 1971.
- MARTINELLI, S.D.; ROBERTS, T. Diagnosis of nonsense mutations in *Aspergillus nidulans*. **Bioscience Reports**, v.3, p. 11-7, 1983.
- MAYORGA, M.E.; TIMBERLAKE, W.E. Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* wA gene. **Genetics**, v.126, p. 73-79, 1990.

- MAZUR, P.; MEYERS, H.V.; NAKANISHI, K.; EL-ZAYAT, E.A.A.; CHAMPE, S.P. Structural elucidation of sporogenic fatty acid metabolites in *Aspergillus nidulans*. **Tetrahedron Letters**, v.31, p. 3837-40, 1990.
- MAZUR, P.; NAKANISHI, K.; EL-ZAYAT, E.A.A.; CHAMPE, S.P. Structure and synthesis of sporogenic psi factors from *Aspergillus nidulans*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 1486-87, 1991.
- MILLER, J.; MCLACHLAN, A.D.; KLUG, A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. **EMBO Journal**, v.4, p. 1609-14, 1985.
- MILLER, B.L. The developmental genetics of asexual reproduction in *Aspergillus nidulans*. **Seminars on Developmental Biology**, v.1, p. 207-19, 1990.
- MILLER, K.Y.; TOENNIS, T.M.; ADAMS, T.H.; MILLER, B.L. Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene. **Molecular and General Genetics**, v.227, p. 285-92, 1991.
- MILLER, K.Y.; WU, J.; MILLER, B.L. StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. **Genes and Development**, v.6, p. 1770-82, 1992.
- MIMS, C.W.; RICHARDSON, E.A.; TIMBERLAKE, W.E. Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. **Protoplasma**, v.44, p. 132-141, 1988.

- MIRABITO, P.M.; ADAMS, T.H.; TIMBERLAKE, W.E. Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. **Cell**, v.57, p. 859-68, 1989.
- MITCHELL, P.J.; TJIAN, R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. **Science**, v.245, p. 371-78, 1989.
- MOLINA, S.M.G. Estudos de fenocópia em variantes com determinantes de deterioração em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1993. 274p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MOONEY, J.L.; HASSETT, D.E.; YAGER, L.N. Genetic analysis of suppressors of the veA1 mutation in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v.126, p. 869-74, 1990.
- MOONEY, J.L.; YAGER, L.N. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. **Genes and Development**, v.4, p. 1473-82, 1990.
- MORPURGO, G. Somatic segregation induced by p-fluorophenylalanine. **Aspergillus Newsletter**, v.2, p. 10, 1961.
- MORRIS, N.R. Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v.26, p. 237-54, 1976.
- MORRIS, N.R.; ENOS, A.P. Mitotic gold in a mold: *Aspergillus* genetics and the biology of mitosis. **Trends in Genetics**, v.8, p. 32-37, 1992.

- MORTON, A.G. The induction of sporulation in mould fungi. **Proceedings of Royal Society of London**, v.153, p. 548-69, 1961.
- MUELLER, P.P.; HINNEBUSCH, A.G. **Cell**, v.45, p.201-07, 1976. Citado por HINNEBUSCH (1984).
- MYRSET, A.H.; BOSTAD, A.; JAMIN, N.; LIRSAC, P.; TOMA, F.; GABRIELSEN, O.S. DNA and redox state induced conformational changes in the DNA-binding domain of Myb oncoprotein. **EMBO Journal**, v.12, p. 4625-33, 1993.
- NATORFF, R.; BALINSKA, M.; PASZEWSKI, A. At least four regulatory genes control sulphur metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. **Molecular and General Genetics**, v.238, p. 185-92, 1993.
- OAKLEY, B.R. Gamma-tubulin, the microtubule organiser? **Trends in Cellular Biology**, v.2, p. 1-5. 1992.
- O'HARA, E.B.; TIMBERLAKE, W.E. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *yA* locus. **Genetics**, v.121, p. 249-54, 1989.
- OLIVER, P.T.P. Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v.73, p. 45-54, 1972.
- ORR-WEAVER, T.L.; SZOSTAK, J.W. Fungal recombination. **Microbiological Reviews**, v.49, p. 33-58, 1985.

- PACCOLA, L.D. Estudo genético e citológico em variantes deteriorados de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1982. p. 130. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP.
- PASCON, R.C. Isolamento e caracterização de setores deteriorados da linhagem *Abcn* de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1994. p. 123. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP.
- PASZEWSKI, A.; GRABSKI, J. Studies on  $\beta$ -cystathionase and O-acetylhomoserine sulfhydrylase as the enzymes of alternative methionine biosynthetic pathways in *Aspergillus nidulans*. **Acta Biochimica Polonica**, v.20, p. 159-68, 1973.
- PASZEWSKI, A.; GRABSKI, J. Regulation of S-amino acids biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. **Molecular and General Genetics**, v.132, p. 307-20, 1974.
- PASZEWSKI, A.; GRABSKI, J. Enzymatic lesions in methionine mutants of *Aspergillus nidulans*: role and regulation of an alternative pathway for cysteine and methionine synthesis. **Journal of Bacteriology**, v.124, p. 893-904, 1975.
- PASZEWSKI, A.; BRZYWCZY, J.; NATORFF, R. Sulfur metabolism. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. *Aspergillus: 50 years on*. London: Elsevier, 1994, c.12, p. 299-319.

- PASZEWSKI, A.; PRAZMO, W. Regulation of homocysteine metabolizing enzymes in *Aspergillus nidulans*. **Molecular and General Genetics**, v.155,p. 109-12, 1977.
- PIOTROWSKA, M.; PASZEWSKI, A. Propargylglycine as a fungal inhibitor: effect on sulphur amino acid metabolism. **Journal of General Microbiology**, v.132, p. 2753-60, 1986.
- PIRT, S.J.; ROWLEY, B.I. Melanin production in *Aspergillus nidulans*. **Biochemical Journal**, v.114, p. 9-10, 1969.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Effect of the *bcnA* gene on the instability of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v,48, p. 145-150, 1986a.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Characterization and genetical analysis of an *Aspergillus nidulans* strain that produces multinucleate conidia. **Transaction of British Mycological Society**, v.86, p. 123-30, 1986b.
- POLACHECK, I.; ROSENBERGER, R.F. *Aspergillus nidulans* mutant lacking  $\alpha$ -(1,3)-glucan, melanin and cleistothecia. **Journal of Bacteriology**, v.132, p. 650-56, 1977.
- PONTECORVO, G. The genetical control of nutritional requirements in microorganisms and its application to microbiological assays. **Proceedings of Nutrition. Society**, v.5, p. 182-86, 1946.

- PONTECORVO, G. Genetic systems based on heterocaryosis. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology**, v.11, p. 193-201, 1947.
- PONTECORVO, G. Genetical technique for self-fertile (homothallic) microorganisms. **Proceedings of the 5th. International Congress of Genetics**, p. 642-43, 1949a.
- PONTECORVO, G. Auxanographic techniques in biochemical genetics. **Journal of General Microbiology**, v.3, p. 122-26, 1949b.
- PONTECORVO, G. New fields in the biochemical genetics of microorganismos. **Biochemistry Society Symposium**, v.4, p. 40-50, 1950.
- PONTECORVO, G. Non random distribution of multiple mitotic crossing-over among nuclei of heterozygous diploid *Aspergillus*. **Nature**, v.170, p. 204, 1952a.
- PONTECORVO, G. The genetical formulation of gene structure and action. **Advances in Enzymology**, v.13, p. 121-49. 1952b.
- PONTECORVO, G. Genetical analysis of cell organization. **Symposium of the Society of Experimental Biology**, v.6, p. 218-29, 1952c
- PONTECORVO, G. Mitotic recombination in the genetic system of filamentous fungi. **Caryologia Supplement**, v.6, p. 192-200, 1954.

- PONTECORVO, G. The parasexual cycle. **Annual Reviews of Microbiology**, v.10, p. 393-400, 1956.
- PONTECORVO, G.; FORBES, E.; ADAM, O.B. Genetics of the homothallic ascomycete *Aspergillus nidulans*. **Heredity**, v.3, p. 385, 1949.
- PONTECORVO, G.; KÄFER, E. Genetic analysis based on mitotic recombination. **Advances in Genetics**, v.9, p. 71-104, 1958.
- PONTECORVO, G; ROPER, J.A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. **Proceedings of the Journal of General Microbiology**, vol.6, p. vii, 1952.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MACDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v.5, p. 141-238, 1953.
- POSSIEDE, Y.M. Mutagenicidade pela produção de setores em linhagens diplóides e duplicadas de *Aspergillus nidulans*. Curitiba, 1985. p. 94. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.
- PRADE, R.A.; TIMBERLAKE, W.E. The *Aspergillus nidulans* brlA regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. **EMBO Journal**, v.12, p. 2439-47, 1993.
- PRITCHARD, R.H. The linear arrangement of a series of alleles in *Aspergillus nidulans*. **Heredity**, v.9, p. 343-71, 1955.

- PRITCHARD, R.H. Localized negative interference and its bearing on models of gene recombination. **Genetical Research**, v.1, p. 1-24, 1960.
- PUTRAMENT, A.; ROZBICKA, T.; WOJCIECHOWSKA, K. The highly polarized recombination pattern within the *methA* gene of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v.17, p. 125-31, 1971.
- QUEIROZ, M.V. Caracterização molecular e clonagem gênica em *Aspergillus nidulans* portador de duplicação cromossômica. Piracicaba, 1993. p. 116. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". USP.
- RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v.1, p. 17-20, 1985.
- RAMBOSEK, J.; LEACH, J. Recombinant DNA in filamentous fungi: progress and prospects. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v.6, p. 357-93, 1987.
- ROBERTS, C.F. A replica plating technique for the isolation of nutritional exacting mutants of a filamentous fungus (*A.nidulans*). **Journal of General Microbiology**, v.20, p. 540-48, 1959.
- ROBERTS, C.F. Complementation in balanced heterokaryons and heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v.5, p. 211-29, 1964.

- ROBERTS, T.; MARTINELLI, S.D.; SCAZZOCHIO, C. Allele-specific, gene unspecific suppressors in *Aspergillus nidulans*. **Molecular and General Genetics**, v.177, p. 57-64, 1979.
- ROPER, J.A. Search for linkage between genes determining a vitamin requirement. **Nature**, v.166, p. 956-57, 1950a.
- ROPER, J.A. Back mutations in *Aspergillus nidulans*. **Microbial Genetics Bulletin**, v.3, p. 7-8, 1950b.
- ROPER, J.A. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. **Experientia**, v.8, p. 14-15, 1952.
- ROPER, J.A. Nucleo-cytoplasmic interactions in *Aspergillus nidulans*. **Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology**, v.23, p. 141-154, 1958.
- ROPER, J.A. Mechanisms of inheritance: the parasexual cycle. In: AINSWORTH, G.C.; SUSSMAN, A.S. **The fungi**. New York: Academic Press, 1966, v.2, p. 589-617.
- ROPER, J.A. *Aspergillus*. In: HOLLAENDER, A. **Chemical mutagens**. New York: Plenum Press, 1971. v.2, c.12, p. 343-63.
- ROPER, J.A. The early history In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. ed. ***Aspergillus: 50 years on***. New York: Elsevier, 1994. cap. 1, p. 3-20.

- ROSENBERGER, R.F.; KESSEL, M. Synchrony of nuclear replication in individual hyphae of *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, v.94, p. 1464-69, 1967.
- ROWLEY, B.I.; BULL, A.T. Influence of growth rate history on production of melanin by *Aspergillus nidulans*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.70, p. 453-55, 1978.
- ROWLEY, B.I.; PIRT, S.J. Melanin production by *Aspergillus nidulans* in batch and chemostat culture. **Journal of General Microbiology**, v.72, p. 553-63, 1972.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANTOS, F.R., PENA, S.D.J.; EPPLEN, J.T. **Human Genetics**, v.90, p. 655-56, 1993.
- SAXENA, R.K.; SINHA, U. Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged liquid culture. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.19, p. 141-46, 1973.
- SCHENA, M.; YAMAMOTO, K.R. Mammalian glucocorticoid receptor derivatives enhance transcription in yeast. **Science**, v.241, p. 965-67, 1988.

- SCHWARZ, W. Entwicklungsphysiologische untersunchungen überer die gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*. **Flora**, v.23, p. 386-440, 1928. Citado por PONTECORVO (1953).
- SERLUPI-CRESCENZI, O; KURTZ, M.B.; CHAMPE, S.P. Developmental defects resulting from arginine auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v.129, p. 3535-44, 1983.
- SEWALL, T.C. Cellular effects of misscheduled *brlA*, *abaA*, and *wetA* expression in *Aspergillus nidulans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p. 1035-42, 1994.
- SEWALL, T.; MIMS, C.W.; TIMBERLAKE, W.E. Conidial differentiation in wild type and *wetA*- strains of *Aspergillus nidulans*. **Developmental Biology**, v.138, p. 499-508, 1990a.
- SEWALL, T.; MIMS, C.W.; TIMBERLAKE, W.E. *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. **The Plant Cell**, v.2, p. 731-39, 1990b.
- SKROMNE, I.; SANCHEZ, O.; AGUIRRE, J. Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans brlA* regulatory gene. **Microbiology**, v.141, p. 21-8, 1995.
- SOM, T.; KOLAPARTHI, V.S.R. Developmental decisions in *Aspergillus nidulans* are modulated by Ras activity. **Molecular and Cellular Biology**, v.14, p. 5333-48, 1994.

- SPECHT, C.A.; DIRUSSO, C.C.; NOVOTNY, C.P.; ULLRICH, R.C. A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry**, v.119, p. 158-63, 1982.
- STRINGER, M.A.; DEAN, R.A.; SEWALL, T.C.; TIMBERLAKE, W.E. Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. **Genes & Development**, v.5, p. 1161-71, 1991.
- TAMAME, M.; ANTEQUERA, F.; VILLANUEVA, J.R.; SANTOS, T. High-frequency conversion to a "fluffy" developmental phenotype in *Aspergillus* spp by 5-azacytidine treatment: evidence for involvement of a single nuclear gene. **Molecular and Cellular Biology**, v.3, p. 2287-97, 1983.
- TAMAME, M.; SANTOS, E. Demonstration of 5-methyl cytosine occurrence in the genome of *Aspergillus nidulans*. **Cellular Biochemistry**, v.13, p. 214, 1989.
- TANAKA, Y.; MURATA, N.; KATO, H. Behavior nucleio and chromosome during ascus development in the matting between either rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. **Annals of the Fitopathology Society of Japan**, v.45, p. 182-91, 1979.
- THIJS, H.; GARDE, J.; GOOSEN, T.; TOMSETT, B.; SWART, K.; HEYTING, C.; VAN DEN BROEK, H.W.J. Polarity of meiotic gene conversion is 5' to 3' within the *niaD* gene of *Aspergillus nidulans*. **Molecular and General Genetics**, v.247, p. 343-50, 1995.

TIMBERLAKE, W.E. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. **Developmental Biology**, v.78, p. 497-510, 1980.

TIMBERLAKE, W.E. Molecular genetics of *Aspergillus* development. **Annual Reviews on Genetics**, v.24, p. 5-36, 1990.

TIMBERLAKE, W.E. Cloning and analysis of fungal genes. In: BENNETT, J.W.; LASURE, L. ed. **More gene manipulations in fungi**. Orlando: Academic Press, 1991 p. 51-85.

TIMBERLAKE, W.E.; CLUTTERBUCK, A.J. Genetic regulation of conidiation. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. ed. ***Aspergillus: 50 years on***. New York: Elsevier, 1994. p. 383-27.

TIMBERLAKE, W.E.; HAMMER, J.E. Regulation of gene activity during conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. In: SETLOW, J.K. ed. **Genetic Engineering**. New York: Holander, 1986. p. 1-29.

TIMBERLAKE, W.E.; MARSHALL, M.A. Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. **Trends in Genetics**, v.4, p. 162-69, 1988.

TOENNIS, T.; MILLER, K.Y.; MILLER, B.L. Citado por PRADE & TIMBERLAKE (1993).

TOKIWA, G.; TYERS, M.; VOLPE, T.; FUTCHER, B. Inhibition of G1 cyclin activity by the Ras/cAMP pathway in yeast. **Nature**, v.371, p. 342-5, 1994.

- TRINCI, A.P.J. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. **Journal of General Microbiology**, v.57, p. 11-24, 1969.
- TRINCI, A.P.J.; MORRIS, N.R. Morphology and growth of a temperature-sensitive mutante of *Aspergillus nidulans* which forms aseptate mycelia at non-permissive temperatures. **Journal of General Microbiology**, v.114, p. 53-9, 1979.
- TURNER, G Vectors for genetic manipulation. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. ed. *Aspergillus: 50 years on*. New York: Elsevier, 1994. p. 641-665.
- VAN DE VATE, C.; JANSEN, G.J.O. Meiotic recombination in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v.31, p. 29-52, 1978.
- WIESER, J.; LEE, B.N.; FONDON, J.W.; ADAMS, T.H. Genetic requirement for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics**, v.27, p. 62-69, 1994.
- WIESER, J.; ADAMS, T.H. flbD encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. **Genes & Development**, v.9, p. 491-502, 1995.
- YAGER, L.N. Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. In: BENNETT, J.W.; KLICH, M.A. ed. *Aspergillus: biological and industrial applications*. Massachusetts: Butterworth, 1992. p. 19-42.

- YAGER, L.N.; KURTZ, M.B.; CHAMPE, S.P. Temperature-shift analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. **Developmental Biology**, v.93, p. 92-103, 1982.
- YELTON, M.M.; HAMER, J.E.; de SOUZA, E.R.; MULLANEY, E.J.; TIMBERLAKE, W.E. Developmental regulation of the *Aspergillus nidulans* *trpC* gene. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.80, p. 7576-80, 1983.
- YELTON, M.M.; HAMER, J.E.; TIMBERLAKE, W.E. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.81, p. 1470-74, 1984.
- YELTON, M.M.; TIMBERLAKE, W.E.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. A cosmid for selecting genes by complementation in *Aspergillus nidulans*: selection of the developmentally regulated *yA* locus. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.82, p. 834-38, 1985.
- YUILL, E. The numbers of nuclei in conidia of *Aspergilli*. **Transaction of British Mycological Society**, v.33, p. 324-31, 1950.
- ZIMMERMANN, C.R.; ORR, W.C.; LECLERC, R.F.; BARNARD, E.C.; TIMBERLAKE, W.E. Molecular cloning and selection of genes regulated in *Aspergillus* development. **Cell**, v.21, p. 709-15, 1980.

ZONNEVELD, B.J.M. Biochemical analysis of the cell wall of *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.249, p. 506-14, 1971.

ZONNEVELD, B.J.M. Morphogenesis in *Aspergillus nidulans*: the significance of a-1,3-glucan of the cell wall and a-1,3-glucanase for cleistothecium development. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.273, p. 174-187, 1972.

ZONNEVELD, B.J.M. a-1,3-glucan synthesis correlated with a-1,3-glucanase synthesis, conidiation and fructification in morphogenetic mutants of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v.81, p. 445-51, 1974.

ZONNEVELD, B.J.M. Biochemistry and ultrastructure of sexual development in *Aspergillus*. In: SMITH, J.E.; PATEMAN, J.A. ed. **Genetics and Physiology of *Aspergillus***. London: Academic Press, 1977. p. 59-80.