

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
COMPARADA

ANÁLISE DE FATORES GENÉTICOS QUE DETERMINAM AS
DIFERENTES MORFOLOGIAS DE MUTANTES NO SISTEMA
METIONINA EM *Aspergillus (=Emericella) nidulans*

Acadêmica: Kátia Farias Vitali

Maringá, 18 de fevereiro de 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA EM PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
COMPARADA

ANÁLISE DE FATORES GENÉTICOS QUE DETERMINAM AS
DIFERENTES MORFOLOGIAS DE MUTANTES NO SISTEMA
METIONINA EM *Aspergillus (=Emericella) nidulans*

Acadêmica: Kátia Farias Vitali

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Lúcia de Mello Sartori Cardoso da Rocha

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas.

Maringá, 18 de fevereiro de 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

Vitali, Kátia Farias

V836a Análise de fatores genéticos que determinam as diferentes morfologias de mutantes no sistema metionina em *Aspergillus* (=Emericella) *nidulans*. / Kátia Farias Vitali. -- Maringá, 2019.

37 f. : il., color., tabs., figs.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Carmen Lúcia de Mello Sartori Cardoso da Rocha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada - Área de Concentração: Biologia das Interações Orgânicas, 2019.

1. Mutantes morfológicos. 2. Teste de mutagenicidade. 3. Biossíntese de metionina. I. Rocha, Carmen Lúcia de Mello Sartori Cardoso da, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada - Área de Concentração: Biologia das Interações Orgânicas. III. Título.

CDD 21.ed. 581.15

AHS-CRB-9/1065

FOLHA DE APROVAÇÃO

NOME DO ALUNO
Kátia Farias Vitali

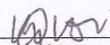
Título da dissertação/tese:
**ANÁLISE DE FATORES GENÉTICOS QUE DETERMINAM AS
DIFERENTES MORFOLOGIAS DE MUTANTES NO SISTEMA
METIONINA EM *Aspergillus (=Emericella) nidulans***

Dissertação/tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre/Doutor em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

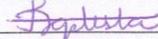
COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Carmem Lúcia de Mello Sartori Cardoso da Rocha
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)



Prof. Dr. Melyssa Negri
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dr. Franciele Baptista
Centro Universitário Integrado

Aprovada em: 28 de fevereiro de 2018.

Local de defesa: Bloco G80, sala 121, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por abençoar imensamente minha vida, colocando pessoas incríveis em meu caminho e me ofertando oportunidades que nunca imaginei serem alcançáveis.

Agradeço aos melhores pais, Edson e Solange, por terem me ensinado o valor dos estudos, me apoiado, confiado sempre em mim e trabalhado para que eu chegasse até aqui.

Agradeço meus irmãos, Estevam e Éderson, por serem os melhores irmãos do mundo e não medirem esforços para me ajudar.

Agradeço minha querida avó Ana, que me ensinou muito, que ansiou comigo o resultado das provas, festejou comigo o ingresso ao mestrado e infelizmente não pôde me ver defender o título.

Agradeço meu marido, Ronny, pela compreensão, por confiar em mim, por me apoiar e incentivar meus estudos.

Aos meus sogros, Jaime e Yuriko, por me apoiarem e me ajudarem sempre que precisei para que pudesse concluir este trabalho.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Carmem Lúcia, por ser um exemplo como professora, pesquisadora e pessoa. Sou grata a Deus por sua existência e pela oportunidade que Ele me deu, de ter uma querida orientadora de PICs, PIBICs, de mestrado e de vida.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, pela oportunidade de continuar minha formação acadêmica.

Agradeço a Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, por estar sempre preocupada com os alunos, ser prestativa, nos manter informados, nos auxiliar em nossas dúvidas e nos apoiarem.

Agradeço a CAPES/CNPq pela bolsa concedida e pelo incentivo ao estudo.

RESUMO

Aspergillus nidulans é um ascomiceto filamentosos, considerado modelo de estudo para diversas áreas da Genética. Na mutagênese, o sistema metionina, foi o mais utilizado durante duas décadas. A reversão de auxotrofia para prototrofia ocorre por supressão gênica, resultando em quatro diferentes morfologias. O objetivo do presente trabalho foi analisar os mecanismos genéticos responsáveis pela possível relação entre a supressão da auxotrofia para metionina no sistema *methG* (reversão) e a determinação das morfologias das colônias revertentes. Foram obtidos revertentes dos quatro morfotipo a partir da linhagem *biA1methG1*. Foram analisados o desenvolvimento vegetativo das colônias e a esporulação em meio de cultura sem metionina para estabelecer a estabilidade de cada morfologia durante 5 dias em 10 gerações. Foi observada a resposta a diferentes concentrações de metionina e de cisteína que são os aminoácidos envolvidos nesta supressão. Os revertentes foram cruzados dois a dois para análise de complementação em heterocários. Os mapeamentos mitótico e meiótico foram feitos por meio de cruzamentos do tipo B com a linhagem MSE. Nenhum dos morfotipos mostrou-se estável, convertendo-se em outro morfotipo a partir de algumas gerações. A resposta a diferentes concentrações de metionina provocou uma mudança gradativa no fenótipo, indicando que as morfologias eram devidas a diferentes níveis de produção de metionina. Corroborando esta hipótese, a linhagem *biA1methG1* quando cultivada em diferentes concentrações de metionina, apresentou os morfotipos na ordem D-B-C-A de forma progressiva, de acordo com o aumento da concentração desse aminoácido. A cisteína mostrou-se inibitória para cada morfotipo, indicando que esse aminoácido dificulta a síntese de metionina do revertente. O mapeamento mitótico localizou o gene supressor no cromossomo V e o mapeamento meiótico caracterizou-o como sendo o gene *cys C*. A conclusão do presente trabalho é que ocorrem mutações no gene *cys C* resultando no bloqueio da síntese de cisteína na via biossintética usual, liberando a atividade da enzima responsável pela via alternativa. Pequenas diferenças no bloqueio, devido a diferentes mutações no mesmo gene, levam a diferentes níveis de síntese de metionina e conseqüente variações nos fenótipos.

PALAVRAS-CHAVE

Mutantes morfológicos; teste de mutagenicidade; biossíntese de metionina

ABSTRACT

Aspergillus nidulans is a filamentous ascomycete used as a model in several areas of Genetics. The methionine system has been used for decades in mutagenesis. Reversion of auxotrophy to prototrophy occurs by suppression, with four different morphologies. Current paper analyzes the genetic factors involved in the determination of these morphotypes. Revertants of the four morphotypes were obtained from *biA1methG1* strain. The vegetative development of colonies and the sporulation in culture medium without methionine were analyzed to establish the stability of each morphology, during five days, within ten generations. Response to different concentrations of methionine and cysteine was reported. Revertants were crossed two by two for the analysis of complementation in heterokaryons. Mitotic and meiotic mapping was undertaken by crossings between type B and MSE strain. No morphotype was stable and it transformed itself into another type as from some generations. Response to different methionine concentrations caused a gradual change in the phenotype and indicated that morphologies were due to different levels of methionine production. When *biA1methG1* strain was cultured in different methionine concentrations, it provided a morphotype according to increasing concentration in the order D-B-C-A, corroborating the above-mentioned hypothesis. Cysteine had an inhibitory effect for each morphotype and revealed that cysteine made difficult the revertant's methionine system. Mitotic mapping pinpointed the suppressor gene on chromosome V and meiotic mapping was characterized as gene *cys C*. Results showed that mutations occurred in gene *cys C* with the blockage of cysteine synthesis within the usual biosynthetic pathway, releasing enzyme activity through an alternative pathway. Owing to different mutations in the same gene, small differences in the blockage caused different synthesis levels of methionine and consequent phenotype variations.

Keywords: morphological mutants; mutagenicity test, biosynthesis of methionine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. <i>Aspergillus nidulans</i>	9
2.2. Desenvolvimento em <i>Aspergillus nidulans</i>	9
2.3. Testes de mutagenicidade.....	10
2.4. Sistema metionina.....	11
2.5. Genes para a deficiência nutricional de metionina.....	11
2.6. Bioquímica do sistema metionina	12
2.7. Morfologias do sistema metionina.....	12
3. METODOLOGIA	
3.1. Linhagens.....	14
3.2. Meios de cultura.....	14
3.3. Obtenção dos mutantes <i>su meth</i> ⁺ de cada morfotipo.....	14
3.4. Análise da estabilidade das morfologias dos supressores.....	15
3.5. Análise da resposta dos supressores a diferentes concentrações de metionina.....	15
3.6. Análise da resposta dos supressores a diferentes concentrações de cisteína.....	15
3.7. Análise da resposta da complementação em heterocários de diferentes combinações de supressores.....	15
3.8. Mapeamento meiótico cada morfotipo.....	16
3.9. Mapeamento mitótico de supressor tipo B.....	16

4. RESULTADOS

4.1.Obtenção dos mutantes supressores meth ⁺ de cada morfotipo.....	17
4.2.Análise da estabilidade das morfologias dos supressores.....	17
4.3.Análise da resposta dos supressores a diferentes concentrações de metionina.....	20
4.4.Análise da resposta dos supressores a diferentes concentrações de cisteína.....	23
4.5. Análise da complementação de heterocários de diferentes combinações de supressores.....	25
4.6. Mapeamento mitótico.....	26
4.7. Mapeamento meiótico.....	26
5. DISCUSSÃO.....	27
6. REFERÊNCIAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

O fungo filamentosso *Aspergillus nidulans* foi identificado por Eidam (1883). No entanto, foi a partir das pesquisas de Guido Pontecorvo, na década de 50, que esse ascomiceto tornou-se modelo biológico para os trabalhos na área da Genética. Por essa razão, diversas técnicas foram desenvolvidas para utilizar este modelo nas mais variadas áreas de estudo, como mutagênese, recombino gênese mapeamento genético, controle do ciclo celular, apoptose, oncogenes e controle do desenvolvimento.

Lorna Lilly em 1965 propôs o sistema metionina para detecção do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos. Durante mais de três décadas esse sistema foi utilizado no mundo todo e publicado nas melhores revistas da área. Os revertentes que são produzidos nos experimentos deste sistema apresentam curiosamente quatro diferentes tipos de morfologias. Foram feitos estudos bioquímicos para caracterizar a mutação reversa por supressão, porém ainda não foram esclarecidos os mecanismos responsáveis pelas diferentes morfologias.

Os estudos genéticos sobre alguns tipos de mutantes morfológicos, iniciados por Clutterbuck em 1969, despertaram a atenção para os genes e os processos de regulação gênica responsáveis pela sequência de eventos que levam a germinação dos conídios, ao crescimento das colônias, a conidiogênese e ao ciclo sexual. Assim, a genética do desenvolvimento de *Aspergillus nidulans* tem produzido grande número de contribuições para a compreensão dos ciclos de vida dos organismos eucariotos.

Considerando a importância dos testes de mutagenicidade e o conhecimento disponível sobre os genes responsáveis pelo desenvolvimento das colônias, o presente trabalho teve como objetivo, estudar os mecanismos genéticos responsáveis pela possível relação entre a supressão da auxotrofia para metionina no sistema *methG* e a determinação das morfologias das colônias revertentes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Aspergillus nidulans*

O ascomiceto *A. nidulans*, é um fungo amplamente estudado na área da Genética devido a algumas características que facilitam sua manipulação em laboratório, tais como: presença de fase vegetativa e esporulação tanto no ciclo assexuado quanto sexual; cruzamentos de fácil obtenção; ciclo de vida curto possuindo fase haploide e diploide; capacidade de desenvolvimento em meios de cultura definidos e complexos, além de morfogênese bem definida (CLUTTERBUCK e TIMBERLAKE, 1992; ELLIOT, 1960; MILLER, 1990; UPSHALL, 1981).

O fácil emprego das técnicas moleculares, as funções teciduais bastante diferenciadas com regulação morfogenética complexa e a possibilidade de isolamento e análise de compostos bioquímicos estágio-específicos a partir da indução de sincronismo na conidiogênese são fatores que determinam a exploração dos mecanismos de regulação do desenvolvimento nesse ascomiceto (TIMBERLAKE e MARSHALL, 1988; MILLER, 1990).

2.2. Desenvolvimento em *Aspergillus nidulans*

O ciclo de vida de *A. nidulans* é composto por 3 fases distintas: a fase vegetativa, que começa com a germinação do esporo e vai até o crescimento da colônia, formado por meio do crescimento das hifas; a fase de conidiogênese, ou esporulação assexuada, onde ocorre o desenvolvimento dos conídios, chamados esporos assexuais, formados dentro de uma estrutura específica, denominada de conidióforo; e a fase de ascospogênese ou esporulação sexuada, na qual ocorre a formação dos ascósporos, esporos sexuais, dentro de corpos de frutificação, denominados de cleistotécios ou ascoma, estruturas formadas a partir da fusão de hifas ascógenas (PONTECORVO, et al., 1953).

A. nidulans, como todos os organismos que possuem meiose, apresentam haploidia e diploidia, porém nesse fungo, os núcleos diplóides e haplóides podem estar presentes em todas as fases do ciclo de vida, enquanto na maioria dos organismos, a fase diploide é dominante e a fase haploide ocorre apenas na formação dos gametas (ADAMS, 1998; CLUTTERBUCK, 1969 a e b; UPSHALL, 1981).

Embora o desenvolvimento de cada fase do ciclo de vida de *A. nidulans* seja geneticamente determinado, o fungo responde a fatores externos diversos, como: temperatura, pH, luz, fatores nutricionais e agentes físicos e químicos. Por este motivo, várias linhagens têm sido empregadas para testes de resposta a agentes inibidores, mutagênicos, recombinogênicos, clastogênicos, antimutagênicos etc. (ROCHA e AZEVEDO, 1986; TIMBERLAKE e CLUTTERBUCK, 1994; ROCHA, 1997).

Ao longo dos estudos genéticos do desenvolvimento deste fungo, algumas classes de mutantes foram sendo descritas. Entre essas, encontra-se a classe de mutantes morfológicos, em que estão subdivididas em mutantes para o crescimento e ciclo celular, mutantes para conidiogênese e mutantes para ciclo sexual (CLUTTERBUCK, 1969 a; AXELROD, 1972; MORRIS, 1976; CLUTTERBUCK e TIMBERLAKE, 1992).

2.3. Testes de mutagenicidade

Até a década de 80, a maioria dos testes de mutagenicidade em *A. nidulans* eram realizados por meio de três sistemas: o sistema 2- tioxantina, o sistema arginina e o sistema metionina. O sistema metionina é capaz de detectar mutações gênicas por meio da reversão de caráter auxotrofia para independência de metionina devido a mutações supressoras (*su⁻ meth⁺*) (SCOTT et al., 1982).

A maioria dos trabalhos com este fungo sobre mutagenicidade ou antimutagenicidade recorrem ao sistema metionina, sendo que os sistemas 2-tioxantina e arginina não foram utilizados recentemente.

Rodrigues, et al. (2003), usaram o sistema metionina para avaliar o potencial antimutagênico do cogumelo-do-sol em *A. nidulans*, utilizado na medicina popular para combate ao câncer; Rezende, et al. (2004), avaliaram o efeito antimutagênico de *Euphorbia tirucalli*, visto que essa planta é conhecida na medicina popular por possuir ação antimutagênica; Palioto, Palioto e Rocha (2010) analisaram o efeito de baixa dose de ultravioleta a fim de identificar possíveis danos cromossomais causados por baixas dosagens de raios ultravioleta; Palioto e Rocha (2013) avaliaram a mutagenicidade de *Piper methysticum L. f.*, devido ao uso indiscriminado dessa planta como ansiolítico e emagrecedor; Polônio, Rocha e Clemente (2014) testaram o efeito antimutagênico de sucos de uva com diferentes teores de resveratrol utilizando o sistema metionina; Berti et al. (2016), estudaram os efeitos do suco comercial de *Aloe vera L.* na germinação e

antimutagênese em *Aspergillus nidulans* utilizando este sistema e pelo ensaio do cometa em ratos Wistar.

2.4. Sistema metionina

O sistema *methG1*, idealizado por Lilly, é um sistema altamente sensível para testes de mutagenicidade por meio da sua potencialidade em detectar alterações em pares de bases e pequenas deleções (LILLY, 1965; ROCHA e AZEVEDO, 1986).

Estes eventos podem ser detectados por meio das taxas de reversão da auxotrofia para independência de metionina utilizando a linhagem *biA1methG1*. A sensibilidade desta linhagem pode ser observada pela frequência de reversão espontânea equivalente a aproximadamente 100 vezes maior do que a encontrada para outros *loci* (LILLY, 1965). Em uma revisão, Scott et al (1982) apresentaram uma lista de 21 trabalhos de mutagenicidade utilizando o sistema metionina, de 1965 a 1982.

Os testes realizados em *A. nidulans* utilizando o sistema metionina tem como padrão o uso da linhagem *biA1methG1*, que é deficiente para biotina (cromossomo I) e metionina (cromossomo IV). Essa linhagem não possui translocações e a mutação *biA1* causa maior permeabilidade da parede celular, características que favorecem os experimentos (LILLY, 1965; GAJEWSKI e LITWINSKA, 1968; PASZEWSKY e GRABSKY, 1973).

Em razão da sua sensibilidade e repetitividade dos resultados desde a sua proposição em 1965 durante duas décadas muitos autores utilizaram esse sistema para avaliação de potencial mutagênico de agentes químicos e físicos. Ainda hoje embora em menor escala, devido ao grande número de novos sistemas apresentados na literatura, o sistema metionina permanece como ferramenta útil para testes de mutagenicidade (SCOTT et al., 1982; ZONETTI e ROCHA, 2000; RODRIGUES et al., 2003; PALIOTO et al., 2013).

2.5. Genes para deficiência nutricional de metionina

Por meio de testes com os mutantes *meth*⁺ de *A. nidulans*, foram identificados e mapeados 8 genes não ligados, responsáveis pelo caráter *meth*⁺ (GAJEWSKI e LITWINSKA, 1968). Foram denominados de *methA* a *methH*, cada um comprometendo uma das enzimas envolvidas na síntese de metionina (KAFFER, 1958; FORBES, 1959; GAJEWSKI e LITWINSKA, 1968; CLUTTERBUCK, 1975; PASZEWSKI e

GRABSKI, 1975a). A linhagem utilizada por Lilly para desenvolver o sistema metionina foi a *methG1*, com deficiência na enzima β -cistationase que catalisa a conversão de cistationina em homocisteína (PASZEWSKY e GRABSKY, 1973). Este gene foi mapeado no cromossomo IV (CYBIS, 1988).

2.6. Bioquímica do sistema metionina

Em *A. nidulans* o sistema *methG1* detecta mutações supressoras que reverterem a incapacidade de síntese de metionina. Nesse fungo, são conhecidas duas vias biossintéticas para metionina. Na primeira via, que ocorre de maneira usual, a cisteína recém-sintetizada, se converte em cistationina e essa dá origem a homocisteína e a metionina. Já na segunda via, uma via alternativa, ocorre a síntese de homocisteína e metionina a partir da O-acetil homoserina. Porém, a cisteína produzida na via usual bloqueia a enzima homocisteína-sintetase, responsável pela síntese da homocisteína na via alternativa, inviabilizando a produção de metionina por esta via (GRYNBERG, et al. 2000). Desta forma, um mutante para a primeira via depois da etapa da síntese de cisteína é incapaz de ativar a segunda via e apresenta auxotrofia para metionina (PASZEWSKY e GRABSKY, 1973; KACPRZAK, et al. 2003; BRZYWCZY, et al. 2007).

No entanto, as mutações *cysB1* e *cysC1*, que bloqueiam a síntese de cisteína, são capazes de desbloquear a via alternativa, levando a prototrofia para metionina por supressão (PASZEWSKY e GRABSKY, 1975a).

Esses dados da literatura evidenciam que para corrigir uma auxotrofia *meth⁻*, há necessidade de uma mutação reversa no gene danificado da primeira via ou uma nova mutação que abra a via alternativa, sendo caracterizada como mutação supressora (PASZEWSKY e GRABSKY, 1974; PASZEWSKY e GRABSKY, 1975; ROCHA e AZEVEDO, 1986).

Experimentos realizados por GAJEWSKY e LITWINSKA (1968) indicaram que os revertentes da linhagem *methG1* são todos do tipo *su⁻meth⁺*, o que justifica a frequência dessa reversão ser tão alta em relação a reversão de outras auxotrofias (Lilly, 1965)

2.7. Morfologias do sistema metionina

Inicialmente os revertentes foram agrupados por Lilly (1965) em três grupos morfológicos, A, B e C. O grupo A é caracterizado por colônias verdes, de diâmetro maior, com bordo irregular, semelhantes a linhagem *methG1*; o grupo B, com colônias marrons, de menor diâmetro que as do tipo A e com pouca ou nenhuma esporulação e o grupo C, com colônias verdes, porém menores que as B, bem circulares e com um halo branco na borda da colônia.

GAJEWSKY e LITWINSKA (1968) apontaram que existiam mais supressores que os apresentados por Lilly (1965) e propuseram uma nova classificação dos morfotipos de revertentes. As colônias então foram classificadas em 3 grupos. O grupo 1, com as colônias verdes, agrupando A e C de Lilly; o grupo 2, com as colônias marrons, equivalente ao grupo B de Lilly, e o grupo 3, com colônias brancas, bem pequenas, não esporuladas e com aspecto de pompom.

Finalmente, a classificação adotada pelo presente trabalho, descrita por Rocha e Azevedo (1986) que concluíram que os revertentes deveriam ser agrupados juntando as duas propostas de classificação, em 4 grupos: tipo A, B e C conforme a descrição de Lilly e tipo D, correspondente ao grupo 3 de Gajewski e Litwinskaue englobam as colônias bem pequenas, brancas, com aspecto de pompom (LILLY, 1965; GAJEWSKY e LITWINSKA, 1968; ROCHA e AZEVEDO, 1986).

Houve uma tentativa feita por Scott e Alderson (1971) de relacionar as porcentagens relativas dos diferentes tipos de revertentes, com o tipo de dano mutacional induzido por diferentes agentes. No entanto, a relação estudada não foi observada.

O caráter evolutivo presente neste sistema é muito evidente. Por um lado, um caminho alternativo para a síntese de aminoácidos essenciais já presente e outras vias ainda em desenvolvimento, como propõe o trabalho de Paszewski e Grabski (1975b), que observaram a síntese de homolantionina, homóloga da cistationina, bem como o trabalho de Brzywczy et al. (2007) que estudaram os genes com função de cisteína-sintetase já descritos (*cysB* e *cysF*) e propuseram a existência de um terceiro gene com esta função. Por outro lado, a alta frequência de mutações supressoras parecem ser chaves que o organismo utiliza para garantir novos caminhos para uma via biossintética tão importante, pela síntese dos dois aminoácidos sulfurados presentes em todas as sínteses de proteína destes eucariotos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens

Para a obtenção dos mutantes, a linhagem utilizada foi a linhagem *biA1methG1*, que possui de crescimento e esporulação normal, conídios verdes, reduzida capacidade de ciclo sexual e marcadores nutricionais para biotina (*biA1*) no cromossomo I e metionina (*methG1*) no cromossomo IV;

Para a análise de mapeamento dos mutantes revertentes que não se complementassem, foi utilizada a MSE, linhagem de crescimento e esporulação normal, conídios brancos, ciclo sexual normal, marcadores nutricionais para galactose e acetato como fonte de carbono, piridoxina, ácido nicotínico, riboflavina incapacidade de utilização de sulfato e marcadores para coloração de conídios amarelo e branco

Estas linhagens são provenientes da Universidade de Glasgow (Escócia), cedidas pela ESALQ/USP.

3.2. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram o meio mínimo (MM) acrescido de diferentes concentrações de aminoácidos e o meio completo (MC), preparados conforme descrito por Pontecorvo et al. (1953) modificado por Clutterbuck (1974) e Rocha (1997).

3.3. Obtenção dos mutantes *su meth*⁺ de cada morfotipo

Conídios de colônias da linhagem *biA1methG1* crescidas em MC por 5 dias a 37°C foram coletados em solução aquosa de Tween 80 0,01% (v/v) e homogeneizados. Em seguida, semeados 100 µL desta suspensão em placas de MM acrescido de biotina (0,02µg/mL) e incubados por 5 dias a 37°C. Das colônias obtidas, foram isoladas três de cada morfotipo (A, B, C e D) em MM + biotina e estocadas em geladeira para as análises.

3.4. Análise da estabilidade das morfologias dos supressores

Conídios das colônias *su⁻ meth⁺* crescidas em MM + biotina por 5 dias a 37°, foram repicados em placas com o mesmo meio e incubados por 5 dias a 37°C até a décima geração e observadas quanto a estabilidade das morfologias.

3.5. Análise da resposta dos supressores a diferentes concentrações de metionina

Conídios dormentes de três exemplares de cada morfotipo das linhagens supressoras e da linhagem *biA1methG1* foram coletados de colônias com cinco dias de crescimento e inoculados por picada no centro de placas com MM + biotina com diferentes concentrações de metionina (0, 0,5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL) e MC, e incubados a 37°C. Com 3, 5 e 10 dias, estas colônias foram analisadas quanto ao crescimento, medindo-se o diâmetro das colônias, esporulação por análise macroscópica em microscópio estereoscópico e coloração do micélio e dos esporos.

3.6. Análise da resposta dos supressores a diferentes concentrações de cisteína

Conídios dormentes de três supressores de cada morfotipo foram coletados de colônias com cinco dias de crescimento e inoculados por picada no centro de placas com MM e diferentes concentrações de cisteína (0, 0,5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL) e MC, e incubados a 37°C. Com 3, 5 e 10 dias, estas colônias foram analisadas quanto ao crescimento, medindo-se o diâmetro das colônias com régua; esporulação, por análise macroscópica em microscópio estereoscópico e coloração do micélio e dos esporos.

3.7. Análise da resposta da complementação em heterocários de diferentes combinações de supressores

Conídios de cada dois dos quatro tipos de supressores obtidos foram inoculados em MM + biotina líquido. Após 3 dias de incubação a 37°C, a película desenvolvida na superfície do meio de cultura de cada tubo, o heterocário de cada cruzamento, foi transportada para placas com MM + biotina e incubados a 37°C de 5 a 10 dias para observação da morfologia de cada heterocário.

3.8. Mapeamento mitótico do supressor tipo B

O morfotipo B foi escolhido entre os supressores devido a morfologia de sua colônia, que se distingue visivelmente do diploide, visto que B tem coloração marrom e o diplóide possui coloração verde sem pigmento marrom no micélio.

Conídios do tipo supressor B foram inoculados com conídios da linhagem MSE em MM + biotina líquido. Após 3 dias de incubação a 37°C, a película desenvolvida na superfície do meio de cultura de cada tubo, o heterocário, foi transportada para placas com MM + biotina e encubados a 37°C por 10 dias para obtenção de setor diplóide. A linhagem diplóide foi isolada e semeada em placas com MC e incubadas a 37°C por 10 dias para obtenção de setores haplóides segregantes do diplóide. Essas colônias foram isoladas e analisadas a partir de placas de 25 pontos (placas mestras) para análise de marcadores para mapeamento do gene supressor de acordo com as marcas nutricionais já conhecidas em cada um dos cromossomos da linhagem mapeadora MSE.

3.9. Mapeamento meiótico do supressor tipo B

Conídios do tipo supressor B foram inoculados com conídios da linhagem MSE em MM + biotina líquido. Após 3 dias de incubação a 37°C, a película desenvolvida na superfície do meio de cultura de cada tubo, o heterocário, foi transportada para placas com MM + biotina e encubados a 37°C de 5 a 10 dias para obtenção de cleistotécios híbridos. Foram utilizados 3 cleistotécios híbridos de cada cruzamento isolados, esmagados em água para liberação dos ascósporos e semeados em placas de MC. As colônias resultantes destes ascósporos foram transferidas para 5 placas mestras para análise de marcadores para mapeamento do gene supressor de acordo com as marcas nutricionais já conhecidas em cada um dos cromossomos da linhagem mapeadora MSE.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção dos mutantes supressores *meth*⁺ de cada morfotipo

Foram obtidos 10 exemplares de cada mutante morfológico em dois experimentos, os quais estão evidentes na Figura 1. Desses 10, foram selecionados 3 mutantes com características bem definidas, chamados então A1, A2, A,3; B1, B2, B3; C1, C2, C3; D1, D2, D3.

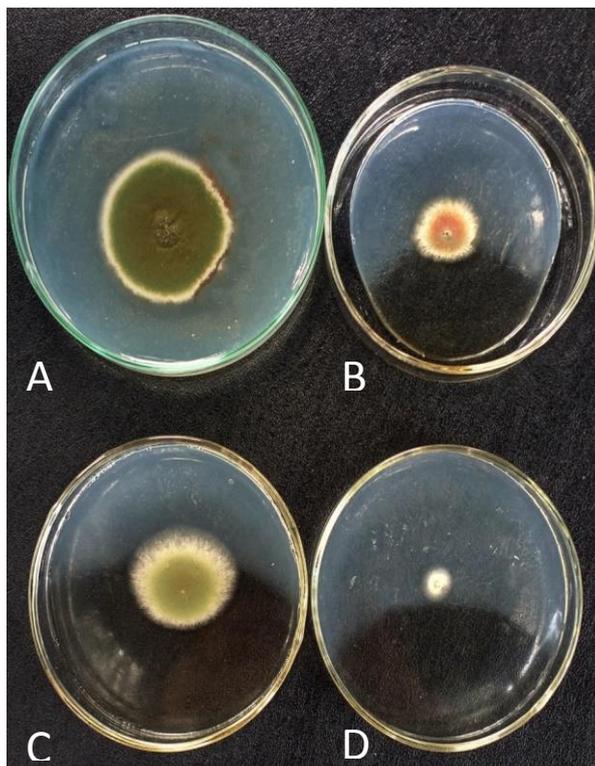


Figura 1 – Aspecto macroscópico das colônias dos supressores dos diferentes morfotipos crescidas em MM+biotina a 37° C por 5 dias. A: tipo A; B: tipo B; C: tipo C; D: tipo D.

4.2. Análise da estabilidade das morfologias dos supressores

No estudo sobre a conversão espontânea dos mutantes, foram realizados repiques até que as colônias se mantivessem estáveis. Os supressores tiveram 10 gerações analisadas sendo que, a partir da sétima geração não houve mais mudanças e as colônias estabilizaram suas morfologias. Um fato bastante relevante foi a interconversão dos supressores de um tipo para outro.

Na Figura 2, fica evidente a conversão do mutantes A após 7 gerações em tipo C.

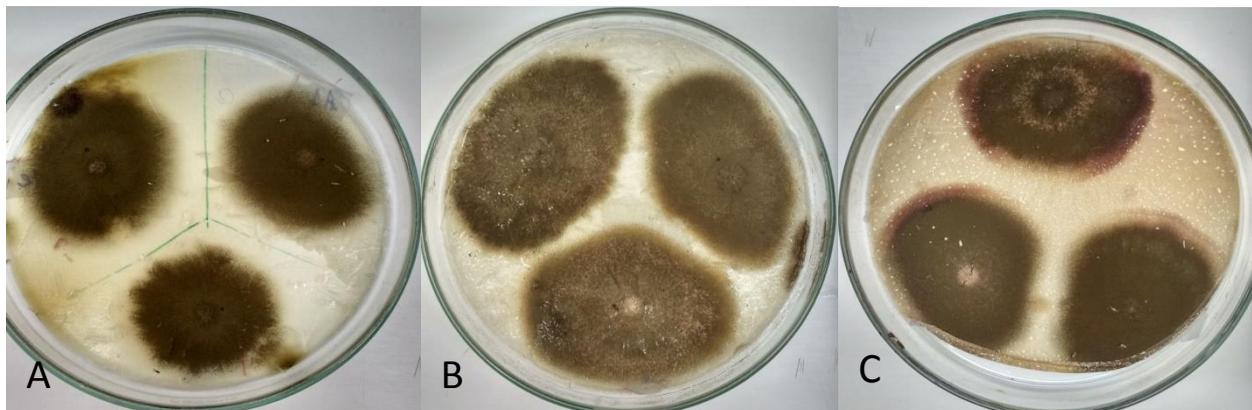


Figura 2 – Aspecto macroscópico das colônias do supressor A crescidas em MM+biotina a 37° C por 5 dias em cada geração. A: 2^a geração; B: 4^a geração; C: 7^a geração.

Entre os mutantes do tipo B (Figura 3), na quarta geração, um exemplar se caracterizou como pseudo B (Figura 3B) que apresentou o reverso da colônia característico de B e a superfície semelhante ao tipo A, enquanto os outros dois se mantiveram B. Esse mutante pseudo B foi repicado em 4 pontos, onde 2 apresentaram conídios verdes e 2 regressaram ao tipo B (Figura 3C). Então o mutante pseudo B foi repicado em um ponto para as gerações seguintes e na quinta, sexta e sétima gerações essa pseudo B retornou a morfologia característica de B, porém teve seu tamanho aumentado a partir da terceira geração e esse se manteve. Gajewski e Litwinska (1968) também observaram o aparecimento de colônias pseudo B.

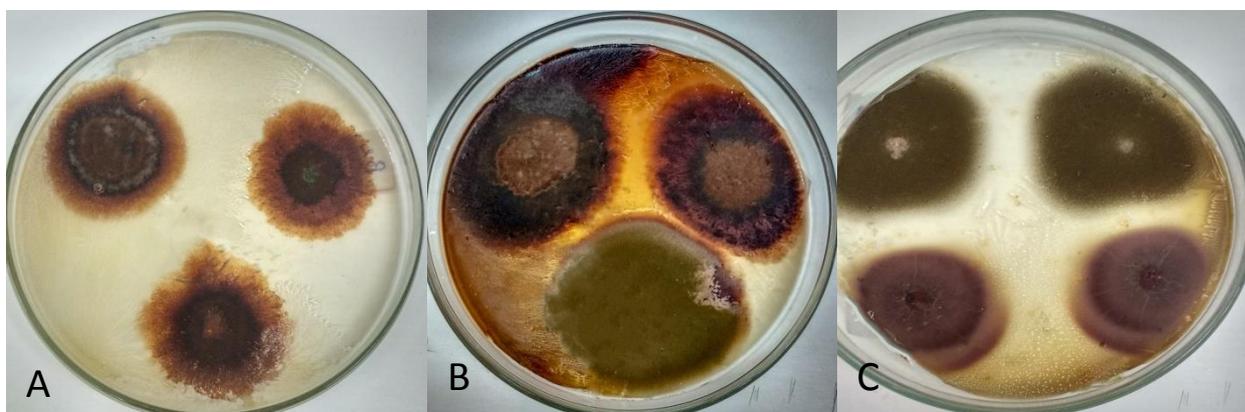


Figura 3 – Aspecto macroscópico das colônias do supressor B crescidas em MM+biotina a 37° C por 5 dias em cada geração. A: 2^a geração; B: 4^a geração; C: 5^a geração.

Os mutantes C (Figura 4) precisaram de 3 gerações para aumentar o tamanho das colônias e após 4 gerações se converteram em tipo A permanentemente.

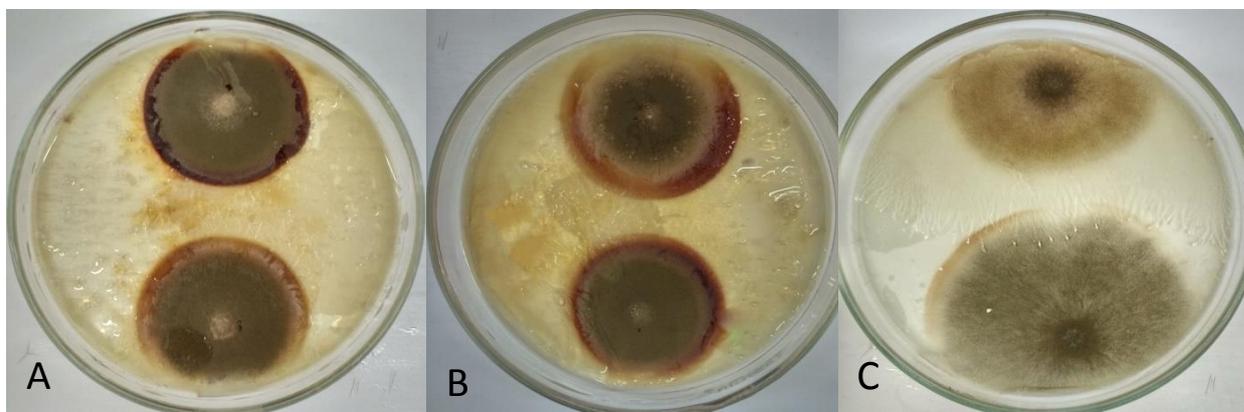


Figura 4 – Aspecto macroscópico das colônias do supressor C crescidas em MM+biotina a 37° C por 5 dias em cada geração. A: 3^a geração; B: 6^a geração; C: 7^a geração.

Nos mutantes D (Figura 5), a partir de 3 gerações houve o aumento do diâmetro das colônias. Na quarta geração (Figura 5A) houve coloração do reverso marrom, característico do tipo B. Na quinta geração (Figura 5B), houve aumento do tamanho e evidente aparecimento de setores tipo B. Na sexta geração (Figura 5C), a morfologia assemelhava-se ao tipo B. Nas colônias de sétima geração, houve esporulação verde e apesar do pigmento marrom, as colônias apresentavam aspecto do tipo C (Figura 5D).

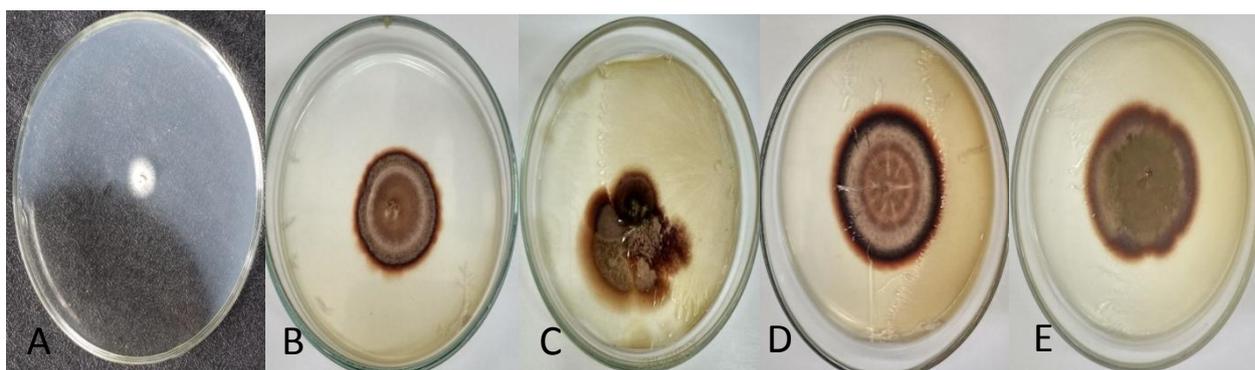


Figura 5– Aspecto macroscópico das colônias do supressor D crescidas em MM+biotina a 37° C por 5 dias em cada geração. A: 1^a geração; B: 4^a geração; C: 5^a geração; D: 6^a geração; E: 7^a geração.

4.3. Análise da resposta dos supressores a diferentes concentrações de metionina

Com o morfotipo A, até a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6 A e B) houve um aumento do diâmetro das colônias. Com 25 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6 C e D) as colônias tiveram seu diâmetro diminuído e suas bordas ficaram irregulares, indicando inibição no crescimento.

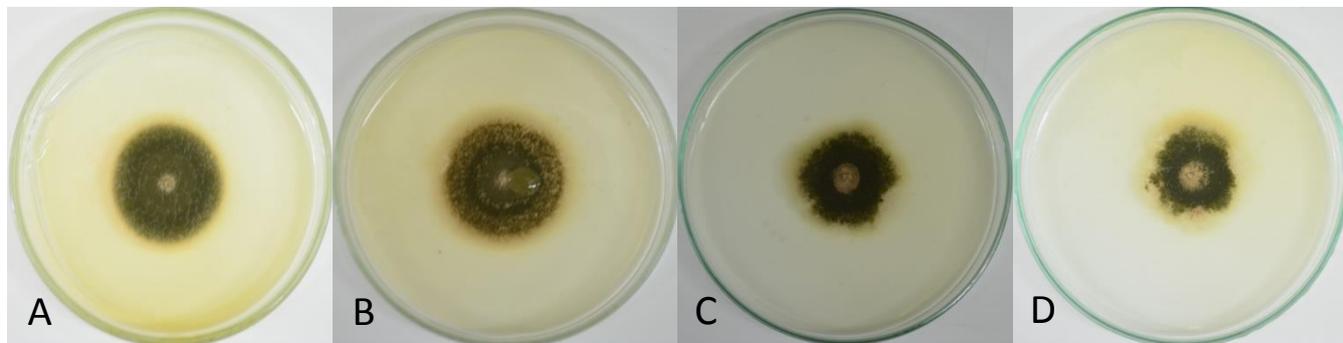


Figura 6 - Aspecto macroscópico das colônias do supressor A1 crescidas em MM e MM + biotina + diferentes concentrações de metionina a 37° C por 5 dias. A: MM; B: 0,5 $\mu\text{g/mL}$ metionina; C: 25 $\mu\text{g/mL}$ metionina; D: 50 $\mu\text{g/mL}$ metionina.

Com B, as colônias apresentaram melhora no desenvolvimento, aumentando de diâmetro e de esporulação a medida que a concentração de metionina foi aumentada (Figura 7 A e B). Em 25 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7 C e D) houve também um aumento da formação de conídios verdes.

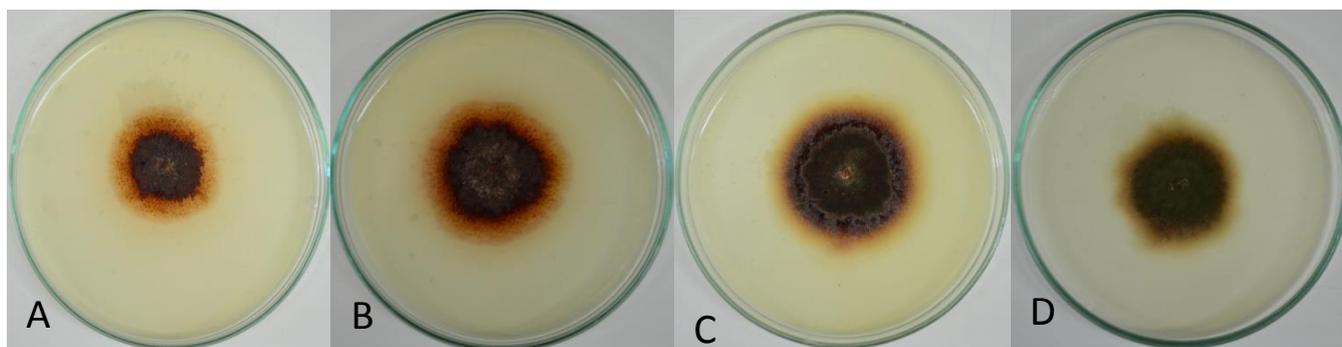


Figura 7 - Aspecto macroscópico das colônias do supressor B1 crescidas em MM e MM + biotina + diferentes concentrações de metionina a 37° C por 5 dias. A: MM; B: 0,5 $\mu\text{g/mL}$ metionina; C: 25 $\mu\text{g/mL}$ metionina; D: 50 $\mu\text{g/mL}$ metionina.

Com C, nas colônias com concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ até 25 $\mu\text{g/mL}$ o diâmetro foi maior que em MM (Figura 8 A, B e C). Já nas colônias com concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8 D) houve uma inibição com diminuição de tamanho e bordos irregulares.

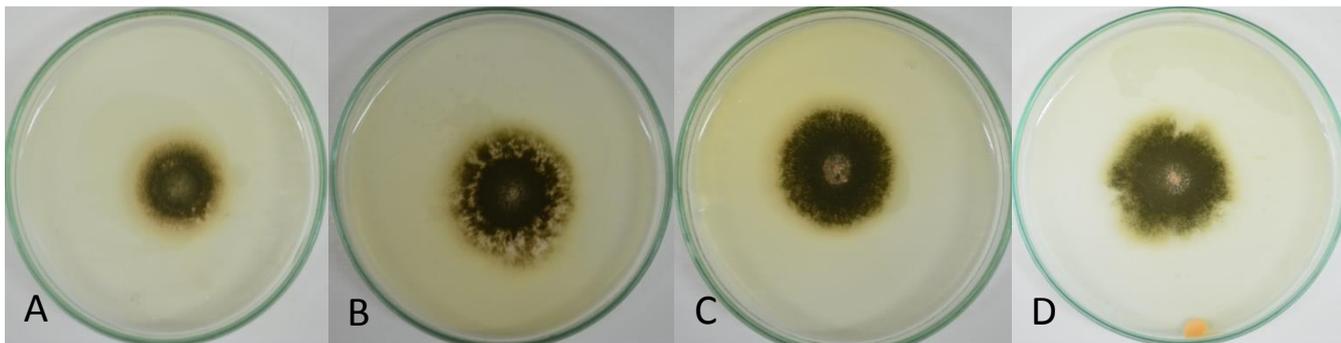


Figura 8 - Aspecto macroscópico das colônias do supressor C1 crescidas em MM e MM + biotina + diferentes concentrações de metionina a 37° C por 5 dias. A: MM; B: 0,5 µg/mL metionina; C: 25 µg/mL metionina; D: 50 µg/mL metionina.

Com D, as colônias aumentaram de tamanho de acordo com o aumento da concentração de metionina (Figura 9). As colônias com concentração de 25 µg/mL e 50 µg/mL (Figura 9 C e D) apresentaram grande esporulação e morfologia típica do tipo C e A, respectivamente.

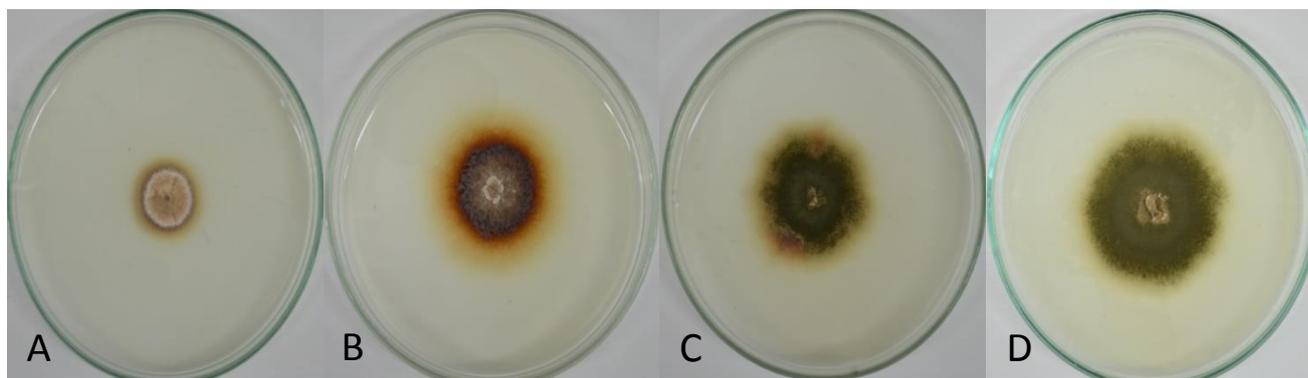


Figura 9 - Aspecto macroscópico das colônias do supressor D1 crescidas em MM e MM + biotina + diferentes concentrações de metionina a 37° C por 5 dias. A: MM; B: 2,5 µg/mL metionina; C: 25 µg/mL metionina; D: 50 µg/mL metionina.

A linhagem *biA1methG1* nas concentrações de 0,5 µg/mL e 2,5 µg/mL apresentou a morfologia do mutante tipo D (Figura 10 A). Em 5 µg/mL (Figura 10 B), as colônias cresciam com morfotipo de B. Em 25 µg/mL (Figura 10 C), embora tivesse micélio marrom, a cobertura de esporos era compatível com tipo C, inclusive com halo. Em 50 µg/mL (Figura 10 D), o morfotipo era de A.

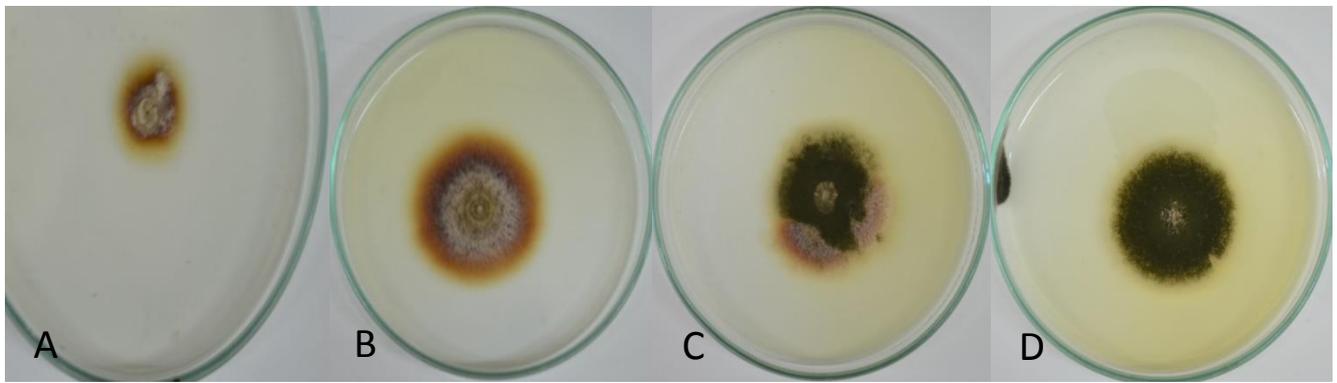


Figura 10 - Aspecto macroscópico das colônias da linhagem *biA1methG1* crescidas em MM e MM + biotina + diferentes concentrações de metionina a 37° C por 5 dias. A: 0,5 µg/mL; B: 5 µg/mL metionina; C: 25 µg/mL metionina; D: 50 µg/mL metionina.

Na Figura 11, é possível notar a semelhança morfológica entre os diferentes supressores e a linhagem *biA1methG1* quando inoculadas em MC. Os diferentes supressores (Figura 11 A, B, C e D) não apresentaram seu morfotipo específico, igualando-se uns com os outros e com a linhagem original (Figura 11 E).

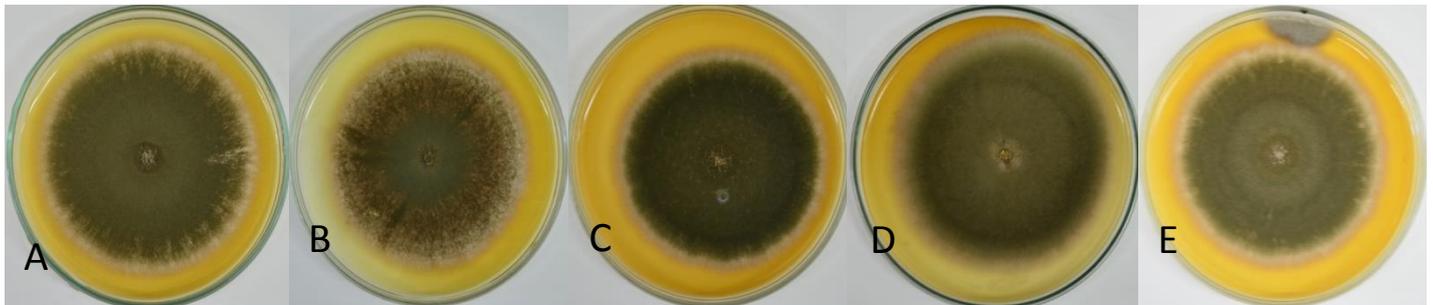


Figura 11 - Aspecto macroscópico das colônias dos diferentes supressores e de *biA1methG1* crescidas em MC a 37° C por 5 dias. A: tipo A; B: tipo B; C: tipo C; D: tipo D; E: *biA1methG1*.

Tabela 1. Média dos tamanhos em centímetros das colônias de cada mutante em diferentes concentrações de metionina no MM + biotina.

[metionina] µg/mL	A	B	C	D	<i>bimeth</i>
0	3,5	3,5	2,9	1,9	-
0,5	3,9	4,5	3,6	2,5	1,8
2,5	3,9	4,5	3,8	3,4	3,7

5	3,6	4,7	3,8	4,0	4,3
25	3,3	3,5	3,2	3,5	3,4
50	3,3	3,5	3,5	4,0	4,3
MC	7,5	7,3	7,2	7,2	7,5

Analisando os resultados obtidos nesse experimento, se pode notar que o mutante A apresentou um aumento igual de crescimento nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1 e Figuras 6). No entanto, seu crescimento foi inibido nas maiores concentrações de metionina (de 5 $\mu\text{g/mL}$ em diante). A resposta das colônias do tipo C foi semelhantes ao que ocorreu com o tipo A, embora em uma escala diferente (Tabela 1 e Figura 8). As concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ foram benéficas para o crescimento, 5 $\mu\text{g/mL}$ não provocou diferença e a partir de 25 $\mu\text{g/mL}$ houve inibição.

Os supressores B e D apresentaram respostas diferentes de A e C. Em B, houve melhora no crescimento em 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$. Com 25 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ houve diminuição do crescimento, mas ocorreu uma esporulação intensa, de forma que na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ cresceu semelhante a tipo C (Tabela 1 e Figura 7). O mutante D também cresceu mais em 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$, proporcionalmente mais do que B. Com 5 $\mu\text{g/mL}$ assemelhava-se a morfologia do tipo B. Em 25 $\mu\text{g/mL}$ também teve uma diminuição de tamanho acompanhada de esporulação intensa e em 50 $\mu\text{g/mL}$ adquiriu a morfologia de C, como havia acontecido com B (Tabela 1 e Figura 9).

Já *bimeth*, que é a linhagem mutante para metionina, apresentou as morfologias dos supressores, quando a quantidade de metionina no meio era insuficiente, melhorando sua morfologia progressivamente à medida que a concentração de metionina aumentava (Tabela 1 e Figura 10). Com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ apresentava a morfologia do tipo D, com 2,5 $\mu\text{g/mL}$ do tipo B, com 25 $\mu\text{g/mL}$ tipo C e 50 $\mu\text{g/mL}$ tipo A.

Estes resultados indicam que para apresentar seu desenvolvimento máximo o supressor A precisou de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de metionina, o supressor C precisou de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de metionina, o supressor B precisou de 25 $\mu\text{g/mL}$ de metionina e o supressor D precisou de 50 $\mu\text{g/mL}$ de metionina.

4.4. Análise da resposta dos supressores a diferentes concentrações de cisteína

Nos mutantes do tipo A, B e C a diminuição no tamanho das colônias foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações de cisteína, como se pode observar na Tabela 2 e Figuras 12, 13 e 14.

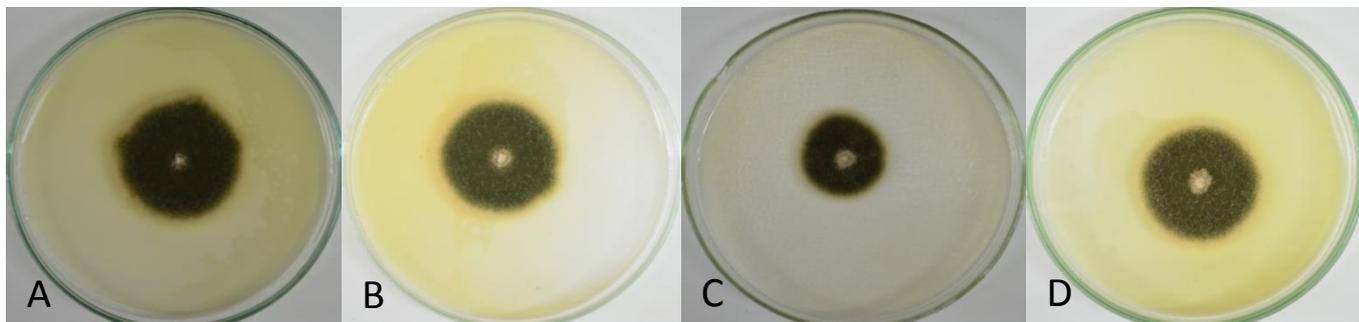


Figura 12 – Aspecto macroscópico das colônias do supressor A crescidas em MM + biotina + diferentes concentrações de cisteína a 37° C por 5 dias. A: 0,5 µg/mL cisteína; B: 2,5 µg/mL cisteína; C: 25 µg/mL cisteína; D: 50 µg/mL cisteína.

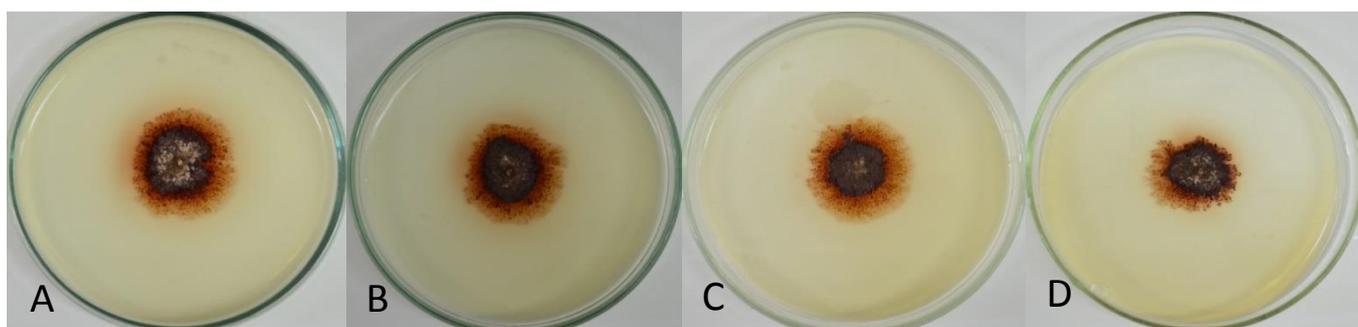


Figura 13 – Aspecto macroscópico das colônias do supressor B crescidas em MM + biotina + diferentes concentrações de cisteína a 37° C por 5 dias. A: 0,5 µg/mL cisteína; B: 2,5 µg/mL cisteína; C: 5 µg/mL cisteína; D: 50 µg/mL cisteína.

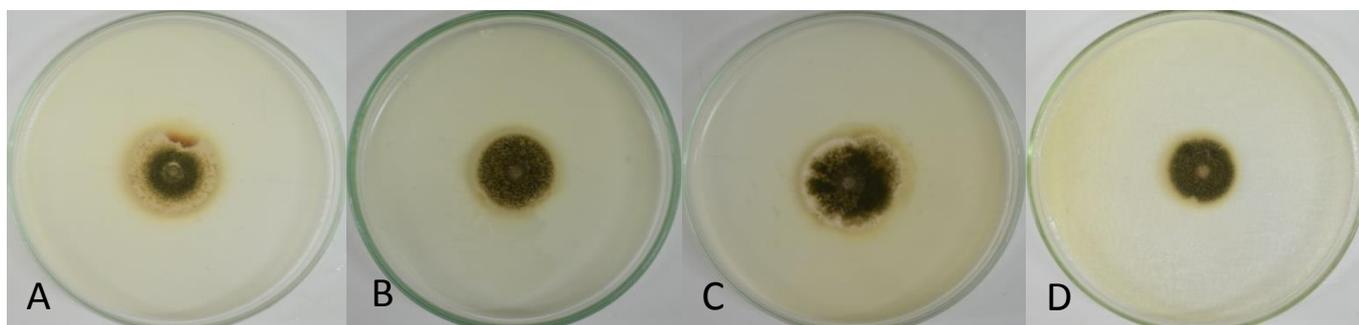


Figura 14 – Aspecto macroscópico das colônias do supressor C crescidas em MM + biotina + diferentes concentrações de cisteína a 37° C por 5 dias. A: 0,5 µg/mL cisteína; B: 2,5 µg/mL cisteína; C: 5 µg/mL cisteína; D: 50 µg/mL cisteína.

Nos mutantes A e C, a esporulação foi reduzida já a partir da concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e teve piora gradativa à medida que as concentrações aumentaram (Figura 12 e 14).

Em mutantes do tipo D, o tamanho foi ainda mais reduzido em resposta à cisteína e as colônias apresentaram menor desenvolvimento em comparação aos outros tipos (Figura 15).

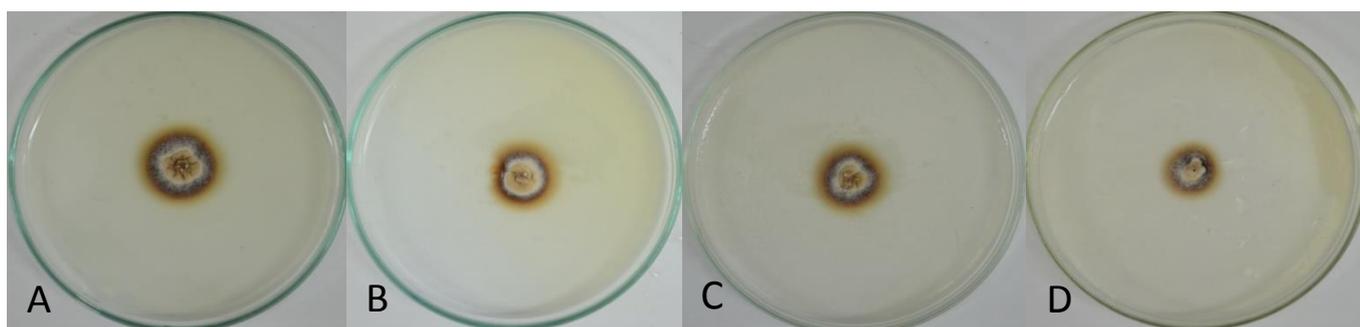


Figura 15 – Aspecto macroscópico das colônias do supressor D crescidas em MM + biotina + diferentes concentrações de cisteína a 37° C por 5 dias. A: 0,5 $\mu\text{g/mL}$ cisteína; B: 2,5 $\mu\text{g/mL}$ cisteína; C: 5 $\mu\text{g/mL}$ cisteína; D: 50 $\mu\text{g/mL}$ cisteína.

Tabela 2. Média dos tamanhos das colônias de cada mutante em diferentes concentrações de cisteína

[cisteína]	A	B	C	D
MM	3,5 cm	3,5 cm	2,9 cm	1,9 cm
0,5 $\mu\text{g/mL}$	3,6 cm	3,4 cm	2,8 cm	2,4 cm
2,5 $\mu\text{g/mL}$	3,1 cm	3,3 cm	2,8 cm	1,9 cm
5 $\mu\text{g/mL}$	3,6 cm	3,3 cm	2,7 cm	2,1 cm
25 $\mu\text{g/mL}$	2,8 cm	2,4 cm	2,5 cm	1,4 cm
50 $\mu\text{g/mL}$	2,3 cm	2,4 cm	2,7 cm	1,4 cm

A cisteína em concentrações até 5 $\mu\text{g/mL}$ não provocou alterações na morfologia como ocorreu com a metionina. No entanto, nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de cisteína todos os tipos de supressores apresentaram uma inibição de desenvolvimento, demonstrando que a supressão depende da bloqueio da presença de cisteína.

4.5. Análise da resposta da complementação em heterocários de diferentes combinações de supressores

Os heterocários resultantes dos cruzamentos entre A e B, entre A e C e entre A e D, apresentaram a morfologia típica de A.

Os heterocários resultantes dos cruzamentos entre B e C e C e D, apresentaram a morfologia típica de C.

O heterocário do cruzamento B x D mostrou o aumento do pigmento marrom, que tingiu todo o meio de cultura. No inóculo, houve micélio denso, com hifas muito ramificadas e com presença de conidióforos. Embora haja presença de hifas aéreas, elas eram em menor quantidade que em D. O aspecto morfológico do heterocário era melhor do que a colônia de B e de D separadamente, indicando que houve uma complementação entre as duas linhagens.

4.6. Mapeamento mitótico

A análise de recombinação dos marcadores *su meth* e *fac* nos segregantes do diplóide B//MSE estão apresentados na Tabela 3.

No mapeamento mitótico foram analisados todos os 8 marcadores cromossômicos da linhagem MSE, sendo que o único marcador que apresentou associação com a marca supressora (*su meth*) foi o gene *fac*, responsável pela incapacidade de crescer em presença de acetato como única fonte de carbono. Como se pode ver na Tabela 3, todos os segregantes que continham o gene supressor tinham obrigatoriamente o gene *fac*⁺, enquanto todos os segregantes não supressores tinham o gene *fac*⁻, que é a combinação da linhagem MSE. Não ocorreram recombinantes.

Tabela 3 – Número de segregantes do diploides B//MSE com cada combinação com o gene *fac* do cromossomo V.

	<i>fac</i> ⁺	<i>fac</i> ⁻
<i>su meth</i> ⁺	0	26
<i>su meth</i> ⁻	24	0

Como este gene está localizado no cromossomo V de *A. nidulans*, estes resultados indicam que o gene supressor está no cromossomo V, podendo ser o gene *cysA*.

4.7. Mapeamento meiótico

Na tabela 4 estão apresentados os números de segregantes meióticos com as diferentes combinações entre os genes do cromossomo V resultantes da análise mitótica. Os recombinantes *su meth⁺ fac⁺* e *su meth⁻ fac⁻* foram 33 no total de 125, o que resulta em 26% de recombinação.

Tabela 4 – Número de recombinantes do cruzamento de B X MSE.

	<i>fac⁺</i>	<i>fac⁻</i>
<i>su meth⁺</i>	21	59
<i>su meth⁻</i>	33	12

Estes resultados indicam que se trata do gene *cysA*, pois esta é a frequência de recombinação descrita por Cybis et al. (1988). Para todos os outros marcadores, a recombinação foi muito superior, não estando os genes ligados.

5. DISCUSSÃO

Os mutantes supressores da linhagem *biA1methG1* sempre foram apresentados na literatura como mutantes específicos, como se representassem diferentes deficiências na cascata de reações na biossíntese da metionina (LILLY, 1965; SIDDIQI, 1962; GAJEWSKI e LITWINSKA, 1968; SCOTT e ALDERSON, 1971).

Os resultados do presente trabalho, de diferentes maneiras, demonstraram que todos os supressores estão envolvidos da mesma maneira na síntese de metionina de forma quantitativamente diferente. Isto pode ser observado nos experimentos de estabilidade de cada morfotipo em que os supressores apresentaram interconversão nos outros tipos (Figuras 2, 3, 4 e 5). No trabalho de Gajewski e Litwinska (1968), encontra-se o relato de colônias pseudo B, que inicialmente eram tipo B e após alguns repiques transformava-se em A.

Outro resultado nessa direção foi a observação da morfologia da linhagem original *biA1methG1*, que apresenta cada morfotipo em resposta a carências parciais de

metionina (Figura 10). Estes resultados indicam que as diferentes morfologias dos supressores devem estar relacionadas à quantidade de metionina que a linhagem é capaz de produzir com a mutação e não à presença de diferentes genes para o desenvolvimento da colônia e esporulação. Diante disso, foram feitos os testes com as concentrações de metionina e cisteína, que confirmaram esta hipótese.

Zonetti e Rocha (2000) obtiveram uma linhagem *methG1* (PAT1) a partir do cruzamento entre *biA1methG1* e MSE. A linhagem era branca e em testes de mutagenicidade apresentava revertentes com os mesmos morfotipos da linhagem *biA1methG1*, embora PAT1 tivesse um genoma diferente desta, resultante da combinação dos cromossomos das duas linhagens paternas. Se considerarmos a hipótese de diferentes graus de produção de metionina, é possível justificar essa semelhança de morfologias em revertentes da marca *methG*, independentemente do restante do genoma.

As linhagens revertentes nos experimentos de resposta a metionina corroboraram a hipótese de diferentes níveis de produção de metionina. A linhagem A (Figura 6) respondeu positivamente a metionina somente nas concentrações mais baixas, provavelmente porque já produza praticamente tudo que ela necessita. A linhagem C (Figura 8) foi um pouco mais longe na exigência de metionina. No entanto, as duas foram inibidas por concentrações maiores, provavelmente pelo excesso ao somar o produzido e o oferecido na composição do meio.

As linhagens B e D parecem ser mais carentes de forma que responderam bem ao acréscimo de metionina, tornando-se maiores e inclusive esporulando. Como não foram inibidas pelas concentrações mais altas, é possível que o seu nível de produção de metionina fosse muito pequeno.

Considerando a análise do cruzamento de cada um dos heterocários possíveis, pode-se observar que as linhagens se complementam nutricionalmente em graus variados. Todos os heterocários resultantes do cruzamento do tipo A com outra, mostraram o fenótipo de A. Isso pode indicar que A produz praticamente o suficiente para ter um desenvolvimento normal. A linhagem C mostrou o mesmo perfil nos heterocários demonstrando que a sua morfologia era mais próxima do normal do que B e D, que não manifestavam seu fenótipo no heterocário. B x D apresentou uma morfologia B

melhorada, que fazia lembrar o tipo C. Isso pode significar que a produção de metionina de B + D era quase a de C.

Outra evidencia da complementação de quantidade de metionina de cada linhagem foi a resposta morfológica de cada supressor (Figura 6-9). O supressor tipo A quando recebia metionina não mudava de morfologia para outro tipo; o tipo C se convertia em A; o tipo B se transformava em C; o tipo D se transformava em B e depois em C.

A contraprova foi o caminho inverso mostrado pela linhagem *biA1methG1* (Figura 10). Em 0,5 µg/mL de metionina apresentava a morfologia de D; com 2,5 µg/mL de metionina, crescia como B; com 25 µg/mL de metionina, convertia-se em C e com 50 µg/mL de metionina era igual ao tipo A.

Quando todas as linhagens supressoras eram cultivadas em MC, que é um meio nutricionalmente rico, a morfologia de todas elas assemelhava-se à de *biA1methG1* (Figura 11). Mais um vez ficou evidente que não haviam genes mutantes para desenvolvimento interferindo na morfologia, pois isso resultaria em alguma diferença entre os supressores no MC.

Desta forma, podemos dizer, que na escala de comprometimento com o desenvolvimento, as colônias devem ser classificadas na ordem decrescente em A, C, B e D, visto que A produz metionina pela via alternativa quase suficiente para o seu desenvolvimento, C produz metionina necessária para crescer e esporular, porém menos do que o morfotipo A. B produz metionina suficiente apenas para o crescimento da colônia e pouquíssimos conidióforos. D produz metionina apenas suficiente para um crescimento vegetativo mínimo e na conidiogênese, até a formação de hifas aéreas que representam o início do conidióforo, não sendo capaz da formação de conídios.

O experimento com cisteína teve a finalidade de analisar a relação entre a diminuição da síntese de cisteína pela mutação supressora com o aumento proporcional de metionina sintetizada. De fato as concentrações de cisteína crescentes provocavam uma inibição no desenvolvimento. Isso quer dizer que até 5 µg/mL de cisteína o supressor reconhece como a síntese que acontece na via catabólica da metionina, devendo ser suficientemente utilizada no metabolismo do fungo sem excesso que possa inibir a enzima homocisteína-sintetase, responsável pela via alternativa. Esse resultado corrobora os de Paszewski e Grabski (1973 e 1975a,b).

Diante de todos esses resultados é possível propor que todos os fenótipos supressores devem ser diferentes alelos de um mesmo gene que leva a uma expressão gradualmente diferente da enzima sintetizadora de cisteína e conseqüentemente na liberação da via alternativa para a síntese de metionina.

O mapeamento feito com o supressor do tipo B mostrou que este gene é o *cysA* pela sua localização, segundo Cybis et al, (1988) e Grynberg et al. (2000). Este gene codifica a enzima serina O-acetiltransferase que catalisa a síntese do precursor de cisteína. Mutações nesse gene impedem a síntese de cisteína e suprimem as mutações *methG* o que corrobora as conclusões das análises anteriores .

O presente trabalho resolve neste momento um enigma científico que durou 54 anos. Com uma metodologia clássica, com análise nutricional e do desenvolvimento e de mapeamento genético foi possível elucidar uma questão tão complexa. Desta forma, este trabalho representa uma significativa contribuição ao estudo dos fatores genéticos que interferem direta ou indiretamente nos mecanismos de controle do desenvolvimento em eucariotos.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS TH, WIESER JK, YU JH. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol. Mol. Boil. Rev. 62: 35-54.

AXELROD DE. (1972). Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of. *Journal of General Microbiology*. 73: 181–184.

BENJAMIN CR. (1955). Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycology*. 47: 669-87.

BERT AP, et al. (2016). Efeitos do suco comercial de Aloe vera L. na germinação e antimutagênese em *Aspergillus nidulans* e pelo ensaio cometa em ratos *Wistar*. *R. bras. Biociências*. 14: 130-136.

BRZYWCZY J, NATORFF R, SIENKO M, PASZEWSKI A. (2007). Multiple fungal enzymes possess cysteine synthase activity *in vitro*. *Research in Microbiology*. 158: 428-436.

CLUTTERBUCK AJ. (1969a). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 63: 317-27.

CLUTTERBUCK A.J. (1969b). Cell volume per nucleus in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 55: 291-299.

CLUTTERBUCK AJ, TIMBERLAKE WE. (1992). Genetic regulation of sporulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. In: RUSSO, V.E.A.; BRODY, S.; COVE, D.; OTTOLENGHI, S. ed. *Development*. 7: 103-18.

CYBIS J, NATORFF R, LEWANDOSKA I, PRAZMO W, PASZEWSKI A. (1988). Mutation affecting cysteine synthesis in *Aspergillus nidulans*: characterization and chromosome mapping. *Genetical Research*. 51:85-88.

EIDAM E. (1883). Zur Kenntniss der Entwicklung bei den Ascomyceten. III *Sterigmatocystis nidulans* n. sp. In: FS Cohn, *Beitr Biol Pflanzen* 3: 392-441.

ELLIOT CG. (1960). The cytology of *Aspergillus nidulans*. *Genetical research*, 1: 462-476.

FORBES E. (1959). Use of mitotic segregation for assigning genes suppressors in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*. 13: 67-80.

GAJEWSKI W, LITWINSKA J. (1968). Methionine *loci* and their suppressors in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gene Genet*. 102: 210-220.

GRIYNBERG M, TOPCZEWSKI J, GODZIC A, PASZEWSKI A. (2000). The *Aspergillus nidulans* *cysA* gene decodes a novel type of serine O- acetyltransferase which is homologous to homoserine O- acetyltransferases. *Microbiology*. 146: 2695-2703.

KACPRZAK MM, LEWANDOWSKA I, MATTHEWS RG, PASZEWSKI A. (2003). Transcriptional regulation of methionine synthase by homocysteine and choline in *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Society*. 376: 517-527.

KAFER E. (1958). An eight-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 9: 105-145.

LILLY LJ. (1965). An investigation of suitability of the suppressors of *meth*, in *Aspergillus nidulans* for the study of induce an spontaneous mutation. *Mutat. Res.* 2: 192-195.

MILLER BL. (1990). The developmental genetics of asexual reproduction in *Aspergillus nidulans*. *Seminars on Developmental Biology*.1: 207-219.

MORRIS NR. (1976). Mitotic mutants of *Aspergillus Nidulans*. *Genetical Research*. Cambridge, 26: 237 – 254.

PASZEWSKI A, GRABSKI J. (1973). Studies on b-cystathionase and O-acetylhomoserine sulphhydrylase as the enzymes of alternative methionine biosynthetic pathways in *Aspergillus nidulans*. *Acta Biochim. Pol.* 20: 159-168.

PASZEWSKI A, GRABSKI J. (1974). Regulation of S-amino acids biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 132: 307-320.

PASZEWSKI A, GRABSKI J. (1975). Enzymatic lesions in methionine mutants of *Aspergillus nidulans*: role and regulation of the alternative pathway for cysteine and methionine synthesis. *J. Bacteriol.* 124: 893-904.

PALIOTO NF, PALIOTO GF, ROCHA CLMSC. (2010). Efeito mutagênico de baixa dose de ultravioleta no sistema methG1 em *Aspergillus nidulans*. *Arq. Ciênc. Saúde.* 14:1 49-54.

PALIOTO GF, ROCHA CLMSC. (2013). Avaliação da mutagenicidade de *Piper methysticum* no sistema *meth* =G1 em *Aspergillus nidulans*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 15: 347-451.

POLONIO NCV, ROCHA CLMSC, CLEMENTE E. (2014). Trans-resveratrol concentrations and antimutagenic potential of juice from the grape cultivars Vênus, BRS Violeta and Isabel. Genet. Mol. Res. 13:1 1152-1159.

PONTECORVO G, ROPER JA, HEMMONS LM, MACDONALD KD, BUFTON AWJ. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics. 5: 141-238.

REZENDE JR, et al. (2004). Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. Acta Scientiarum. 26:4 481-484.

RODRIGUES SB, et al. (2003). Avaliação do potencial antimutagênico do Cogumelo do Sol (*Agaricus blazei*) no sistema *meth*G1 em *Aspergillus (=Emericella) nidulans*. Acta Scientiarum. 25: 2 513-517.

ROCHA CLMSC. (1983). Detecção da atividade mutagênica de produtos químicos no sistema *meth*1 em *Aspergillus nidulans*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 77.

ROCHA CLMSC, AZEVEDO JL. (1986). Use of the *meth*G1 reversion of *Aspergillus nidulans* for detection of mutagenicity of the pyrolizidine alkaloid integerrimine. Rev. Bras. Genet. 9: 393-405.

ROCHA CLMSC. (1997). Caracterização citológica, genética e molecular de um mutante para conidiogênese em *Aspergillus nidulans*. ESALQ: Piracicaba. 202.

SCOTT BR, ALDERSON T. (1971). The random (nonspecific) forward mutational response of gene loci in *Aspergillus nidulans* conidia after photosensitisation to near ultraviolet light by 8-methoxypsoralen. Mutat. Res. 12: 29-34.

SCOTT BR, DORN GL, KAFER E, STAFFORD R. (1982). *Aspergillus nidulans*: Systems and results of tests for induction of mitotic segregation and mutation. II. Haploid assay systems and overall response of all systems. Mutat. Res. 98: 49-94.

SIDDIQI OH. (1962). Mutagenic action of nitrous acid on *Aspergillus nidulans*. Genet. Res. 3: 303-314.

TIMBERLAKE WE, MARSHALL MA. (1988). Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. Trends in Genetics. 4: 162-169.

TIMBERLAKE WE, CLUTTERBUCK AJ. (1994). Genetic regulation of conidiation. In: MARTINELLI, S. D.; KINGHORN, J. R. (Eds.). . *Aspergillus: 50 years on*. New York: Elsevier. 383-27.

UPSHALL A. (1981). Naturally occurring diploid isolates of *Aspergillus nidulans*. Journal of Genetic Microbiology. 122: 7-10.

YAGER LN. (1992). Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. In: BENNET, J.W.; KLICH, M. A. ed. *Aspergillus: biological and industrial applications*. 19-42.

ZONETTI PC, ROCHA CLMSC. (2000). Mutagenicity of benlate in *methG1* system in *Aspergillus (=Emericella) nidulans*. Cytologia, 65: 403-408.

ZONNEVELD BJM. (1988). Effect of carbon dioxide on fruiting in *Aspergillus nidulans*. Transactions of the British Mycological Society. 91:4 625–629.

NORMAS DA REVISTA
Genetics and Molecular Research

Author list

All authors are aware and approving of submission of the manuscript, the manuscript's content, the authorship, and the order of authorship.

You have the following information for all authors:

First name, middle name(s)/initial(s), last name

Work affiliation(s)

E-mail address

Any conflicts of interest

Financial disclosure/funding information

Signature on the cover letter

Acknowledgments

You have confirmed that everyone named in the Acknowledgments section agrees to be so named.

Article file

The article file is in .doc or .docx format, prepared per the Submission Guidelines.

Preparation of the manuscript

The sections comprising the manuscript are ordered as follows:

Title

Running title

Authors

Addresses

22

Abstract

Key words

Introduction

Material and Methods

Results

Discussion

Acknowledgments

References

Title Page

The title page includes the title of the article, authors' names (names and initials (only) thinking in indexing services), and author affiliations. Affiliations include the author's department, institution (usually a university or company), city, and state or nation. The title page includes the name, complete mailing address, and e-mail address of the author designated to review proofs. A running title of no more than 60 characters (including spaces) is provided.

Title

A full title (no more than 150 characters) and a running title (no more than 60 characters) are provided.

Abstract

An Abstract of no more than 300 words is included.

Data

All appropriate datasets, images, and information are deposited in the relevant repositories, and undeposited data are submitted as supplementary material files.

Nomenclature

Standard nomenclature is used throughout the manuscript file.

23

Abbreviations

Non-standard abbreviations are defined upon their first use in the text.

Figures and tables

All figures and tables are called out in the manuscript in ascending numeric order, upon first appearance. Original figure files are uploaded using high

resolution (300-600 dpi). tiff format. If any of your figures is under copyright, you have notified the journal office.

Equations

You have used MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome; or Equation Editor if using MathType is not possible.

References

GMR style is used for references.

Ex: Ranke MB, Lindberg A, Ferrandez Longas A, Darendeliler F, et al. (2007). Major determinants of height development in Turner syndrome (TS) patients treated with GH: analysis of 987 patients from KIGS. *Pediatr. Res.* 61: 105-110.

We recommend that you upload all your files in one step by creating a single .zip file, which will be automatically unpacked by the submission system.