

ANÁLISE DE FATORES GENÉTICOS NO DESENVOLVIMENTO DO CICLO SEXUAL EM LINHAGENS DIPLÓIDES DE *Aspergillus (=Emericella) nidulans*

Natália Brita Depieri (PIBIC/CNPq), Carmem Lucia de Mello Sartori Cardoso da Rocha (Orientadora), e-mail: clmscrocha@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas /
Maringá, PR

Área do conhecimento: 2.02.00.00-5 – Ciências Biológicas.

Subárea do conhecimento: 2.02.02.00-8 – Genética.

Palavras-chave: heterocários, complementação gênica, desenvolvimento

Resumo:

Aspergillus nidulans é um fungo filamentoso, proposto por Guido Pontecorvo, como um modelo para estudo de Genética de Microrganismos, na década de 1950. Seu ciclo de vida apresenta três fases distintas: ciclo vegetativo, esporulação assexual ou conidiogênese e sexual ou ascosporigênese. O presente trabalho objetivou analisar fatores genéticos que atuam no desenvolvimento do ciclo sexual, utilizando para isso, heterocários e linhagens diploides. Foram cruzadas as linhagens *biA1methG1*, *proApabaAy* e CLB3 com a linhagem MSE, para a obtenção de três diferentes heterocários e diploides para avaliar a possível complementariedade de genes para ciclo sexual em *A. nidulans*. O desenvolvimento destes heterocários e diploides foi analisado pela produção de cleistotécios quanto ao número e tamanho e pela produção e viabilidade de ascósporos por cleistotécio. Todos os heterocários e diploides tiveram o ciclo sexual mais desenvolvido em relação às respectivas linhagens haplóides. Houve diferença nos parâmetros analisados, entre os três heterocários, mostrando diferenças de contribuição de cada linhagem haplóide. A escala decrescente de complementariedade foi CLB3, *biA1methG1* e *proApabaAy*. A comprovação de que fatores genéticos foram responsáveis por esses resultados foi feita pela análise de segregantes dos heterocários, que apresentavam diferentes níveis de desenvolvimento sexual, dependendo do conjunto de cromossomos presente no segregante. O conjunto de segregantes obtidos foi estocado para futuras análises de mapeamento genético desses genes para cada fase do desenvolvimento deste ciclo. Este estudo trouxe uma contribuição importante para o conhecimento dos genes que regulam as etapas do ciclo sexual em *Aspergillus nidulans*.

Introdução:

Aspergillus nidulans é um fungo filamentosos, homotático, ascomiceto. Os estudos genéticos deste fungo, na década de 50, levaram esse organismo a consagrar-se como modelo biológico para estudos acadêmicos e aplicados (PONTECORVO et al., 1953).

O ciclo de vida compreende três 3 fases distintas: a vegetativa, que engloba a germinação do esporo e o crescimento das hifas vegetativas, originando uma colônia circular; a fase assexuada ou conidiogênese, que compreende o desenvolvimento dos conídios ou esporos assexuais a partir de estruturas diferenciadas, os conidióforos; e a fase sexuada ou ascospogênese, que resulta na formação de esporos sexuados, os ascósporos, que são formados por meiose, dentro de corpos de frutificação chamados cleistotécios (TIMBERLAKE e CLUTTERBUCK, 1994).

Este trabalho propôs-se a analisar geneticamente, o ciclo sexual de heterocários provenientes de diferentes cruzamentos para obtenção de linhagens diplóides complementares para o desenvolvimento sexual em *Aspergillus nidulans*.

Materiais e métodos

As seguintes linhagens foram utilizadas:

biA1methG1 – linhagem de crescimento e esporulação normal, conídios verdes e reduzida capacidade de ciclo sexual; *proApabaAy* – linhagem de crescimento e esporulação normal, conídios amarelos, reduzida capacidade de ciclo sexual; MSE – linhagem de crescimento e esporulação normal, conídios brancos e ciclo sexual normal; CLB3 – linhagem de crescimento deficiente, mutante bristle para esporulação, conídios verdes e ausência de ciclo sexual. As três primeiras linhagens são provenientes da Universidade de Glasgow (Escócia) e a última foi obtida no Laboratório de Genética Molecular e do Desenvolvimento da UEM, por mutação espontânea da linhagem *biA1methG1*.

Os meios de cultura utilizados foram: meio mínimo (MM) e o meio completo (MC) foram preparados conforme descrito por Pontecorvo et al. (1953).

O cruzamento das linhagens foi obtido a partir de conídios de colônias de 5 dias das linhagens em estudo foram semeados juntos em 3mL de meio mínimo mais 2% de meio completo líquido. Após 3 dias de incubação a 37°C, a película desenvolvida na superfície do meio de cultura, o heterocário, foi transportada para placas com meio mínimo sólido e encubados a 37°C por 10 dias.

As colônias foram fotografadas ao microscópio estereoscópico e a produção de cleistotécios foi analisada pelo número total de cleistotécios produzidos por mm² em três campos em cada heterocário.

Para a análise da média de tamanho foram coletados 5 cleistotécios de cada tamanho dos diferentes heterocários. Os diâmetros dos cleistotécios

foram medidos, utilizando lâmina milimetrada (marca Zeiss) ao microscópio estereoscópico.

Para análise do número de ascósporos produzidos por cleistotécio, foram coletados cleistotécios de heterocários de cada cruzamento, esmagados com o auxílio de uma agulha microbiológica em microtubo, ressuspensionado em 1mL de água e então contados em câmara hematómetradora.

A suspensão de ascósporos obtidos na análise do número de ascósporos por cleistotécio foi diluída e inoculada em placas com meio completo sólido para contagem do número de colônias crescidas após 3 dias de incubação a 37°C afim de verificar sua viabilidade. Este procedimento resultou na porcentagem de sobrevivência nos ascósporos quando comparado com a contagem do número de ascósporos por cleistotécio.

Resultados e Discussão

Foram obtidos três heterocários: *biA1methG1* x MSE; CLB3 x MSE e *proApabaAyA* x MSE.

A produção de cleistotécios foi maior no heterocário MSE x CLB3 seguido pelo heterocário MSE x *proApabaAyA1* e MSE x *biA1methG1*, mostrando por este parâmetro que a contribuição de genes para a produção de cleistotécios provavelmente coloca as linhagens na seguinte ordem decrescente: CLB3, *proApabaAyA* e *biA1methG1*.

Os menores cleistotécios foram encontrados no heterocário com CLB3 e os maiores no heterocário com *proApabaAyA*. Os demais tamanhos foram equivalentes nos três heterocários.

O parâmetro produção de ascósporos por cleistotécio mostrou uma grande variação dentro de cada heterocário. Analisando as médias de apenas três cleistotécios grandes para cada heterocário, houve uma grande diferença entre os três. O mais produtivo foi com a linhagem *proApabaAyA* e o menos produtivo com a linhagem CLB3. O heterocário desta linhagem, portanto, embora seja o campeão na produção de cleistotécios é o menos capaz quanto a produção de ascósporos.

A viabilidade dos ascósporos teve grande variação entre os cleistotécios do mesmo heterocário. A média em ordem decrescente foi: MSE x *biA1methG1*; MSE x CLB3 e MSE x *proApabaAyA*.

Associando os três parâmetros, foi possível obter os resultados apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Número de ascósporos viáveis por cm² dos heterocários crescidos por 5 dias em meio mínimo a 37 C.

MSE x CLB3	MSE x <i>biA1methG1</i>	MSE x <i>proApabaAyA</i>
616.000	495.344	869.660

Na análise da morfologia entre os segregantes dos três heterocários, foi observado que a maioria das colônias continham genes complementares produzindo grande quantidade de cleistotécios em apenas três dias. Outras colônias só foram capazes de fazer micélio de proteção e outras mostraram ausência de ciclo sexual. Isso confirma que a competência para o ciclo sexual é dependente de muitos genes.

Muito poucos genes para o desenvolvimento do ciclo sexual em *A. nidulans* são conhecidos. Alguns deles como alta produção de cleistotécios, assim como sua deficiência foram descritos e mapeados (ZONNEVELD, 1972; 1974). Alguns desses genes são reguladores da diferenciação das estruturas sexuais, outros são produtores de substâncias indutoras como os fatores PSI (CHAMPE et al., 1994).

No presente trabalho, linhagens com baixa ou nenhuma capacidade para ciclo sexual foram analisadas em estudo de complementação em heterocários. Os resultados indicaram que cada linhagem com dificuldades apresentava um conjunto de genes insuficiente para o desenvolvimento das estruturas sexuais, mas quando somado a outro conjunto garantia um desenvolvimento completo.

Conclusões

Existem muitos genes que devem estar presentes em conjunto para que uma linhagem apresente ciclo sexual normal em *A. nidulans*.

Agradecimentos

As autoras agradecem ao CNPq pela bolsa de PIBIC.

Referências

- CHAMPE, S.P., NAGLE, D.L., YAGER, L.N. Sexual sporulation. In: MARTINELLI, S.D., and KINGHORN, J.R., (Org.) ***Aspergillus*: 50 Years On**. New York: Elsevier, 1994. p. 429–454.
- 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.
- TIMBERLAKE, W. E.; CLUTTERBUCK, A. J. Genetic regulation of conidiation. In: MARTINELLI, S. D.; KINGHORN, J. R. (Org.). ***Aspergillus*: 50 years on**. New York: Elsevier, 1994. p. 383–27.
- ZONNEVELD B. J. M. Morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. **Biochim. Biophys.**, v. 273, p. 174–187. 1972.
- ZONNEVELD, B. J. M. α -1,3-glucan synthesis correlated with α -1,3-glucanase synthesis, conidiation and fructification in morphogenetic mutants of *Aspergillus nidulans*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 81, p.445–451. 1974.