

ESTUDO DA CRONOBIOLOGIA NOS CICLOS DE VIDA DO FUNGO *Aspergillus nidulans*

Natália Brita Depieri (PIBIC/CNPq/UEM), Carmem Lucia M.S.C. Rocha
(Orientadora), e-mail: natalia.depieri@hotmail.com.

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

Ciências Biológicas - Genética

Palavras-chave: Cronobiologia, *Aspergillus nidulans*, Desenvolvimento

Resumo:

Os organismos desenvolveram durante a evolução, os chamados ritmos biológicos que são endógenos mas são modulados pelo ambiente. O fungo *Aspergillus nidulans* é um modelo para estudos de regulação do desenvolvimento e o estudo da independência do controle de seus ciclos de germinação e crescimento da colônia constituem o objetivo do presente trabalho. Conídios da linhagem MSE foram inoculados em meio completo líquido (200 e 500×10^4 /mL) e meio condicionado (200×10^4 /mL) para análise das porcentagens de conídios em cada fase da germinação (dormente, embebido, botão, germinado e malformado) com 2, 3, 4:30, 5:30 e 8 horas de incubação a 37°C . Houve um atraso geral da germinação no inóculo maior. No meio condicionado, o atraso ocorreu somente na embebição e houve aceleração das demais fases. Foram analisadas colônias monospóricas e por picada em meio sólido por 10 dias a 37°C . O inóculo maior (picada) mostrou um crescimento diário maior. Concluiu-se com estes resultados que as fases da germinação e o crescimento da colônia tem regulação intrínseca independentes, embora relacionadas.

Introdução

Ao longo da evolução das espécies os seres vivos se adaptaram de maneira que pudessem antecipar mudanças rítmicas ambientais constantes que lhes causavam estresse. Assim, os organismos desenvolveram os chamados ritmos biológicos (DUNLAP; LOROS; DECOURSEY, 2004) que são endógenos, mas sofrem influência de fatores ambientais.

Neste contexto, o estudo de fungos tem sido especialmente voltado para a verificação de ritmos circadianos e suas relações com fatores ambientais, principalmente temperatura e luminosidade (GREENE, 2003).

O fungo filamentosso *Aspergillus nidulans* apresenta um ciclo de vida com basicamente três fases: vegetativa - germinação do esporo e crescimento

das hifas que originam a colônia; a conidiogênese - produção de conídios e a ascospogênese - formação de ascósporos dentro dos cleistotécios (PONTECORVO et al., 1953).

Por apresentar um sofisticado mecanismo de expressão gênica que coordena estas fases, a análise da germinação de conídios é um instrumento de observação do efeito de diversos fatores sobre os mecanismos de regulação desta cascata de eventos. Cada etapa da germinação é marcada por um conjunto de eventos morfogênicos que refletem a expressão de grupos de genes e o tipo de influência que o ambiente pode exercer nessa fase (D'ENFERT, 1997). Essas hifas crescem formando uma colônia radial em culturas com meio sólido (TIMBERLAKE e CLUTTERBUCK, 1994).

O objetivo do presente trabalho foi analisar a independência da regulação das fases da germinação e do ciclo vegetativo.

Materiais e métodos

A linhagem utilizada foi MSE, proveniente do estoque da Universidade de Glasgow (Escócia). O meio de cultura utilizado foi meio completo (MC) sólido e líquido preparado segundo Pontecorvo et al. (1953).

Análise da germinação de conídios: foram coletados conídios a partir de colônias com cinco dias de crescimento em MC sólido a 37°C em solução aquosa 0,01% (v/v) de Tween 80. Foram utilizadas suspensões de $200 \times 10^4/\text{mL}$ e $500 \times 10^4/\text{mL}$.

Estas suspensões foram inoculadas em MC líquido e 100µl desta cultura foram transferidos para lâminas de microscopia esterilizadas e incubadas a 37°C por 2, 3, 4:30, 5:30 e 8 horas, em câmara úmida em placa de Petri.

Em cada horário, 2 lâminas de cada condição foram analisadas ao microscópio óptico. Em cada lâmina foram analisados 300 conídios, estimando-se a porcentagem de conídios em cada fase da germinação: dormente, embebido, botão germinativo, germinado normal e germinado malformado. Todos os experimentos foram repetidos 3 vezes.

Germinação em meio condicionado: uma suspensão de $200 \times 10^4/\text{mL}$ foi inoculada em MC e após duas horas de incubação foi filtrada e inoculada com uma suspensão de mesma densidade de conídios.

Análise do crescimento radial das colônias: colônias monospóricas e colônias obtidas por picada em meio completo sólido foram incubadas por 10 dias a 37°C e o diâmetro dessas colônias foi medido diariamente.

Resultados e Discussão

As tabelas 1 e 2 analisam o efeito da quantidade de conídios na regulação das fases da germinação. Até as 3 horas, ocorre ativação da embebição. Com o inóculo maior, houve uma embebição menor, provavelmente porque além de um ativador de germinação ocorra a síntese de um inibidor relacionado com o controle prévio do ciclo celular que vai ocorrer na fase de botão. Isto ocorre porque esta linhagem tem problema de tubulina que

interfere na mitose e já foi verificado o atraso de ciclo em condições de meio completo com inóculo maior (dados não apresentados). Aparentemente, o inóculo maior teve um atraso de todas as fases da germinação em relação ao menor. No entanto, quando se submete o inóculo menor à germinação em meio condicionado (Tabela 3), a condição de embebição fica compatível com o dobro de inóculo e o resultado fica igual ao do inóculo maior. Porém, a fase seguinte que é a do botão não é inibida como do inóculo maior porque o meio condicionado com 2 horas tinha inibidor de embebição mas não de ciclo (botão). Assim, com 3 horas já aparecem botões e germinados. Isto demonstra que a regulação das duas fases são relacionadas mas independentes.

Tabela 1 – Porcentagem média de 6 repetições de conídios da linhagem MSE de *A.nidulans* nas diferentes fases da germinação em meio completo a 37°C, nos diversos tempos. Suspensão com 500×10^4 /mL.

FASES	HORÁRIOS				
	2:00	3:00	4:30	5:30	8:00
Dormente	76,03	61,63	36,19	20,69	2,41
Embebido	23,97	38,37	49,13	25,94	4,24
Botão	0,00	0,00	17,47	45,40	7,46
Germinado	0,00	0,00	1,11	7,54	76,73
Malformado	0,00	0,00	0,00	0,43	9,16

Tabela 2 – Porcentagem média de 6 repetições de conídios da linhagem MSE de *A.nidulans* nas diferentes fases da germinação em meio completo a 37°C, nos diversos tempos. Suspensão com 200×10^4 /mL.

FASES	HORÁRIOS				
	2:00	3:00	4:30	5:30	8:00
Dormente	33,06	33,05	14,66	7,23	0,87
Embebido	66,94	66,90	55,52	15,55	2,80
Botão	0,00	0,05	28,80	44,05	3,15
Germinado	0,00	0,00	1,02	31,52	82,95
Malformado	0,00	0,00	0,00	1,65	10,23

Tabela 3 – Porcentagem média de 6 repetições de conídios da linhagem MSE de *A.nidulans* nas diferentes fases da germinação em meio condicionado a 37°C, nos diversos tempos. Suspensão com 200×10^4 /mL.

FASES	HORÁRIOS				
	2:00	3:00	4:30	5:30	8:00
Dormente	73,78%	63,98%	24,27%	10,49%	2,10%
Embebido	24,99%	23,94%	22,89%	10,95%	3,04%
Botão	1,23%	9,43%	30,22%	17,60%	1,11%
Germinado	0,00%	2,51%	20,38%	56,37%	81,51%
Malformado	0,00%	0,14%	2,24%	4,59%	12,24%

Outro resultado que é relevante (Tabela 4) é que, após o final da germinação, o ciclo de crescimento da colônia responde ao inóculo maior (picada) crescendo mais do que o menor (monospórica), mostrando que os fatores que regulam a germinação não são os que regulam o crescimento posterior das hifas da colônia.

Tabela 4 – Estimativas diárias de diâmetro em centímetros, das colônias da linhagem MSE de *A.nidulans* cultivadas em meio completo sólido a 37°C, obtidas por inóculo monospórico e por picada.

DIA	INÓCULO	
	colônia monospórica	colônia por picada
1º	0,27	1,23
2º	1,95	3,48
3º	3,93	5,22
4º	5,72	7,08
5º	7,90	8,55
6º	8,72	8,97
7º	8,93	8,98
8º	8,98	8,98
9º	9,00	9,00
10º	9,00	9,00

Conclusões

- 1.A regulação da embebição e do ciclo celular são independentes.
- 2.Os fatores que regulam a germinação não são os que regulam o crescimento posterior das hifas da colônia.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de PIBIC.

Referências

- D'ENFERT, C. Fungi spore germination: insights from the molecular genetics of *A. nidulans* and *N. crassa*. **Fungal Genet. Biol.** v. 21, p. 163-172, 1997.
- DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J.; DECOURSEY, P.J. **Chronobiology: Biological Timekeeping**. Sunderland: Mass Sinauer Associates, 2004.
- GREENE, A.V. et al. A circadian oscillator in *Aspergillus spp.* regulates daily development and gene expression. **Eukaryot Cell**, v.2, p.231-237, 2003.
- PONTECORVO, G. et al. 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. ed. **Aspergillus: 50 years on**. New York: Elsevier, 1994. P. 383-427.