INTERAÇÃO ENTRE SUPRESSORES DE MUTANTES PARA DEFICIÊNCIA EM ÁCIDO NICOTÍNICO EM *Aspergillus nidulans*

CLAUDIO COSTA

IBBMA - UNESP
Campus de Botucatu

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1981

AO PROFESSOR E ORIENTADOR

DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

TUDO MEU CARINHO, RESPEITO
E HOMENAGEM

Aos meus pais

Ao Fábio , Maria Isabel
e Fábio Henrique

D E D I C O

In memoriam

Engº-Agrº Demosthenes Santos Correa,
meu Professor

Ruy Corbani dos Santos Caio,
meu Amigo

B I O G R A F I A

CLAUDIO COSTA, filho de Natalino Costa e Valentina Visockas Costa.

Engenheiro-Agrônomo formado pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, em 1972.

Foi professor de Genética da Fundação Faculdade de Agronomia "Luiz Meneghel", de Bandeirantes, Paraná. Atualmente pertence ao Departamento de Genética do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", campus de Botucatu, SP.

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

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para que pudesse realizar este trabalho. De maneira especial quero agradecer:

- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, mestre, orientador e amigo.
- Ao Prof. Dr. Ernesto Paterniani, pelas facilidades concedidas como Diretor do Instituto de Genética e chefe do Departamento de Genética da E. S. A. "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, e pelo apoio e confiança recebidos.
- Ao Prof. Dr. Gilberti Moreno, atual Diretor do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola do campus de Botucatu e a Profa. Wilma Pereira Bastos Ramos, ex-Diretora do IBBMA, pelo apoio e facilidades concedidas.
- Ao Prof. Dr. Ademar Freire-Maia, ex-chefe do Departamento de Genética do IBBMA e Profa. Dra. Dertia V. Freire-Maia, atual chefe, pela confiança e amizade.
- A Sra. Carlota Rensi Meneghel, da Fundação Faculdade de Agronomia "Luiz Meneghel", de Bandeirantes, Paraná, pelo incentivo, amizade e apoio na fase inicial deste trabalho.
- A Dra. Lorna A. Casselton, da Universidade de Londres, pelas sugestões apresentadas.

- Aos colegas do curso de Pós-Graduação, pela amizade e carinho.
- Aos colegas do Departamento de Genética do IBBMA, pela amizade.
- Aos funcionários do Instituto de Genética da ESALQ / USP , principalmente aos do Setor de Microrganismos, pela amizade, carinho, colaboração e assistência prestadas.
- Aos funcionários do Departamento de Genética do IBBMA , campus de Botucatu, pela colaboração dada.
- A Dr.^a Yoko Bomura Rosato, da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio.

E DE MANEIRA MAIS ESPECIAL O MEU MUITO OBRIGADO AOS PROFESSORES DR. CARLOS ALBERTO DE MAGALHÃES LOPES, CHEFE DO DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA DO IBBMA E DR. GILBERTI MORENO, EX-CHEFE, DEMAIS PROFESSORES E FUNCIONÁRIOS DO REFERIDO DEPARTAMENTO, PELA AMIZADE, CARINHO E VERDADEIRO ESPÍRITO DE COOPERAÇÃO CIENTÍFICA, EM ME PERMITIR O USO DE SEUS LABORATÓRIOS E EQUIPAMENTOS, SEM OS QUAIS NÃO TERIA CHEGADO AO TÉRMINO DESTES TRABALHOS.

Í N D I C E

	Pág.
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
R E S U M O	xiv
S U M M A R Y	xvi
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 - Considerações Gerais sobre Supressão Gênica.	4
2.2 - Supressores Indiretos (Intergênicos)	9
2.3 - Supressores Diretos (Intragênicos)	19
2.4 - Supressores de Informação	22
2.5 - Principais Aspectos da Supressão Gênica em <i>Aspergillus nidulans</i> envolvendo o <u>ge</u> ne <u>nic B 8</u>	29
3 - MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 - Linhagens	32
3.2 - Meios de Cultura	33
3.2.1 - Meio mínimo	33
3.2.2 - Meio completo	33
3.2.3 - Meio de galactose	37

3.2.4 - Meio de acetato de amônio	37
3.2.5 - Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo	38
3.3 - Soluções	38
3.3.1 - Solução de vitaminas	38
3.3.2 - Solução de ácido nucléico de levedura	38
3.3.3 - Solução de Tween	39
3.3.4 - Solução salina	39
3.3.5 - Suplementos adicionados ao meio mínimo	39
3.3.6 - Placas de análise	40
3.4 - Esterilização e Incubação	40
3.5 - Técnicas de Análise Genética	41
3.5.1 - Obtenção de heterocários	41
3.5.2 - Análise meiótica	41
3.5.3 - Análise mitótica	42
4 - RESULTADOS	45
4.1 - Cruzamentos Controle	45
4.1.1 - Resultados de cruzamentos de linhagens com supressores e linhagem <u>pro A 1</u> , <u>paba A 6</u> ; <u>yA 2</u>	45
4.1.2 - Análise meiótica	46
4.1.3 - Análise mitótica	46
4.1.4 - Cruzamento da linhagem MSE com a linhagem <u>pro A 1</u> ; <u>paba A 6</u> : <u>yA 2</u> ..	49

4.1.5 - Resultados de cruzamentos entre a linhagem <u>y A 2</u> ; <u>nic A 2</u> ; <u>ribo D</u> com a linhagem <u>bi A 1</u> ; <u>meth G 1</u>	51
4.1.6 - Análise de heterocários e diplóides .	51
4.2 - Testes de Especificidade	53
4.3 - Cruzamentos de Linhagens com Genes Su - pressores e Outras Linhagens	55
4.3.1 - Cruzamentos das linhagens com ge- nes supressores e a linhagem <u>pyro</u> <u>A 4</u> ; <u>nic B 8</u>	56
4.4 - Análise dos Segregantes que Possivelmen- te Continham Dois Supressores para a mes- ma Deficiência	57
4.5 - Heterocários e Diplóides entre Linhagens Provavelmente Portadoras de Dois Genes Su- pressores e a Linhagem MSE	63
5 - DISCUSSÃO	66
5.1 - Cruzamentos Controle	66
5.2 - Testes de Especificidade	68
5.3 - Comportamento de Dois Supressores Reuni- dos na Mesma Linhagem	71
5.4 - O Mecanismo de Ação dos Supressores	75
6 - CONCLUSÕES	80
7 - LITERATURA CITADA	82

LISTA DAS TABELAS

Pág.

TABELA 1 -	Lista das linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i> utilizadas neste trabalho com seus respectivos marcadores genéticos e origem	34
TABELA 2 -	Lista dos loci gênicos das linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i> utilizadas neste trabalho com seus respectivos símbolos, fenótipos e grupos de ligação	35
TABELA 3 -	Substâncias adicionadas aos meios de cultura	40
TABELA 4 -	Resultados dos cruzamentos entre linhagens portadoras de genes supressores e a linhagem <u>pro A 1</u> ; <u>paba A 6</u> ; <u>yA 2</u>	47
TABELA 5 -	Segregação meiótica do cruzamento das linhagens supressoras com a linhagem <u>pro A 1</u> ; <u>paba A 6</u> ; <u>yA 2</u>	48
TABELA 6 -	Resultados da análise mitotótica de setores haplóides obtidos de diplóides <u>MSE su nic B 8 // pro A 1 ; paba A 6 ; yA 2</u>	49
TABELA 7 -	Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE com a linhagem <u>pro A 1</u> ; <u>paba A 6</u> ; <u>yA 2</u>	50

TABELA 8 -	Resultados do cruzamento entre as linhagens <u>bi A 1</u> ; <u>meth G 1</u> e <u>yA 2</u> ; <u>nic A 2</u> ; <u>ribo D 5</u>	51
TABELA 9 -	Heretocários e diplóides entre as linhagens com supressores e a linhagem <u>33</u> ..	52
TABELA 10 -	Resultados dos cruzamentos entre as linhagens portadoras de genes supressores e a linhagem <u>yA 2</u> ; <u>nic A 2</u> ; <u>ribo D 5</u> .	54
TABELA 11 -	Resultados de cruzamentos entre linhagens com genes supressores e o segregante 13 (<u>su 8 nic B 8</u> ; <u>pyro A 4</u> ; <u>pa ba A 6</u>)	56
TABELA 12 -	Cruzamentos entre as linhagens <u>su ni B 8</u> e segregante <u>su 3 nic B 8</u> x <u>33</u>	58
TABELA 13 -	Cruzamentos entre os descendentes de <u>su 2 x su 3</u> (301 e 304) com <u>bi A 1</u> ; <u>meth G 1</u>	59
TABELA 14 -	Cruzamentos entre os descendentes de <u>su 5 x su 3</u> (304 e 319) com <u>bi A 1</u> ; <u>meth G 1</u>	60
TABELA 15 -	Cruzamentos entre os descendentes de <u>su 8 x su 3</u> (304 e 309) com <u>bi A 1</u> ; <u>meth G 1</u>	61

TABELA 16 - Heterocários e diplóides entre linhagens provavelmente portadoras de dois genes supressores e a linhagem MSE	63
--	----

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 - Mapa parcial de ligação de <i>Aspergillus</i> <i>nidulans</i> com os marcadores genéticos <u>u</u> tilizados neste trabalho	36
FIGURA 2 - Sistema de regulação em cascata	76
FIGURA 3 - Sistema alternativo de regulação em cas <u>u</u> cata	77

INTERAÇÃO ENTRE SUPRESSORES DE MUTANTES PARA DEFICIÊNCIA
EM ÁCIDO NICOTÍNICO EM *Aspergillus nidulans*

CLAUDIO COSTA

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Orientador

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da interação entre genes supressores para deficiência em ácido nicotínico em *Aspergillus nidulans*. Foram estudadas a ação de especificidade dos supressores do mutante nic B 8 e o comportamento de linhagens nos quais foram reunidos dois supressores para a mesma deficiência.

Para se observar se os supressores do mutante nic B 8 em estudo eram específicos ou não, foram feitos cruzamentos e heterocários entre linhagens contendo o supressor nic B 8 e linhagens contendo o mutante nic A 2. O supressor nic B 8 mostrou ser específico em sua ação não suprimindo o mutante nic A 2.

Para se observar o comportamento de dois supressores reunidos na mesma linhagem, foram feitos cruzamentos en

tre as linhagens MSE su nic B 8 e outras linhagens contendo o mutante nic B 8. Os segregantes que exibiram prototrofia para o ácido nicotínico foram cruzados com as linhagens iniciais portadoras dos supressores.

Foi observado que segregantes que provavelmente continham dois supressores reunidos na mesma linhagem mantiveram seu efeito de supressão.

O sistema de regulação em cascata e a presença de tRNA alterados foram propostos para explicar o modo de ação dos supressores.

INTERACTIONS BETWEEN NICOTINIC ACID SUPPRESSORS IN

Aspergillus nidulans

CLAUDIO COSTA

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Advisor

SUMMARY

The purpose of this paper is the study of the ability of some supressor genes of the nic B 8 mutation in *Aspergillus nidulans* in suppress other nicotinic acid deficiency genes and the suppression effect of two nic B 8 suppressor carrying strains.

It was shown that nic B 8 suppressor genes are gene specific. They don't suppress any other nic mutation.

The supression effect is supposed to be maintained in two nic B 8 suppressor-carrying strain.

The cascade regulation system in addition to altered tRNA were applied to explain the suppression action mode.

1 - INTRODUÇÃO

Mutações supressoras são mutações secundárias que modificam o fenótipo em presença do gene mutante original. É o desaparecimento do fenótipo mutante através da ocorrência de uma segunda mutação que pode se dar no mesmo gene ou noutro gene qualquer.

Os supressores podem ser separados dos genes mutantes originais através da recombinação genética.

Stutervant em 1920, foi quem utilizou pela primeira vez o termo supressão referindo-se ao desaparecimento do fenótipo mutante através de mutação em gene distinto ao gene da mutação original (apud: Gorini e Beckwith, 1966).

Sob ponto de vista mais atualizado podemos dizer que supressão gênica se refere ao desaparecimento do fenótipo mutante através de mutação em sítio diferente do sítio da mutação original.

GORINI e BECKWITH (1966) classificaram os supressores gênicos em duas grandes classes, diretos e indiretos, sendo ainda a primeira classe dividida em supressores intragênicos e de informação.

No conceito de supressores também incluem-se genes que impedem a manifestação de outros genes. Isto viria a explicar certos casos de diferenciação sexual e diferenciação celular no processo de desenvolvimento de organismos superiores.

Além de desempenharem importante papel na atividade biológica dos organismos os supressores também são causa de variabilidade genética.

Os genes supressores podem causar nos microrganismos variações de maior valor adaptativo e no caso de microrganismos patogênicos podem resultar em consequências de grande importância.

O valor do estudo da supressão gênica está hoje solidamente estabelecido e intensivos estudos vêm sendo desenvolvidos no sentido de se determinar e esclarecer os mais variados aspectos desse fenômeno biológico.

Um desses aspectos se relaciona à problemática da regulação gênica interrelacionada com supressão.

Em 1963 PONTECORVO descreveu um sistema de regulação gênica, designado sistema de regulação em cascata, onde vários genes reguladores estavam supostamente presentes.

O sistema se prestava bem para explicar a ocorrência de certos fenômenos em eucariotos, especialmente em fungos filamentosos. Certos aspectos do modo ação de alguns genes supressores poderiam ser explicados por esse sistema.

Os estudos de supressão gênica envolvendo a marca genética nic B 8 do fungo *Aspergillus nidulans* iniciaram-se em 1965 com o trabalho de WARR e ROPER.

Um estudo posterior de mutantes supressores do gene nic B 8 em *Aspergillus nidulans*, realizado por MIRANDA FILHO e AZEVEDO (1974), produziu resultados que tentativamente foram explicados pelo sistema de regulação em cascata. No entanto, para maior compreensão dos sistemas de supressão para deficiência em ácido nicotínico, mais dados genéticos teriam de ser introduzidos, tais como obtenção de um número maior de supressores, o estudo da especificidade do locus nic B 8 e a introdução de mais um gene supressor em linhagens já portadoras de um supressor do locus nic B 8.

A obtenção de um número maior de supressores bem como um estudo dos mesmos foi conduzido, concomitantemente ao presente trabalho, por MONTEIRO (1979).

Então, os objetivos destas pesquisas foram estudar a especificidade de alguns supressores do gene nic B 8 em *Aspergillus nidulans* bem como verificar o modo de ação de mais de um gene supressor atuando no locus nic B 8 em uma mesma linhagem.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE SUPRESSÃO GÊNICA

O termo supressão, como já visto anteriormente, é um termo utilizado por geneticistas para se referir a qualquer mutação que mascara o efeito de outra mutação no mesmo gene ou em qualquer outro local do mesmo complemento cromossômico.

Os primeiros casos de supressão gênica foram interpretados por MORGAN e colaboradores (1925) e SCHULTZ e BRIDGES (1932, apud HARTMAN e ROTH, 1973) como duplicações gênicas. Posteriormente outros autores como BONNIER (1927), PLOUGH (1928), BRIDGES (1932), SCHULTZ e BRIDGES (1932, apud HARTMAN e ROTH, 1973) mostraram que supressão gênica podia ser resultante da interação de genes não alélicos.

HAWTHORNE e LEUPOLD (1974) consideram, entretanto, que os casos de supressão intragênica, isto é, aqueles em que a segunda mutação ocorre em outro local do mesmo gene mutante original, podem levar a um uso incorreto do termo "supressão". Observam os autores que supressão deveria ser utilizada somente para os casos de mutação intergênica.

Evidências bioquímicas há de que a supressão é a restauração de uma função que o organismo originalmente possuía e dentre os primeiros trabalhos que tentaram mostrar os mecanismos bioquímicos que levam à supressão destaca-se o de BEADLE e EPHRUSSI (1936, apud: GORINI e BECKWITH, 1966). Estes autores demonstraram que um supressor recessivo e alelo específico do gene y (cor "vermillion" do olho de *Drosophila*) era capaz de restaurar parcialmente a capacidade do indivíduo mutante em produzir cinurenina, uma substância exigida para desenvolvimento da coloração tipo selvagem do olho.

Em vista disso podemos observar que há grande variedade de relações entre os genes supressores e os alelos que suprimem.

Assim, um supressor pode ser estritamente alelo-específico, isto é, suprime mutações que ocorrem num codon particular dentro de um gene ou ser igualmente capaz de suprimir muitas (ou mesmo todas) mutações que ocorrem em diferentes codons dentro do mesmo gene, ou ainda, mutações do mesmo codon ocorrendo em genes não relacionados.

De acordo com seu modo de ação os supressores podem atuar das maneiras que se seguem:

- 1 - A segunda mutação pode ser num gene cujo produto abre uma via metabólica alternativa. Por exemplo, como resultado de uma segunda mutação pode surgir uma enzima que permita a síntese de um produto intermediário cuja síntese, a través da via metabólica normal, estava interrompida pela primeira mutação.
- 2 - A segunda mutação pode ser num gene cujo produto possa substituir diretamente a função do produto do primeiro gene. Por exemplo, a segunda enzima (ou proteína) pode mutar de modo a apresentar uma especificidade ou função maiores abrangendo as propriedades perdidas pelo produto da primeira mutação.
- 3 - A segunda mutação proporciona condições citoplasmáticas, tais que venham afetar a estrutura do produto final do primeiro gene mutado. Por exemplo, esta nova condição pode estabilizar uma enzima que, por apresentar mudanças em sua estrutura, seja instável no meio citoplasmático original.
- 4 - A segunda mutação introduz uma segunda alteração dentro da mesma cadeia peptídica (segunda substituição de amino ácido) que restaura, completa ou parcialmente, a função proteica, com reaparecimento do fenótipo selvagem ou quase selvagem.

- 5 - A segunda mutação reintroduz o modo correto de leitura dentro do mesmo gene cuja sequência de codons fora alterada por adição ou deleção de um par de bases.
- 6 - A segunda mutação atua num dos fatores que controlam o mecanismo de transferência da informação genética a partir do ácido desoxirribonucléico (DNA) até a proteína.

Hã diferenças básicas, como se pode observar entre os três primeiros e os três últimos grupos de mecanismos de supressão gênica.

O primeiro grupo de supressores atua claramente de maneira indireta para contornar o problema. São os genes supressores indiretos.

O segundo grupo inclui os genes supressores diretos, onde a segunda mutação resulta numa correção de maneira direta do produto do gene alterado pela primeira mutação. (GORINI e BECKWITH, 1966).

O grupo de supressores diretos por sua vez pode ser subdividido em duas classes diferentes. Aqueles cujos mecanismos de ação se relacionam com os itens 4 e 5, são chamados "supressores intragênicos". Os supressores cujos mecanismos de ação são do tipo descrito no item 6 são os chamados "supressores de informação".

Por definição os supressores de informação são sempre intergênicos e podem atuar em qualquer um dos passos relativos à transferência de informação do DNA à proteína. (GORINI, 1970).

Entre os supressores de informação incluem-se aqueles que se relacionam à estrutura dos ribossomos. Os ribossomos têm importante papel na manutenção da fidelidade do pareamento codon-anticodon. Então não é de se causar surpresas que alterações na estrutura dos ribossomos possam causar erros no pareamento levando à supressão. Estes supressores têm o nome especial de supressores fenotípicos (CASSELTON, 1971).

O estudo da supressão gênica evoluiu de tal maneira nos últimos anos que se conduziu à necessidade de se estabelecer uma nomenclatura unificada devido ao crescente números de supressores caracterizados. As revisões de GORINI (1970) e HARTMAN e ROTH (1973) estabelecem os critérios para designação e uso de símbolos em supressão.

Novos aspectos do fenômeno de supressão vêm sendo relatado pelos pesquisadores, destacando-se a super-supressão e anti-supressão.

Mutações super-supressoras são mutações capazes de reverter simultaneamente o fenótipo de duas mutações originais independentes. Maiores detalhes sobre este aspecto da supressão podem ser encontrados no trabalho de MONTEIRO (1979).

Os anti-supressores são genes mutantes que exibem ação antagonista em relação ao supressor. Geralmente diminuem o nível de supressão ao invés de inativar completamente o supressor.

Autores como McCREADY e COX (1973 , 1976) descreveram anti-supressores em leveduras e PICARD-BENNOUM (1976) e COPPIN-RAYNAL (1977) observaram estes genes em *Podospora anserina*. As evidências genéticas sugerem que muitos dos genes anti-supressores estejam relacionados a mutações ribossomais restritivas. (MONTEIRO, 1979).

COX (1977) observou também a presença de uma outra classe de genes relacionados ao fenômeno da supressão , aos quais deu o nome de alossupressores. São genes mutantes recessivos que permitem um aumento no nível de supressão. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* os produtos gênicos dessas mutações provavelmente estariam envolvidos nos processos de tradução a nível ribossômico.

Faremos em seguida uma revisão dos principais trabalhos envolvendo aspectos de supressão direta, indireta e de informação em diversos organismos procariotos e eucariotos. Aspectos de supressão para ácido nicotínico envolvendo o fungo ascomiceto *Aspergillus nidulans* serão observados num item particular.

2.2 - SUPRESSORES INDIRETOS (INTERGÊNICOS)

A partir da década de 1950 as análises bioquímicas associadas às técnicas de análise genética envolvendo microrganismos procariotos e eucariotos e eucariotos superiores

vieram aclarar uma série de mecanismos de supressão indireta.

Podemos, entre outros, citar os trabalhos de WAGNER e MITCHELL (1955 , 1964) ; YANOFSKY e ST. LAWRENCE (1960) ; CAMPBELL (1963), e as revisões de GORINI e BECKWITH (1966) ; GORINI (1970) ; CASSELTON (1971) e HAWTHORNE e LEUPOLD (1974).

HOULAHAN e MITCHELL (1947) demonstraram, pela primeira vez, a ocorrência de supressores em *Neurospora*. Utilizaram mutantes deficientes para pirimidina (mutantes pyr 3) e mostraram interações do supressor com diversos mutantes pyr.

MITCHELL e MITCHELL (1952) mostraram que o supressor de pyr em *Neurospora* influenciava a manifestação de outros genes, principalmente para auxotrofia.

BONNER (1951) estudando em *Neurospora* o problema da supressão para deficiência em triptofano observou que no mutante 2198 o gene supressor se mostrava específico em seu efeito, isto é, não era capaz de suprir a deficiência para triptofano em outras linhagens.

Usando também *Neurospora* como material de estudos, GILES (1951) e GILES e PARTRIDGE (1953) observaram a ocorrência de genes supressores para metionina e inositol. Um dos mutantes met foi capaz de suprimir outro mutante diferente, mostrando com isso uma ação não específica, restabelecendo uma via metabólica alternativa, pois a original estava bloqueada pelo primeiro mutante.

LEIN e LEIN (1952) obtiveram um supressor numa linhagem de *Neurospora* deficiente em acetato e testaram-no em outras duas visando demonstrar o efeito de um mesmo supressor em genes não alelos. Seu efeito foi comprovado nas linhagens testadas.

HOWART (1958) detectou vários supressores do mutante cys (deficiência para cistina) em *Salmonella typhimurium*. Verificou que todos os supressores eram não-específicos, capazes de suprimir diversos mutantes. Considera também que provavelmente agem pela introdução de uma via metabólica alternativa.

LEWIS (1961) obteve sete diferentes genes controlando passos metabólicos para síntese de metionina no fungo basidiomiceto *Coprinus lagopus*. Estudando a prototrofia por reversão, observou que as linhagens que carregavam os genes me-1 e me-7 revertiam espontaneamente numa taxa maior e que essa reversão era devida a genes supressores e não propriamente mutação reversa. Num estudo intensivo de 64 mutantes de origens independentes que suprimiam o mutante me-1, observou que haviam cinco loci supressores. Efetuando testes de complementação, concluiu que eram todos recessivos em relação ao selvagem e que mutantes no mesmo locus não se complementavam. Mutantes em loci diferentes se complementaram em dicarios na posição trans. Observou também que sup 3 e sup 4, independentes de sup 5, não se complementaram com este último gene em estudo.

DAVIS (1961 , 1962) estudando genes supresso - res para arginina em *Neurospora* verificou que o mutante pyr 3-a deficiente em pirimidina é suprimido pelo mutante arg 12-s. A mutação arg 12-s tem o efeito de diminuir drasticamente o nível de ornitina transcarbamilase, que é a enzima que utiliza carbamil fosfato para a biossíntese de arginina.

Num estudo posterior REISSIG (1963.a e 1963.b), verificou que o mutante arg 2 , deficiente em arginina em *Neurospora*, bloqueado antes da ornitina transcarbamilase mostrou ser suprimido pela introdução da pyr-3 d. A mutação pyr-3 d elimina a atividade da aspartato transcarbamilase. Este tipo de padrão de supressão pode ser explicado, supondo-se, que em *Neurospora*, hajam dois conjuntos de carbamil fosfato independentemente sintetizados, carbamil fosfato pyr e carbamil fosfato arg. Uma mutação evitando a síntese do conjunto precedente pode ser suprimida por uma mutação que desvia o conjunto posterior para a via metabólica da pirimidina e vice-versa.

LILLY (1963) trabalhando com *Aspergillus nidulans* observou que os mutantes meth 1 , deficientes em metionina, eram capazes de serem suprimidos por genes supressores específicos e não ligados ao locus mutante.

MORGAN (1966) estudando reversões espontâneas de mutantes púrpura para branco em *Coprinus lagopus* , demonstrou que eram devidas à supressão. Quarenta e uma das cinquenta linhagens púrpura que tinham seu efeito suprimido foram cruzadas com o tipo selvagem e em todos os cruzamentos surgi -

ram menos que 25% de descendentes púrpura mostrando que os su pressores deveriam estar ligados aos genes que suprimiam. As relações funcionais desses supressores foram analisadas pela técnica de complementação em dicários e os resultados mostraram que dois loci supressores exibiam complementação inter-alélica extensiva.

CHILDS (1967) constatou diversos supressores em linhagens deficientes para metionina em *Salmonella typhimurium* e diferenciou supressores com e sem especificidade para determinadas mutações met B.

WEGLENSKI (1966 , 1967) e PIOTROWSKA, SAVICKI, e WEGLENSKI (1969) estudaram supressores da deficiência em prolina em *Aspergillus nidulans*. Observaram e mapearam três supressores (su 2 , su 6 e su 19) e verificaram serem do tipo intergênico. No entanto, cada um exibiu um modo específico de ação, apesar de todos em comum afetarem a síntese ou degradação de arginina de modo a permitir a síntese de prolina através de um processo alternativo, diferente do usual.

GAJEWSKI e LITWINSKA (1967) estudando reversões espontâneas de alguns mutantes deficientes para metionina em *Aspergillus nidulans* observaram que estas reversões eram devidas à supressão. Os supressores mostraram ser parciais ou totalmente recessivos. Analisando o mutante meth B observaram, que o supressor r 2 era não específico e o r 3 era altamente específico para o locus em questão.

STADLER (1967) estudando mutantes mtr (resistentes a metil-triptofano e p-fluorofenilalanina) em *Neurospora* verificou a presença de supressores não específicos para o locus mtr (eram capazes de suprimir qualquer mutante mtr).

AYLING (1969) estudando supressores do locus meth B 3 em *Aspergillus nidulans* encontrou seis loci supressores daquele mutante. Verificou que alguns dos supressores foram dominantes no heterocário, mas recessivos no diplóide. Considera também o autor que o sistema de supressão do gene meth B 3 seja bastante complexo, em vista do grande número de supressores detectados.

O fenômeno da super-supressão é, na maior parte das vezes, devido a ação intergênica, sendo classificado como supressão indireta. Em outros casos, super-supressão ocorre devido à ação combinada de supressores diretos, indiretos e de informação.

CHALMERS e SEALE (1971) analisaram mutantes 28 tryp 2 e 13 tryp 1 que afetam a estrutura de um complexo multienzimático em *Neurospora*, relacionados à via metabólica da biossíntese do triptofano. Observaram o fenômeno de super-supressão devido à presença de quatro super-supressores, sendo que seis dos mutantes tryp 2 e dois dos mutantes tryp 1 mostraram efeito de supressão, tanto pelos aspectos genéticos quanto bioquímicos da questão. Consideram que os fenótipos extremos exibidos pelos mutantes tryp 1 e tryp 2 são devidos a terminações prematuras das cadeias protéicas dos complexos en

zimáticos, pela ocorrência de codons de ponto final. Os supressores de codons de ponto final de cadeias protéicas podem se apresentar como alelo específicos, isto é, ou não suprime todos os mutantes desse dado locus ou não restaram a atividade de todos mutantes "nonsense", que são os mutantes que apresentam um ponto final que interrompe prematuramente a cadeia proteica (os três codons de ponto final são UAG, UGA e UAA).

COX (1971) observou que um super-supressor em leveduras, relacionado ao codon UAA (ochre), que é terminalizador de cadeias protéicas, era um gene letal recessivo, como pode comprovar através de análises genéticas. Observou também que o fenótipo letal poderia ser perdido sem que se perdesse o fenótipo de supressão. Este fato era devido à presença de um fator citoplasmático denominado psi. O supressor SQ 2 era letal em linhagens haplóides psi⁺ mas não em linhagens psi⁻. Este determinante citoplasmático fora previamente identificado pelo fato de modificar a atividade de outro super-supressor específico para o codon UAA (ochre). Nesse caso era o fenótipo de supressão que era modificado. Nas linhagens psi⁻ as mutações de codon UAA (ochre) não eram suprimidas pelo supressor SQ 5, enquanto que as linhagens psi⁺ eram suprimidas.

YOUNG e COX (1971) estudando supressores para deficiência em adenina em leveduras, encontraram super-supressores em 90% dos revertentes do locus ade 2-1. Os mutantes

ade 2-1 foram obtidos espontaneamente de linhagens revertentes Ade+. A linhagem carrega um super-supressor específico para mutantes ochre (UAA) e pode ser inativado em presença de uma mutação extracromossômica que ocorre no fator psi.

CHANG (1972) observou a ocorrência de supressores em *Schizophyllum commune*. Analisando geneticamente o mutante denominado "dome" (em forma de abóbada), dm-10, observou que num setor isolado de dm-10 havia o efeito de um gene supressor, o dm-10-s, que restabelecia nesse setor a taxa de crescimento e a morfologia da linhagem selvagem. O gene dm-10-s é específico para dm-10 e dm-9 e não afeta os genes dm-2, dm-5 e dm-7 da mesma série. O gene dm-10-s é um supressor intergênico, localizado em algum ponto do genoma. Sua ação se traduz em produzir um indutor capaz de restringir o repressor produzido pelos genes dm-9 e dm-10 que restaura o fenótipo selvagem.

ROTHWELL e GREEN (1973) trabalhando com *Escherichia coli* W.U. - 36-10, obtiveram vários supressores "amber" (UAG) e "ochre" (UAA) que exibiam novas características fenotípicas através do fenômeno de interconversão de uma forma em outra. Notaram que linhagens que requeriam tirosina eram suprimidas por supressores "ochre" e as linhagens que requeriam leucina por supressores "amber".

SHARIARI e CASSELTON (1973) determinaram que em *Coprinus* a mutação no gene met 1 pode ser suprimida por cinco

genes supressores recessivos diferentes. Os genes su-1 e su-2 apresentam o fenômeno da complementação quando reunidos num heterocário heterozigoto. Os genes su-3 , su-4 e su-5 não se complementam entre si em nenhuma combinação embora se complementem com su-1 e su-2. Apresentam esses genes, diferentes mecanismos de supressão. Os genes su-1 e su-2 são alelos não específicos e su-3 , su-4 e su-5 são alelos específicos.

CASSELTON e SHARIARI (1974) num trabalho com complementar comentam os vários aspectos genéticos da recessividade e não complementação de genes supressores "missense" em fungos. Os supressores "missense", isto é, os que modificam o fenótipo de mutantes devido a alteração de apenas um aminoácido na cadeia protéica, podem ser tipos combinados de supressores intergênicos, intragênicos e de informação, envolvendo tRNA capazes de modificar as especificidades dos codons.

CASSELTON e SEALY-LEWIS (1976) obtiveram e identificaram em *Coprinus* quatro genes supressores do locus acu-1, que é um gene estrutural para síntese de acetil-CoA. O alelo acu-1-34 foi suprimido pelos quatro supressores os quais são alelo específicos, recessivos e não se complementaram nem em diploides, duplos heterozigotos ou em dicários.

Posteriormente, SEALY-LEWIS e CASSELTON (1976), no mesmo fungo *Coprinus* isolaram cinco supressores da mutação met-5-1 , relativa ao metabolismo da metionina. Todos os supressores são alelo específicos. Dois são recessivos e com -

plementaram-se normalmente em heterozigotos. Dos outros três, dois são recessivos e não se complementaram e o terceiro apresentou-se dominante.

KOHOUT e BERTRAND (1976) estudaram em *Neurospora* o fenômeno da supressão de mutantes "poky". Tais mutantes se caracterizam por serem citoplasmáticos, baixo crescimento, deficiência em citocromos mitocondriais aa 3 e b, excesso de citocromo c e sistema respiratório cianido-sensível. Isolaram seis genes nucleares supressores designados sup-1, sup-3, sup-4, sup-5, sup-10 e sup-14 que não eram alelos e suprimiam o crescimento vagaroso e restabelecendo parcialmente a atividade respiratória. Sugerem os autores que os supressores afetem a estrutura e propriedades de proteínas mitocondrio-ribossomais.

BERTRAND e KOHOUT (1977) mostraram que o conteúdo de citocromos mitocondriais aa 3 e b em linhagens "poky" é significativamente maior naquelas que apresentam qualquer um dos supressores do que no que não são supressoras.

Mc CREADY e COX (1976) estudaram a especificidade de ação de supressores e antissupressores de levedura. Isolaram em *Saccharomyces* 18 mutantes em oito loci, tidos como antissupressores do gene SUP Q-2, um alelo suprimido por mutação "ochre" (UAA) de SUP 11 e cruzaram com três outros supressores. Observaram que o gene SUP 2 (que insere tirosina) não foi capaz de suprimir as mutações "ochre" adc 2.1 e

can 1.100 porém suprimia his 5.2 e lys-1.1. Observaram também que nenhum antissupressor afetou a capacidade do gene SUP 11-am, um supressor "amber" (UAA) do alelo SUP 11 em suprimir o efeito de trp1. 1, obtido de mutação "amber".

2.3 - SUPRESSORES DIRETOS (INTRAGÊNICOS)

A partir da década de 1960 intensificaram-se os trabalhos na área de supressão direta e de informação como se pode apreciar nos trabalhos de BRENNER e BECKWITH (1965); BRODY e YANOFISKY (1963); GORINI e BECKWITH (1966); CARBON, BERG e YANOFISKY (1966); GUPTA e KHORANA (1966); BERG, YANOFISKY e CARBON (1967); CARBON e CURRY (1968); SADGOPAL (1968); HILL e colaboradores (1969); WITKIN (1969); GORINI (1970); YOUNG e COX (1971); BAYLISS e VINOPAL (1971); BISWAS e GORINI (1972); GORINI (1973); HARTMAN e ROTH (1973); ROTHWELL e GREEN (1973); GORINI (1974); HAWTHORNE e LEUPOLD (1974); EL SEVIERS e GORINI (1975); GARVIN e GORINI (1975) entre outros autores.

CRICK e colaboradores (1961) usando supressores intragênicos vieram a esclarecer algumas propriedades do código genético. Em experimentos com o bacteriófago T_4 , revertentes espontâneos foram isolados dos mutantes induzidos por proflavina no gene rIIB. A reversão não levava exatamente à sequência original de nucleótideos do DNA do tipo selvagem. Por teste de recombinação com o selvagem ficou provado que es

ses revertentes apresentavam uma segunda mutação na mesma pequena seção (cerca de 1/5) do cistron B que continha a mutação original. Individualmente cada uma das duas mutações produz um fenótipo mutante, mas juntas produzem um fenótipo selvagem.

MILLS e ELLINGBOE (1969) descreveram oito reversões induzidas por hidroxilamina num mutante arginina (arg-2) de *Schizophyllum commune*. Todos eles cresceram em meio mínimo porém são recessivos quando combinados em heterocários com arg-2. O gene arg-2 possui efeito dominante em complementação, como algumas vezes ocorre em testes com proteínas de mutantes "missense", quando a enzima é multímera. Sete dos oito supressores não puderam ser separados de arg-2 porém o su-1 foi separável. Em cruzamentos de arg-2 su-1 com o tipo selvagem, seis descendentes idênticos em suas propriedades ao arg 2 foram recuperados com novo fenótipo entre treze outros de 87 descendentes testados. Estes últimos recombinantes requeriam arginina, como o arg-2 porém eram eficientes em fracas complementações com arg-2. A complementação é frequentemente encontrada em mutações "missense" bem espaçadas em genes que exibem esse fenômeno de complementação. A interpretação mais simples é de que o supressor su-1 é uma nova mutação "missense" no gene arg-2. Pode ser também um defeito no gene que codifica uma proteína diferente que se associa ao produto do gene arg-2 para formar um multímero ativo. Os outros sete supressores são alterações no codon mutante do arg-2 ou estão

estritamente ligadas a segundas mutações "missense" intragênicas. Heterocários entre arg-2 su-1 e outras linhagens suprimidas crescem em meio mínimo, indicando que o bloqueio dominante de complementação pelo arg-2 é aliviado pelo supressor intragênico. Os autores ficaram impressionados pela alta porcentagem de recombinação entre su-1 e arg-2, que é uma situação análoga à observada por MORGAN (1966) em *Coprinus*.

GIRARD e ROSSIGNOL (1974) localizaram quatro genes distintos cv-1, cv-2, cv-4 e cv-6 que comportando-se como fatores monogênicos em *Ascobolus immersus* atuavam como supressores específicos em genes para pigmentação de esporos (respectivamente b-1, b-2, b-4 e b-6). No gene b-2 onde este fenômeno foi estudado em maior detalhe o efeito de cv-2 na supressão da conversão gênica é quase total. A recombinação intragênica é muito fortemente diminuída e o "crossing-over" também afetado. Nos genes b-1, b-2 e b-4 a supressão da conversão só é observada quando o correspondente modificador (cv-1, cv-2, cv-4) estão na condição heterozigótica. Observaram que o gene cv-6 atua de igual maneira nos genes b-6, cv-1 e b-1 e de maneira diferente no cv-2 e b-2, estando todos ligados. Não obtiveram recombinantes entre os modificadores e os genes responsáveis pela pigmentação. A mesma distância genética foi observada entre os genes ligados b-4 e b-6 e os genes cv-4 e cv-6. Isto leva a supor que estes modificadores estejam fortemente ligados aos genes correspondentes.

Observaram também que o cv-4 tem um certo efeito na recombinação entre b-4 e b-6 , e também diminui a frequência de recombinação quando cv-4 está em heterozigose.

CULBERTSON e colaboradores (1977) estudaram mutações "frameshifts" e supressores "frameshifts" em *Saccharomyces cerevisiae*. Mutações "frameshift" são aquelas devidas a ganhos ou perdas de bases em uma dada sequência de DNA, causando erro de leitura a partir do ponto de alteração de modo a alterar a sequência de aminoácidos da proteína. Usaram ICR-170 como mutagênico induziram uma dada quantidade de mutações em levedura que apresentavam um comportamento semelhante ao de mutações "frameshift" em bactérias. Observaram que são mutações polares cuja polaridade pode ser mostrada por supressores internos, reverterem com acridina porém não são suprimidas por supressores "nonsense" conhecidos. Observaram também que o fator psi não mendeliano aumenta a eficiência de alguns supressores de mutações "frameshift".

2.4 - SUPRESSORES DE INFORMAÇÃO

Os supressores de informação são os que mais têm atraído a atenção dos pesquisadores que atuam nesta área. As revisões de GORINI (1970) , CASSELTON (1971) e HARTMAN e ROTH (1973) evidenciam claramente que os microrganismos, tanto procariotos quanto eucariotos, têm sido o mais farto mate-

rial de trablho e que mais têm fornecido informações quanto ao fenômeno da supressão.

TODD e CASSELTON (1972) estudaram uma série de supressores recessivos em *Coprinus lagopus* quando ao aspecto de complementação e mecanismo de ação desses supressores. Observaram que os supressores são específicos para cada alelo analisado e que também não se complementam. Estas duas propriedades são próprias de mutações "missense" pois especificam tRNA com especificidade alterada para os codons modificados. Os su⁺ tRNA de mutações "missense" não competem em expressão com seus correspondentes su⁺ tRNA, com os tRNA codificados por outros genes que normalmente transcrevem o codon mutante. Comparada com um haplóide, a quantidade relativa de su⁺ tRNA é a metade, num diploide su⁺ / su⁻. Se o su⁺ tRNA tem baixa eficiência, sua atividade no diplóide pode não ser expressada, levando a crer que o gene su⁺ pareça recessivo. Num diploide carregando dois genes su⁺ diferentes, a quantidade relativa de su⁺ tRNA é a mesma de um haploide. A atividade do supressor é tão expressa, levando a uma aparente não-complementação.

TODD e CASSELTON (1973), usaram mutações no gene acu-I, de *Coprinus*, que conduz à inabilidade para uso de acetato como única fonte de carbono, para selecionar mutações gênicas recessivas supressoras. De cinco alelos acu-1 testados, dois, acu-1-2 e acu-1-4 eram suprimidos. Três genes

supressores diferentes suprimiam a mutação acu-I-2 e dois suprimiam a mutação acu-I-4. Todas as mutações supressoras eram completamente alelo-específicas pois somente suprimiam a mutação acu-I para a qual foram selecionadas. O mecanismo de não complementação e recessividade foi comentado com base na supressão informacional através de erro na tradução causada por moléculas de RNA de transferência modificados adquirindo uma nova especificidade de codon.

SHAHRIARI e CASSELTON (1974), num trabalho subsequente testaram a habilidade de quatro genes supressores da mutação met-1-1 em suprimir met-1-2, uma segunda mutação de met-1. Os supressores que exibiram complementação, sup-1 e sup-2 provaram ser alelos não específicos e suprimiram ambas as mutações met-1. Os supressores que não exibiram complementação, sup-3 e sup-5 eram alelo específicos, pois somente suprimiram a mutação met-1-1. Em seguida, os autores CASSELTON e SHAHRIARI (1975), testaram a habilidade desses supressores em suprimir dois outros mutantes bloqueados na biossíntese da metionina, met-5 e met-8. Os supressores sup-1 e sup-2 suprimiram met-8 enquanto sup-3 e sup-5 suprimiram somente a mutação met-1-1. Nenhum dos supressores suprimiu met-5. Os autores concluíram que há dois grupos funcionalmente diferentes de supressores para a marca met em *Coprinus*. As mutações sup-1 e sup-2 são supressores funcionais que fecham uma via metabólica alternativa corrigindo o efeito das lesões met-1.

e met-8 mas não a lesão met-5, enquanto sup-3 e sup-5 são supressores "missense" informacionais que traduzem especificamente o codon mutante met-1.

LEWIS e CASSELTON (1975) relataram a identificação de um supressor instável, sup-6⁺ em *Coprinus lagopus*. O supressor podia ser mantido em meio mínimo, mas era perdido em meio contendo D-L metionina e L-metionina. Isolamento de extremidades de hifas de linhagens monocarióticas carregando sup-6⁺ originou três tipos de colônias: o tipo paternal instável, o auxotrófico met-1 estável e o prototrófico estável que crescia pouco e era inibido por crescimento em meio de metionina. O tipo sup-6⁺ estável foi isolado de dicários formados entre a linhagem instável sup-6⁺ e linhagens carregando o alelo selvagem do gene supressor. Em cruzamentos sexuais somente o auxotrófico met-1 segregou. Os autores sugeriram que a linhagem instável sup-6⁺ possui um cromossomo extra carregando a mutação sup-6⁺. As pressões seletivas em diferentes meios justificam a perda de cromossomos duplicados. Os resultados foram interpretados como sendo supressão missense por um tRNA mutante indispensável.

ESSER e STAHL (1973) estudando o controle da formação de corpos de frutificação no basidiomiceto *Polyporus ciliatus* que é controlada por fatores morfogenéticos e de incompatibilidade, verificaram a formação de frutificações anormais com micélio verdadeiramente monocariótico obtido a par-

tir de estoques dicariáticos estáveis. Durante cruzamentos estudados entre frutificadores monocarióticos um novo fenômeno foi observado. Em todos os cruzamentos nos quais ocorria migração nuclear, a frutificação monocariótica foi inibida logo que o heterocário foi estabelecido. Os autores concluíram que a ação de genes responsáveis por esta frutificação monocariótica é suprimida logo que núcleos com diferentes fatores de incompatibilidade estejam em um citoplasma comum.

GORINI (1973) estudando o papel dos ribossomos na fidelidade da tradução da mensagem genética observou que mutações ribossômicas str A restringiam a eficiência de supressores de tRNA (supressores de informação). A mutação Ram, outra mutação ribossômica reverte todas as restrições.

NEWCOMBE e GRIFFITHS (1973) mostraram em *Neurospora* a ação de oito super-supressores testados em duas linhagens (76 AD 3 B). Observaram que treze mutantes foram suprimidos pelo menos pela ação de um super-supressor, fossem eles mutantes "nonsense" ou "missense".

PICARD (1973) obteve 41 supressores de dois mutantes polares do segmento 29 em *Podospora anserina* após tratamento com os mutantes N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina e metano sulfonato de etila.

Os supressores foram diferenciados em três classes (classe I, II e III) pelo critério do espectro padrão. Em cada classe, pelo menos um supressor representativo mostrou

ser gene não específico. A classe I de supressores foi dominante e somente suprimiu mutantes polares no segmento 29. Os supressores das classes II e III foram parcialmente dominantes e suprimiram mutantes polares e não polares. As diferenças entre as classes II e III pareceram ser somente quantitativas. A autora estabeleceu duas hipóteses para caracterizar o tipo e ação dos supressores: na primeira hipótese, tRNA poderiam estar envolvidos em todas as três classes de supressão. A classe I seria "nonsense" específica e a classe II e III "nonsense-missense". Na segunda, tRNA estariam envolvidos somente na classe I, enquanto ambiguidade ribossomal poderia ser responsável pela classe II e III de supressão.

RYCE, TAKINS e HUSSEY (1973) verificaram que mutações UGA em *Salmonella typhimurium* podem ser suprimidas por mutações posteriores em outros dois loci, o sup-K localizado a 95 minutos no mapa e sup-S a 122 minutos. Observaram, também que mutações "frameshift" podem ser suprimidas por mutações em seis loci, de suf A a suf F localizados a 19, 45, 73, 95, 116 e 128 minutos de mapa, respectivamente. Estes seis loci afetam os tRNA^{pro} e tRNA^{gly}, isto é, os tRNA da prolina e da glicina e parecem permitir leitura de sequências de quatro bases em determinados locais "frameshift".

KOLTIN e DAY (1976), estudando a supressão do fenótipo "Killer" em *Ustilago maydis* cruzaram 19 linhagens de células sensíveis com três linhagens "Killer". Cruzamentos

envolvendo 11 linhagens deram frequências de "Killer" ao redor de 71% a 100% da progênie. Em oito linhagens a segregação apresentou frequência de "Killer" de 0% a 58%. Muitos dos "Killer" eram instáveis em determinadas culturas e a supressão mostrou vários graus de especificidade, parecendo ser citoplasmaticamente determinada numa linhagem.

FARMER (1977) mostrou que em *Drosophila melanogaster*, em muitos estoques de laboratório existe o supressor Su (wco-2) que altera o fenótipo de moscas WCO-2 para fenótipos selvagem. É um supressor específico para o locus, dominante, viável em homozigose localizado perto de Sy (bwv-1) no braço direito do cromossomo 2 e mostra efeito de dose simples. O grau de supressão depende do "background" genético. Maiores detalhes de supressores em *Drosophila* podem ser encontrados no trabalho de MONTEIRO (1979).

SEALY-LEWIS e CASSELTON (1977) analisando 21 mutações gênicas supressoras da mutação met-5-1, que são "missense", no fungo *Coprinus*, classificaram-nas em seis grupos (A a F) baseados na dominância ou recessividade, ligação ao locus met-5, complementação em células heterozigóticas e com portamento do crescimento. O número de loci supressores não pode ser determinado pois cruzamentos entre linhagens portadoras de supressores foram inviáveis. Consideram os autores que os genes supressores do locus met-5 causem correções a nível de transcrição. Em quatro grupos (C a F) os supressores se

mostraram com propriedades esperadas para mutações em genes estruturais que codificam tRNA. O grupo C se mostrou dominante e as demais mutações foram recessivas e não se complementaram em células heterozigotas. A eficiência de supressão foi testada comparando-se a depressão da taxa de crescimento causada fazendo-se as linhagens crescerem em meio suplementado com metionina. As mutações dominantes foram os supressores mais eficientes, pois foram as que mais influenciavam negativamente a taxa de crescimento. Observaram também que mutações no grupo A e B diminuíam mais o crescimento que mutações no tRNA porém afetavam algum outro componente na transcrição, pois eram recessivas e se complementavam normalmente. Sugerem que sejam alterações nos tRNA que modificam enzimas.

2.5 - PRINCIPAIS ASPECTOS DA SUPRESSÃO GÊNICA EM *Aspergillus nidulans* ENVOLVENDO O GENE NIC B 8

No fungo *Aspergillus nidulans* o fenômeno da supressão gênica é relativamente pouco estudado. Os trabalhos pioneiros, que de modo geral se relacionaram ao isolamento e caracterização de supressores e seus mecanismos de supressão encontram-se referidos nos trabalhos de MIRANDA FILHO (1972), MONTEIRO (1979) e BAL e colaboradores (1979).

WARR e ROPER (1965) iniciaram os estudos de supressão envolvendo a marca nic B 8. Estudaram linhagens mu-

tantes de *Aspergillus nidulans* que conferiram resistência a diversas substâncias. Observaram que o mutante pf 21 (resistente a p-fluoro-fenilalanina) também conferia resistência a iodo-acetato e agia como supressor de nic B 8, que era o mutante deficiente em ácido nicotínico.

MIRANDA FILHO (1972) e MIRANDA FILHO e AZEVEDO (1974) estudando a supressão da marca nic B 8 em *Aspergillus nidulans* isolaram 11 supressores desta marca tendo mapeado nove destes no grupo de ligação VII. Através da análise meiótica os supressores foram mapeados em relação as marcas nic B 8 e v-10 verificando-se que três supressores (su 2, su 4 e su 9) são proximais em relação às marcas e outros quatro (su 1, su 3, su 5 e su 8) são distais. O su 7 (que envolve duplicação tem posição indeterminada e su 6 é um supressor intragênico. Os testes de alelismo revelaram serem os supressores alelos entre si e que, portanto, existem quatro loci supressores. Todos os supressores, exceto su 7, tem efeito pleiotrópico, pois além de suprimirem a deficiência para ácido nicotínico conferem resistência a p-fluorofenilalanina. Para explicar o modo de ação dos supressores os autores propuseram um mecanismo de regulação em cascata.

MONTEIRO (1979) obteve sete novos supressores do mutante nic B 8 de *Aspergillus nidulans*, espontaneamente e por ação de luz ultravioleta. Os sete supressores foram a-

nalizados geneticamente e mapeados em diferentes grupos de ligação: três genes foram localizados no grupo de ligação IV, um no grupo de ligação VI e dois genes no grupo de ligação VII. Somente uma mutação caracterizou-se como reversão verdadeira de nic B 8.

O modo de ação dos supressores, relacionados com o mecanismo da regulação da síntese de ácido nicotínico, foi explicado com base no sistema de regulação em cascata proposto por PONTECORVO (1963). Entretanto, postulou-se também um sistema alternativo deste, no qual o produto gênico do supressor atua como co-repressor que juntamente com o repressor produzido pelo locus R_1 da síntese de ácido nicotínico formam um complexo repressor que bloqueia a ação de genes estruturais. Vários supressores nic B 8 evidenciaram capacidade de interferir no mecanismo de síntese do tiosulfato de sódio, quer seja de maneira positiva, quer seja de maneira negativa.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - LINHAGENS

As linhagens utilizadas neste trabalho são derivadas da linhagem selvagem de *Aspergillus nidulans* isoladas por YUILL (1939). São originadas dos estoques do Departamento de Genética da Universidade de Glasgow, Escócia, e mantidas pelo Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra. As linhagens MSE su nic B 8 e pyro A 2 ; nic B 8 foram obtidas no Setor de Microrganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. Essas linhagens e suas características genéticas são mostradas na Tabela 1 e os símbolos dos genes mutantes e seus respectivos fenótipos estão na Tabela 2. Na Figura 1 estão representados os grupos de ligação do *Aspergillus nidulans* com os marcadores genéticos

utilizados neste trabalho, de acordo com CLUTTERBUCK (1974) ,
com os símbolos propostos por CLUTTERBUCK (1973).

3.2 - MEIOS DE CULTURA

3.2.1 - MEIO MÍNIMO

Preparado de acordo com PONTECORVO e col.(1953)
modificado por AZEVEDO e COSTA (1973).

NaNO_3	6,0 g
KN_2PO_4	1,5 g
KCl	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
FeSO_4	0,01 g
ZnSO_4	0,01 g
Glicose	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1.000 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4% .	

3.2.2 - MEIO COMPLETO

Preparado também de acordo com PONTECORVO e col.
(1953), modificado por AZEVEDO e COSTA (1973), adicionando - se
ao meio mínimo:

TABELA 1 - Lista das linhagens de *Aspergillus nidulans* utilizadas neste trabalho com seus respectivos marcadores genéticos e origem

Linhagem	Genótipo	Referência
"Master Strain " E (MSE)	<u>y A2 su A1 ad E 20</u> ; <u>w A3</u> ; <u>gal A1</u> ; <u>pyro A4</u> ; <u>fac A 303</u> ; <u>s B3</u> ; <u>nic B8</u> ; <u>ribo B2</u>	Mc CULLY e FORBES (1965)
<u>MSE su nic B8</u>	<u>y A2 su A1 ad E 20</u> ; <u>w A3</u> ; <u>gal A1</u> ; <u>pyro A4</u> ; <u>fac A 303</u> ; <u>s B3</u> ; <u>su nic B8</u> ; <u>ribo B2</u>	MIRANDA FILHO (1972)
<u>bi A1</u> ; <u>meth G1</u>	<u>bi A1</u> ; <u>meth G1</u>	
<u>pro A1</u> ; <u>paba A6</u> ; <u>y A2</u>	<u>pro A1</u> ; <u>paba A6</u> ; <u>y A2</u>	
<u>pyro A4</u> ; <u>nic B8</u>	<u>pyro A4</u> ; <u>nic B8</u>	BORDIGNON- OLIVEIRA (1978)
<u>yA2</u> ; <u>nic A2</u> ; <u>ribo D5</u>	<u>y A2</u> ; <u>nic A2</u> ; <u>ribo D5</u>	

TABELA 2 - Lista dos loci gênicos das linhagens de *Aspergillus nidulans* utilizadas neste trabalho com seus respectivos símbolos, fenótipos e grupos de ligação

Símbolo	Fenótipo	Grupo de ligação
Nutricionais:		
<u>ad E 20</u>	requer adenina	I
<u>bi A 1</u>	requer biotina	I
<u>Fac A 303</u>	incapacidade para utilizar acetato	V
<u>gal A 1</u>	incapacidade para utilizar galactose	III
<u>meth G 1</u>	requer metionina	IV
<u>nic A 2</u>	requer ácido nicotínico	V
<u>nic B 8</u>	requer ácido nicotínico	VII
<u>paba A 6</u>	requer ácido p-aminobenzóico	I
<u>pro A 1</u>	requer prolina	I
<u>pyro A 4</u>	requer pirodoxina	IV
<u>ribo B 2</u>	requer riboflavina	VIII
<u>ribo D 5</u>	requer riboflavina	V
<u>s B 3</u>	requer tiosulfato de sódio	VI
Visíveis:		
<u>w A 3</u>	conídios brancos epistáticos ou y e y^+	II
<u>y A 2</u>	conídios amarelos	I
Supressores:		
<u>su A 1 ad E 20</u>	supressor de <u>ad E 20</u>	I
<u>su nic B 8</u>	supressor de <u>nic B 8</u>	VII

peptona	2,0 g
caseína hidrolisada	1,5 g
extrato de levedura	0,5 g
solução de vitaminas	1,0 ml
ácido nucléico de leveduras	2,5 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

3.2.3 - MEIO DE GALACTOSE

Preparado da mesma forma que o meio mínimo (item 3.2.1) apenas substituindo-se a glicose por galactose como fonte de carbono.

3.2.4 - MEIO DE ACETATO DE AMÔNIO (APIRION, 1962)

acetato de amônio	12,0 g
fosfato di-hidrogenado de potássio (KH_2PO_4)	3,0 g
cloreto de sódio (NaCl)	2,0 g
sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
sulfato de ferro (FeSO_4)	0,01 g
sulfato de zinco (ZnSO_4)	0,01 g
ágar	15,0 g
água destilada	1.000 ml
O pH foi ajustado para 6,1 com NaOH 4%	

3.2.5 - MEIO MÍNIMO LÍQUIDO MAIS 2% DE MEIO COMPLETO

Adicionou-se ao meio mínimo líquido 2% de meio completo e distribuiu-se em tubos (2,5 ml por tubo).

3.3 - SOLUÇÕES

3.3.1 - SOLUÇÃO DE VITAMINAS

biotina	0,2 mg
ácido p-aminobenzóico	10,0 mg
aneurina (tiamina)	50,0 mg
piridoxina	50,0 mg
ácido nicotínico	100,0 mg
riboflovina	100,0 mg
água destilada esterilizada	100,0 ml

A solução foi parcialmente esterilizada em banho-maria por 15 minutos e guardada no refrigerador a 4°C em frasco escuro sob clorofórmio.

3.3.2 - SOLUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEÍCO DE LEVEDURAS

ácido nucleico de leveduras :	2 g em 15 ml de solução In de HCl
ácido nucleico de leveduras :	2 g em 15 ml de solução IN de NaOH

Ambas soluções foram aquecidas a 100°C por 20 minutos, misturadas e o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 4%. Filtrou-se e completou-se o volume para 40 ml sendo a seguir conservada no refrigerador a 4°C , sob clorofórmio.

3.3.3 - SOLUÇÃO DE TWEEN

Adicionou-se tween 80 a água destilada em uma concentração de 0,1% (v / v). A seguir, distribuiu-se em tubos (2,5 ml por tubo).

3.3.4 - SOLUÇÃO SALINA

Preparou-se uma solução de cloreto de sódio a 0,89% dissolvendo-se o sal em água destilada. A solução foi colocada em frascos (9 ml por frasco).

3.3.5 - SUPLEMENTOS ADICIONADOS AO MEIO MÍNIMO

Preparou-se o estoque de suplementos adicionando-se cada um deles em água destilada esterilizada. A solução foi a seguir colocada em banho-maria por 15 minutos para esterilização parcial e conservada no refrigerador a 4°C .

TABELA 3 - Substâncias adicionadas aos meios de cultura

Substância	Concentração final no meio de cultura
Adenina	25,00 µg/ml
Ácido nicotínico	0,50 µg/ml
Ácido p-amino benzóico	0,25 µg/ml
Biotina	0,20 µg/ml
Metionina	50,00 µg/ml
Piridoxina	0,25 µg/ml
Prolina	50,00 µg/ml
Riboflavina	0,50 µg/ml
Tiossulfato de sódio	100,00 µg/ml

3.3.6 - PLACAS DE ANÁLISE

Para análise genética, utilizaram-se placas de Petri com meio completo, meio mínimo, com meio mínimo suplementado com todos os requisitos nutritivos envolvidos no cruzamento e com meio mínimo suplementado com todos os requisitos, exceto os que estavam sob análise.

3.4 - ESTERILIZAÇÃO E INCUBAÇÃO

Os meios de cultura e as soluções foram sempre esterilizados em autoclave por 15 minutos a uma atmosfera de pressão e a 120°C.

A temperatura de incubação foi de 37°C em todos os experimentos.

3.5 - TÉCNICAS DE ANÁLISE GENÉTICA

3.5.1 - OBTENÇÃO DE HETEROCÁRIOS

Utilizou-se o mesmo método descrito por PONTECORVO e col. (1953) onde conídios de duas linhagens foram adicionados em 2,5 ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo, o que permite apenas pequena germinação de conídios. Depois de 3 a 4 dias de incubação, formou-se uma película na superfície do meio a qual foi transferida para placas contendo meio mínimo sólido.

3.5.2 - ANÁLISE MEIÔTICA

A análise meiótica baseia-se no ciclo sexual do fungo, através da análise de ascosporos produzidos em cleistotécios híbridos, segundo o método descrito por PONTECORVO e col. (1953).

O heterocário obtido conforme o item 3.6.1 foi transferido para placas contendo meio mínimo. As placas foram vedadas com fita celulósica, para favorecer a formação de cleistotécios, e incubados por dez dias. Sob lupa, com auxílio de um fio de platina, os cleistotécios maduros, de maior

tamanho foram retirados e rolados em placas com meio mínimo , a fim de libertá-los das células de "hülle" e conídios aderentes (BARACHO, VENCovsky e AZEVEDO, 1970). Cada cleistotécio limpo foi transferido para tubo de ensaio contendo solução de tween e rompidos na parede do tubo, libertando dessa forma os ascosporos. Com a mesma pipeta utilizada para o esmagamento, a parede do tubo foi lavada suspendendo dessa forma os ascosporos na solução de tween. Em placas com meio completo, semeou-se 0,1 ml de cada solução, sendo o restante conservado em refrigerador. Após três dias de incubação foi possível verificar se os cleistotécios eram híbridos. Dentre os híbridos, escolheu-se um para análise dos ascosporos.

Os ascosporos do cleistotécio selecionado foram semeados em placas contendo meio completo e após três dias de incubação as colônias foram transferidas para placas de análise com auxílio de um replicador de 26 agulhas de níquel-cromo, obedecendo a disposição $(5 \times 5) + 1$ das colônias nas placas mestras. As leituras foram feitas após 24 , 48 e 72 horas (AZEVEDO e col., 1976).

3.5.3 - ANÁLISE MITÓTICA

Esta foi realizada através do ciclo parassexual, segundo o método de ROPER (1952). Nos setores heterocarióticos, obtidos de acordo com o método descrito no item 3.6.1, a maioria dos conídios formados são haploides e não conseguem se

desenvolver em meio mínimo, porém pode haver fusão de núcleos haplóides formando núcleos diplóides e não conseguem se desenvolver em meio mínimo, porém pode haver fusão de núcleos haplóides formando núcleos diplóides heterozigotos que originam conídios diplóides que são capazes de se desenvolverem em meio mínimo. Pelo fato da porcentagem de aparecimento de conídios diplóides ser muito baixa, transferiu-se grande quantidade de conídios dos setores heterocarióticos para solução de tween (aproximadamente 10^7 conídios por ml) e semeou-se em placas contendo meio mínimo. Após 72 horas de incubação isolaram-se diplóides heterozigotos. Como critério para identificação dos diplóides, baseou-se na capacidade de crescimento em meio mínimo e diâmetro dos conídios. A medição do diâmetro dos conídios foi realizada em microscópio com ocular micrométrica, tomando-se cadeias de cinco conídios em lâmina com lisol diluído (1:10).

Os diplóides obtidos foram induzidos à haploidização com uso de cloroneb (AZEVEDO e SANTANA, 1975) que inibe o crescimento de diplóides, permitindo o crescimento de setores haplóides. A haploidização ocorre através de aneuploidia com perdas sucessivas de cromossomos (KÄFER, 1961). A técnica consiste em adicionar 2,5 ml da solução a 2% de cloroneb em 200 ml de meio completo. Os diplóides foram inoculados nessas placas através de estrias (a fim de se obter maior número de setores haploides) e após 7 a 10 dias de incubação

surgiram setores amarelos e brancos. Após se proceder o isolamento e purificação dos setores haploides em meio completo, estes foram inoculados um a um em 26 pontos fixos em placa com meio completo. Após três dias de incubação, essa placa serviu de placa mestra que foi replicada para placas de análise através de um replicador de níquel-cromo. Com 24 , 48 e 72 horas de incubação efetuaram-se leituras das placas de análise, anotando-se as colônias que cresceram e as que não cresceram (AZEVEDO, 1973).

4 - RESULTADOS

4.1 - CRUZAMENTOS CONTROLE

Em primeiro lugar foram feitos cruzamentos controle para verificar se os genes supressores obtidos a partir da linhagem MSE por MIRANDA FILHO (1972) ainda se mantinham de forma estável nas mesmas. Também cruzamentos adicionais foram feitos com outras linhagens usadas no presente trabalho.

4.1.1 - RESULTADOS DE CRUZAMENTOS DE LINHAGENS COM SUPRESSORES E LINHAGEM pro A 1 ; paba A 6 ; yA 2

Foram cruzadas as linhagens MSE su ni B 8 com a linhagem pro A 1 ; paba A 6 ; y A 2 , para se observar a segregação nic⁺ : nic⁻

Tais cruzamentos tiveram a finalidade de confirmar os valores de ligação entre os genes supressores e o locus nic B 8 , obtidos por MIRANDA FILHO (1972). Os resultados encontram-se na Tabela 4.

4.1.2 - ANÁLISE MEIÓTICA

A linhagem pro A 1 ; paba A 6 ; y A 2 foi cruzada com as linhagens MSE (controle de linhagens portadoras de genes supressores). Os resultados da segregação meiótica foram obtidos por semeadura de uma amostra de ascósporos provenientes dos cruzamentos acima mencionados. Estes resultados são mostrados na Tabela 5.

4.1.3 - ANÁLISE MITÓTICA

Setores haploides foram isolados a partir de diplóides obtidos nos heterocários das linhagens MSE su nic B 8 com a linhagem pro A 1 ; paba A 6 ; yA 2 . Analisado mitoticamente, forneceram-se os resultados que constam na Tabela 6.

TABELA 4 - Resultados dos cruzamentos entre linhagens portadoras de genes supressores e a linhagem pro A1 ; paba A6 ; yA2

Cruzamentos	nic ⁺	nic ⁻	X ²	Valor de ligação
su 1 nic B8 x pro A1 ; paba A6 ; y A2	78	26	0,0000 ns	50,00%
su 2 nic B8 x pro A1 ; paba A6 ; y A2	86	18	3,2820 ns	34,61%
su 3 nic B8 x pro A1 ; paba A6 ; y A2	77	27	0,0513 ns	51,92%
su 4 nic B8 x pro A1 ; paba A6 ; y A2	85	19	2,5128 ns	36,54%
su 5 nic B8 x pro A1 ; paba A6 ; y A2	80	24	0,2051 ns	46,15%
su 8 nic B8 x pro A1 ; paba A6 ; y A2	76	28	0,2051 ns	53,84%
su 9 nic B8 x pro A1 ; paba A6 ; y A2	86	18	3,2820 ns	34,61%

(ns) Não significativo

TABELA 5 - Segregação meiôtica do cruzamento das linhagens supressoras com a linhagem pro A1 ; paba A6 ; yA2

Cruzamento <u>pro A1</u> ; <u>paba A6</u> ; <u>yA2</u> com:	Segregantes			Proporção esperada	χ^2
	Branco	Amarelo	Total		
MSE *	265	269	539	1:1	0,1503 n.s.
su 1 nic B8	387	375	762	1:1	0,1890 n.s.
su 2 nic B8	352	341	693	1:1	0,1746 n.s.
su 3 nic B8	215	245	460	1:1	1,9566 n.s.
su 4 nic B8	363	349	712	1:1	0,2752 n.s.
su 5 nic B8	236	260	496	1:1	1,2204 n.s.
su 8 nic B8	282	273	555	1:1	0,1458 n.s.
su 9 nic B8	347	311	658	1:1	1,9696 n.s.

(*) cruzamento controle

(ns) não significativo

TABELA 6 - Resultados da análise mitotótica de setores haplóides obtidos de diplóides MSE su nic B 8 // pro A 1 ; paba A 6 ; y A 2

Requerimento analisado	Supressor de nic 8 analisado		
	su 5	su 8	su 9
nic +	52	52	52
nic -	0	0	0

4.1.4 - CRUZAMENTO DA LINHAGEM MSE COM A LINHAGEM pro A 1 ; paba A 6 ; yA 2

Executado a título de controle em relação às linhagens supressoras, este cruzamento exibiu uma segregação meiótica na proporção de 1:1 para todas as marcas genéticas, o que ratifica plenamente a segregação esperada, não se obtendo significância alguma em relação a qualquer uma das marcas. Fica então perfeitamente caracterizado que em condições normais a segregação não se altera.

Os resultados encontram-se na Tabela 7.

TABELA 7 - Análise meiôtica do cruzamento da linhagem MSE com a linhagem pro A 1 ; paba A 6 ; yA 2

Segregantes analisados				
Grupos de ligação	Marcador	Número de colônias	Proporção esperada	χ^2
I	pro ⁺ paba ⁺	53	1:1	0,0385 n.s.
	pro paba	51		
II	w ⁺ w ⁺	56	1:1	0,6154 n.s.
	w w	48		
III	gal ⁺	44	1:1	2,4615 n.s.
	gal	60		
IV	pyro ⁺	55	1:1	0,3461 n.s.
	pyro	49		
V	fac ⁺	50	1:1	0,1538 n.s.
	fac	54		
VI	s ⁺ s ⁺	46	1:1	0,3846 n.s.
	s s	58		
VII	nic ⁺	54	1:1	0,1538 n.s.
	nic	50		
VIII	ribo ⁺	61	1:1	3,1154 n.s.
	ribo	43		

4.1.5 - RESULTADOS DE CRUZAMENTOS ENTRE A LINHAGEM y A 2 ; nic A 2 ; ribo D COM A LINHAGEM bi A 1 ; meth G 1

Foram cruzadas as linhagens bi A 1 ; meth G 1 com y A 2 ; nic A 2 ; ribo D 5 e os segregantes foram analisados quanto à capacidade de crescimento em meio de cultura com ácido nicotínico e em ausência dele. Os resultados podem ser observados na Tabela 8.

TABELA 8 - Resultados do cruzamento entre as linhagens
bi A 1 ; meth G 1 e y A 2 ; nic A 2 ; ribo D 5

Cruzamento	nic ⁺	nic ⁻	Proporção esperada
<u>y A 2</u> ; <u>nic A 2</u> ; <u>ribo D 5</u> x <u>bi A 1</u> ; <u>meth G 1</u>	39	39	1 : 1

4.1.6 - ANÁLISE DE HETEROCÁRIOS E DIPLÓIDES

Foram realizados heterocários entre as linhagens com supressores e a linhagem pyro A 4 ; nic B 8 , aqui designada tecnicamente de linhagem 33 , por ser o 33^o segregante de um cruzamento entre linhagens deficientes em ácido p-aminobenzóico e piridoxina, efetuado por BORDIGNON OLIVEIRA (1978).

Os resultados encontram-se na Tabela 9.

TABELA 9 - Heretocários e diplóides entre as linhagens com supressores e a linhagem 33

	Heterocários		Diplóides	
	nic ⁺	nic ⁻	nic ⁺	nic ⁻
su 1 // 33	+	+	+	+
su 2 // 33	+	+	+	+
su 3 // 33	+	+	+	+
su 4 // 33	+	+	+	+
su 5 // 33	+	+	+	+
su 6 // 33	+	+	+	+
su 8 // 33	+	+	+	+
su 9 // 33	+	+	+	+

4.2 - TESTES DE ESPECIFICIDADE

Para se observar a especificidade de ação supressora, as linhagens de *Aspergillus nidulans* portadoras de genes supressores do locus nic B 8, para deficiência em ácido nicotínico, foram cruzadas com a linhagem y A 2 ; nic A 2 ; ribo D 5 que apresenta o locus nic A 2 localizado no grupo de ligação V e não no grupo de ligação VII como o gene nic B 8.

Os supressores de nic B 8 poderiam suprimir ou não o efeito do mutante nic A 2. No caso de especificidade de ação, isto é, su nic B 8 não ser capaz de suprimir o mutante nic A 2, a proporção de 5 nic^- : 3 nic^+ é suficiente para explicar os resultados.

Esta hipótese foi testada e os dados obtidos en contram-se na Tabela 10.

TABELA 10 - Resultados dos cruzamentos entre as linhagens portadoras de genes supressores e a linhagem y A2 ; nic A2 ; ribo D 5

Cruzamentos	nic ⁺	nic ⁻	Proporção esperada	χ ²
su 1 nic B8 x y A2 ; nic A2 ; ribo D5	64	40	5 : 3	0,0410 ns
su 2 nic B8 x y A2 ; nic A2 ; ribo D5	60	44	5 : 3	1,0256 ns
su 3 nic B8 x y A2 ; nic A2 ; ribo D5	63	41	5 : 3	0,1640 ns
su 4 nic B8 x y A2 ; nic A2 ; ribo D5	61	43	5 : 3	0,6563 ns
su 5 nic B8 x y A2 ; nic A2 ; ribo D5	59	45	5 : 3	1,4768 ns
su 8 nic B8 x y A2 ; nic A2 ; ribo D5	64	40	5 : 3	0,0410 ns
su 9 nic B8 x y A2 ; nic A2 ; ribo D5	62	42	5 : 3	0,3693 ns

(ns) Não significativo

4.3 - CRUZAMENTOS DE LINHAGENS COM GENES SUPRESSORES E OUTRAS LINHAGENS

4.3.1 - CRUZAMENTOS DAS LINHAGENS COM GENES SUPRESSORES E A LINHAGEM pyro A 4 ; nic B 8

Estes cruzamentos foram realizados com a finalidade de se reunir numa mesma linhagem dois genes supressores do mutante nic B 8.

A linhagem pyro A 4 ; nic B 8 é a linhagem 33, anteriormente referida no ítem 4.1.6. Esta linhagem foi cruzada com as portadoras de genes supressores (su 1 , su 2 , su 4 , su 5 , su 8 e su 9). Do cruzamento entre su 8 x 33 , foi obtido o segregante nº 13 , que apresentava as marcas genéticas su 8 nic B 8 ; pyro A 4 ; paba A 6 . Na hipótese de se haver dois supressores na mesma linhagem, foram testadas as proporções esperadas de $6 \text{ nic}^+ : 2 \text{ nic}^-$ para o caso de haver manutenção do efeito de supressão e de $4 \text{ nic}^+ : 4 \text{ nic}^-$, caso dois supressores na mesma linhagem cancelassem mutuamente o efeito de supressão. Os resultados desses cruzamentos encontram-se na Tabela 11.

Do cruzamento entre su 3 nic B 8 e a linhagem pyro A 4 ; nic B 8 foram obtidos vários segregantes com o fenótipo nic⁺ por supressão.

TABELA 11 - Resultados de cruzamentos entre linhagens com genes supressores e o segregante 13 (su 8 nic B 8 ; pyro A 4 ; paba A 6)

Compostos	nic ⁺	nic ⁻	Total	Proporção esperada	χ^2	Proporção esperada	χ^2
su 1 x su 8 (13)	152	1	153	6:2	48,3661 *	4:4	149,2062 **
su 2 x su 8 (13)	117	45	162	6:2	0,6700 ns	4:4	32,0000 **
su 3 x su 8 (13)	130	0	130	6:2	43,3333 *	4:4	130,0000 **
su 4 x su 8 (13)	58	20	78	6:2	0,0042 ns	4:4	12,4482 **
su 5 x su 8 (13)	115	26	141	6:2	3,2400 ns	4:4	56,1774 **
su 9 x su 8 (13)	110	36	146	6:2	0,0145 ns	4:4	37,5068 **

(ns) Não significativo

(*) $P < 0,05$

(**) $P < 0,01$

O genótipo dos segregantes escolhidos foram os seguintes: 301: su 3 nic B 8 ; ribo B 8 ; s B 3 ; pyro A 4 ; ad E 20 ; 304: su 3 nic B 8 ; pyro A 4 ; paba A 6 ; 309: su 3 nic B 8 ; ribo B 8 ; pyro A 4 ; paba A 6 ; 315: su 3 nic B 8 ; ribo B 8 ; s B 3 ; pyro A 4 e 319: su 3 nic B 8 ; s B 3 ; pyro A 4 ; paba A 6.

A semelhança do que foi feito com o segregante 13 (su 8 nic B 8 ; pyro A 4 ; paba A 6) estas linhagens foram cruzadas com as demais linhagens contendo genes supressores (su 2 , su 4 , su 5 , su 8 e su 9).

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 12.

4.4 - ANÁLISE DOS SEGREGANTES QUE POSSIVELMENTE CONTINHAM DOIS SUPRESSORES PARA A MESMA DEFICIÊNCIA

Para se saber se a presença do dois supressores para a mesma deficiência, reunidos numa mesma linhagem mantinham efeito de supressão ou se cancelavam-se mutuamente, foram efetuadas séries de cruzamentos em que se escolhiam, ao acaso, colônias que exibiam fenótipo nic⁺ entre os segregantes dos cruzamentos cujos dados constam da Tabela 12.

As linhagens escolhidas foram cruzadas com a linhagem bi A 1 ; meth G 1, de coloração verde e fenótipo nic⁺. De tais cruzamentos foram escolhidos segregantes ao acaso e analisados quanto a prototrofia em relação ao ácido nicotínico.

Tais segregantes (que exibiam o fenótipo nic⁺) poderiam conter um ou dois genes supressores do mutante nic B 8.

A proporção de $6 \text{ nic}^+ : 2 \text{ nic}^-$ é suficiente para explicar a presença de um supressor nas linhagens testadas.

Para se tentar pesquisar a presença de dois supressores na mesma linhagem foram testadas as proporções de $7 \text{ nic}^+ : 1 \text{ nic}^-$ e $5 \text{ nic}^+ : 3 \text{ nic}^-$.

A proporção $7 \text{ nic}^+ : 1 \text{ nic}^-$ é suficiente para explicar a manutenção do efeito de supressão quando dois supressores para a mesma deficiência estão reunidos na mesma linhagem e $5 \text{ nic}^+ : 3 \text{ nic}^-$ quando esses dois supressores cancelam-se mutuamente.

Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 13 a 15.

TABELA 12 - Cruzamentos entre as linhagens su nic B 8 e segregante
su 3 nic B 8 x 33

Cruzamentos	nic ⁺	nic ⁻	Total	Proporção esperada	X ²	Proporção esperada	X ²
su 2 x su 3 (301)	76	28	104	6:2	0,2051 ns	4:4	22,1538 **
su 2 x su 3 (304)	75	29	104	6:2	0,4616 ns	4:4	20,3462 **
su 2 x su 3 (309)	88	16	104	6:2	5,1283 *	4:4	49,8462 **
su 4 x su 3 (304)	77	27	104	6:2	0,0153 ns	4:4	24,0384 **
su 4 x su 3 (309)	87	17	104	6:2	4,1539 *	4:4	47,1154 **
su 4 x su 3 (319)	88	16	104	6:2	5,1283 *	4:4	49,8462 **
su 5 x su 3 (304)	89	15	104	6:2	6,2051 *	4:4	52,6538 **
su 5 x su 3 (309)	78	26	104	6:2	0,0000 ns	4:4	26,0000 **
su 5 x su 3 (319)	82	22	104	6:2	0,8205 ns	4:4	34,6154 **
su 8 x su 3 (301)	102	2	104	6:2	29,5384 **	4:4	96,1538 **
su 8 x su 3 (304)	101	3	104	6:2	27,1283 **	4:4	92,3462 **
su 8 x su 3 (319)	103	1	104	6:2	32,0513 **	4:4	100,0384 **
su 9 x su 3 (301)	77	27	104	6:2	0,0513 ns	4:4	24,0384 **
su 9 x su 3 (304)	84	20	104	6:2	1,8461 ns	4:4	39,3846 **
su 9 x su 3 (315)	83	21	104	6:2	1,2820 ns	4:4	36,9616 **

(ns) não significativo

(*) P < 0,05

(**) P < 0,01

TABELA 13 - Cruzamentos entre os descendentes de su 2 x su 3 (301 e 304)
com bi A1 ; meth G1

Cruzamentos	nic ⁺	nic ⁻	Total	Proporções esperadas		
				6 : 2	7 : 1	5 : 3
				X ²	X ²	X ²
seg 2 x bi A1 ; meth G1	96	8	104	16,6153 **	2,1978 ns	39,4256 **
seg 3 x bi A1 ; meth G1	96	8	104	16,6153 **	2,1978 ns	39,4256 **
seg 5 x bi A1 ; meth G1	98	6	104	20,5128 **	2,1978 ns	44,6769 **
seg 8 x bi A1 ; meth G1	97	7	104	18,5128 **	3,1648 ns	42,0102 **
seg 14 x bi A1 ; meth G1	97	7	104	18,5128 **	3,1648 ns	42,0102 **
seg 15 x bi A1 ; meth G1	98	6	104	20,5128 **	4,3077 *	44,6769 **
seg 20 x bi A1 ; meth G1	96	8	104	16,6153 **	2,1978 ns	39,4256 **
seg 25 x bi A1 ; meth G1	98	6	104	20,5128 **	2,1978 ns	44,6769 **

(ns) não significativo

(*) P < 0,05

(**) P < 0,01

TABELA 14 - Cruzamentos entre os descendentes de su 5 x su 3 (304 e 319) com bi A1 ; meth G1

Cruzamentos	nic ⁺	nic ⁻	Total	Proporções esperadas			
				6 : 2	7 : 1	5 : 3	X ²
				X ²	X ²	X ²	
seg 1 x bi A1 ; meth G1	95	9	104	14,8205 **	1,4066 ns	36,9231 **	
seg 4 x bi A1 ; meth G1	100	4	104	24,8205 **	7,1209 **	50,2565 **	
seg 7 x bi A1 ; meth G1	96	8	104	16,6153 **	2,1978 ns	39,4256 **	
seg 11 x bi A1 ; meth G1	93	11	104	11,5384 **	0,3517 ns	32,1641 **	
seg 13 x bi A1 ; meth G1	97	7	104	18,5128 **	3,1648 ns	42,0102 **	
seg 21 x bi A1 ; meth G1	92	12	104	10,0513 **	0,0878 ns	29,9077 **	
seg 23 x bi A1 ; meth G1	89	15	104	6,2051 *	0,3517 ns	23,6307 **	
seg 26 x bi A1 ; meth G1	97	7	104	18,5128 **	3,1648 ns	42,0102 **	

(ns) não significativo

(*) P < 0,05

(**) P < 0,01

TABELA 15 - Cruzamentos entre os descendentes de su 8 x su 3 (304 e 309) com bi A1 ; meth G1

Cruzamentos	nic ⁺	nic ⁻	Total	Proporções esperadas			
				6 : 2	7 : 1	5 : 3	X ²
				X ²	X ²	X ²	
seg 1 x bi A1 ; meth G1	99	5	104	22,6153 **	5,6264 *	47,4256 **	
seg 2 x bi A1 ; meth G1	94	10	104	13,1283 **	0,7912 ns	34,5026 **	
seg 5 x bi A1 ; meth G1	95	9	104	14,8205 **	1,4066 ns	36,9231 **	
seg 5 x bi A1 ; meth G1	94	10	104	13,1283 **	0,7912 ns	34,5026 **	
seg 8 x bi A1 ; meth G1	100	4	104	24,8205 **	7,1209 ns	50,2565 **	
seg 9 x bi A1 ; meth G1	91	13	104	15,1667 **	0,0000 ns	27,7333 **	
seg 14 x bi A1 ; meth G1	97	7	104	18,5128 **	3,1648 ns	42,0102 **	
seg 16 x bi A1 ; meth G1	96	8	104	16,6153 **	2,1978 ns	39,4256 **	

(ns) não significativo

(*) P < 0,05

(**) P < 0,01

4.5 - HETEROCÁRIOS E DIPLÓIDES ENTRE LINHAGENS PROVAVELMENTE PORTADORAS DE DOIS GENES SUPRESSORES E A LINHAGEM MSE

Foram realizados heterocários e diplóides entre as linhagens segregantes dos cruzamentos que envolveram linhagens com genes supressores e as linhagens nic⁺ resultantes dos cruzamentos entre as linhagens com provavelmente dois supressores MSE e a linhagem. Todas essas linhagens apresentaram o fenótipo nic⁺ por supressão e provavelmente algumas delas (escolhidas ao acaso) apresentavam dois supressores para a mesma deficiência.

Os heterocários e diploides foram testados quanto a prototrofia para ácido nicotínico e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 16.

TABELA 16 - Heterocários e diplóides entre linhagens provavelmente portadoras de dois genes supressores e a linhagem MSE

	Heterocários		Diplóides	
	nic ⁺	nic ⁻	nic ⁺	nic ⁻
su 2 x su 3 (301)				
seg 2 // MSE	+	+	+	+
seg 3 // MSE	+	+	+	+
seg 14 // MSE	+	+	+	+
seg 25 // MSE	+	+	+	+
su 2 x su 3 (304)				
seg 5 // MSE	+	+	+	+
seg 8 // MSE	+	+	+	+
seg 15 // MSE	+	+	+	+
seg 20 33 mse	+	+	+	+
su 5 x su 3 (304)				
seg 1 // MSE	+	+	+	+
seg 11 // MSE	+	+	+	+
seg 21 // MSE	+	+	+	+
seg 23 // MSE	+	+	+	+
su 5 x su 3 (319)				
seg 4 // MSE	+	+	+	+
seg 7 // MSE	+	+	+	+
seg 13 // MSE	+	+	+	+
seg 26 // MSE	+	+	+	+

continua ...

TABELA 16 - Continuação

	Heterocários		Diplóides	
	nic ⁺	nic ⁻	nic ⁺	nic ⁻
su 8 x su 3 (304)				
seg 5 // MSE	+	+	+	+
seg 8 // MSE	+	+	+	+
seg 14 // MSE	+	+	+	+
seg 16 // MSE	+	+	+	+
su 8 x su 3 (304)				
seg 1 // MSE	+	+	+	+
seg 3 // MSE	+	+	+	+
seg 5 // MSE	+	+	+	+
seg 9 // MSE	+	+	+	+

5 - DISCUSSÃO

5.1 - CRUZAMENTOS CONTROLE

Os cruzamentos controle realizados entre as linhagens contendo genes supressores e a linhagem pro A 1 ; pa-ba A 6 ; yA 2 tiveram as finalidade de confirmar os valores de ligação entre os genes supressores e o gene nic B 8 que MIRANDA FILHO (1972) obteve em seu trabalho. Da análise dos resultados da Tabela 4 podemos observar que os genes su 1 , su 3 , su 5 e su 8 são distais em relação ao gene nic B 8 ao passo que os genes su 2 , su 4 e su 9 são proximais, o que vem a confirmar plenamente os resultados obtidos por MIRANDA FILHO (1972). Observou também esse autor que deveriam existir pelo menos quatro loci supressores, dos quais dois continham alelos múltiplos. Os genes su 1 e su 3 foram mapeados num locus e

su 2 , su 4 e su 9 noutro. Em nossos resultados os valores de ligação entre os genes supressores analisados e o gene nic B 8 também confirmam os dados do referido autor.

MIRANDA FILHO (1972) observou que todos os supressores em estudo estavam localizados no mesmo grupo de ligação, o grupo VII, o que encerra o gene nic B 8. Os resultados mostrados na Tabela 6 , relacionados à análise mitótica de setores haplóides isolados a partir de diplóides obtidos nos heterocários das linhagens MSE su nic B 8 com a linhagem pro A 1 ; paba A 6 : yA 2 confirmam o fato de os genes supressores estarem localizados no mesmo grupo de ligação que contém o gene nic B 8.

— MONTEIRO (1979) por sua vez, isolou mais sete supressores do mutante nic B 8 e observou que somente dois deles foram localizados no grupo de ligação VII. Dos demais genes isolados, dois foram localizados no grupo IV e um no grupo VI.

A análise meiótica dos cruzamentos entre a linhagem MSE , e linhagens portadoras de genes supressores com a linhagem pro A 1 ; paba A 6 ; yA 2 cujos resultados podem ser observados na Tabela 5 revela que a coloração das colônias é herdada independente dos genes supressores. Da mesma maneira, a Tabela 7 apresenta a segregação de cada gene marcador. Todas as segregações mostraram ocorrer na proporção mendeliana simples de 1:1 , confirmada pelo teste de χ^2 .

Os resultados obtidos com o cruzamento das linhagens bi A 1 ; meth G 1 e yA 2 ; nic A 2 ; ribo D 5 observados na Tabela 8 mostram que os alelos que conferem prototrofia e auxotrofia para ácido nicotínico segregam na proporção mendeliana de 1 : 1.

Também como controle foram realizados heterocáries e diplóides entre as linhagens com genes supressores e a linhagem pyro A 4 ; nic B 8. Heterocáries e diploides têm a finalidade de se avaliar a interação gênica quanto a dominância e recessividade dos genes em estudo, porém os resultados da Tabela 9 nos mostram que tanto heterocáries quando diplóides efetuados entre as linhagens acima referidas foram eficientes em crescer tanto em presença quanto em ausência de ácido nicotínico.

5.2 - TESTES DE ESPECIFICIDADE

A ação de especificidade gênica dos supressores em estudo, relativos ao gene nic B 8 , foi ensaiada em relação ao gene nic A 2 .

Como já foi observado o gene nic B 8 e seus supressores foram localizados no grupo de ligação VII e o gene nic A 2 foi mapeado no grupo de ligação V. Os supressores de nic B 8 poderiam suprimir o mutante nic A 2 se apresentassem uma ação não específica e para tanto a proporção de 1 nic^+ : 1

nic^- seria suficiente para explicar os resultados. Da mesma maneira, se apresetassem uma ação específica de supressão, isto é, su nic B 8 su seria eficiente em suprimir o mutante nic B 8 , a proporção de 5 nic^- : 3 nic^+ seria apropriada para explicar os resultados.

Os resultados mostrados na Tabela 10 indicam que os supressores do mutante nic B 8 foram incapazes de suprimir o mutante nic A 2 . A proporção esperada de 5 nic^- : 3 nic^+ foi apropriada para explicar os resultados obtidos, confirmada pelo teste de χ^2 .

Podemos sugerir que, de acordo com os resultados obtidos, os genes supressores em estudo do mutante nic B 8 são específicos em sua ação e não suprimem o mutante nic A 2 .

Resultados semelhantes foram encontrados por TODD e CASSELTON (1973) ao verificarem que em *Coprinus* os genes acu-1 su^+ são específicos em sua ação.

Observaram também que esses genes supressores, apresentam três propriedades que predizem ser supressores do tipo "missense" que especificam tipos de tRNA modificados com especificidades de codon alteradas. As mutações "missense" são conseguidas por transições ou transversões de bases na cadeia de DNA de modo a se alterar somente um aminoácido na cadeia protéica. A primeira dessas propriedades é que são alelo-específicos, isto é, o gene su^+ que suprime um alelo não consegue suprimir outro alelo testado. Segundo, quando qualquer

gene su⁺ é colocado em heterozigose num heterocário ou diplóide, o efeito de supressão não se expressa ou se expressa de maneira tão fraca que parece ser recessivo. Terceiro, quando dois genes su⁺ diferentes são colocados num duplo heterozigoto, o efeito de supressão é mantido. A alelo-especificidade é típica de supressores "missense".

BAL e colaboradores (1979) também observaram que em *Aspergillus nidulans* que os supressores do mutante ad A 24 eram alelo-específicos porém eram locus não específicos e que são supressores do tipo "nonsense".

Dados semelhantes de supressores que mostraram ação não específica de supressão foram conseguidos por SHAH - RIARI e CASSELTON (1973) em *Coprinus*. Estudando a mutação met 1 observaram que podia ser suprimida por cinco genes supressores recessivos diferentes.

A especificidade ou não de genes supressores está relacionada ao metabolismo da característica em estudo.

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem sugerir que os mutantes nic B 8 e nic A 2 têm diferentes papéis quanto ao metabolismo do ácido nicotínico em *Aspergillus nidulans*.

5.3 - COMPORTAMENTO DE DOIS SUPRESSORES REUNIDOS NA MESMA LINHAGEM

Foram efetuadas séries de cruzamentos entre linhagens contendo genes supressores para a mesma deficiência na tentativa de se reunir dois deles na mesma linhagem.

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos dos cruzamentos entre linhagens com genes supressores e o segregante 13 cujo genótipo é su 8 nic B 8 ; pyro A 4 ; paba A 6 .

Foram testadas duas proporções na hipótese de se haver dois supressores para a mesma deficiência reunidos numa única linhagem. A proporção de $6 \text{ nic}^+ : 2 \text{ nic}^-$ seria apropriada para explicar a manutenção do efeito de supressão enquanto que $4 \text{ nic}^+ : 4 \text{ nic}^-$ explicaria o efeito de cancelamento mútuo da supressão.

Da análise dos resultados obtidos podemos concluir que a proporção de $6 : 2$ é a que explica a maior parte dos cruzamentos, tendo seus resultados confirmados pelo teste de χ^2 . Os únicos dois resultados que mostraram χ^2 significativo foram os cruzamentos que envolveram os supressores su 1 e su 3 que são alelos múltiplos e que pelo fato de estarem mapeados muito próximos ao gene su 8 (ligados) teriam sua recombinação dificultada. Por outro lado, o número de colônias analisadas (153) era insuficiente para que surgissem entre elas os recombinantes desejados.

Podemos observar também que a proporção 4 : 4 testada apresenta χ^2 significativa ($P < 0,01$) em todos os cruzamentos analisados.

Estes resultados sugerem que, para o mutante nic B 8, a presença de dois supressores na mesma linhagem leva à manutenção do efeito de supressão.

Outros cruzamentos foram então efetuados para se verificar se realmente esse fenômeno se mantinha, ou seja, dois supressores para deficiência em ácido nicotínico, mantinham seu efeito de supressão quando reunidos na mesma linhagem.

Os resultados da Tabela 12 são semelhantes aos da Tabela 11. Alguns dos resultados dos testes da proporção 6 : 2 que envolveram o su 2 e su 4 mostraram χ^2 significativo a nível de 5% porém não significativos ao nível de 1% e poderiam ser explicados por alguma interferência na recombinação desses genes já que não estão ligados.

O fato de os resultados de testes que envolveram os supressores su 3 e su 8 terem dado resultados de χ^2 significativos podem ser perfeitamente explicados por ausências de permutas entre esses supressores, visto estarem ligados.

Podemos observar também que para a proporção de 4 : 4 os resultados todos dos testes de χ^2 foram significativos a nível de 1%.

Estes resultados nos permitem novamente sugerir o efeito de manutenção de ação de supressão quando dois supressores para uma dada deficiência estão reunidos na mesma linhagem.

Para se pesquisar, então, a presença de dois supressores numa mesma linhagem entre os segretantes que exibiam fenótipo nic⁺ dos cruzamentos cujos dados constam da Tabela 12 foram cruzados com a linhagem bi A 1 ; meth G 1 (de fenótipo nic⁺).

Três proporções foram então testadas. A proporção 6 nic⁺ : 2 nic⁻ é apropriada para pesquisar a presença de um supressor nas linhagens testadas. A proporção 7 nic⁺ : 1 nic⁻ é apropriada para explicar a manutenção do efeito de supressão quando dois supressores estão reunidos na mesma linhagem e a proporção 5 nic⁺ : 3 nic⁻ quando esses dois supressores cancelam-se mutuamente.

Os resultados mostrados pelas Tabelas 13, 14 e 15 ressaltam que a proporção 7 nic⁺ : 1 nic⁻ apresentou resultados de χ^2 não significativos em quase todos os cruzamentos. As excessões poderiam ser explicadas por algum problema de recombinação como nos casos dos segregantes 15 da Tabela 13 ; 4 da Tabela 14 e 1 da Tabela 15 que foram significativos para as três proporções testadas (genes ligados).

Os resultados dos testes que envolveram a proporção 6 : 2 apresentaram χ^2 significativo em todos os casos

analisados, assim como a proporção 5 : 3. No entanto para as Tabelas 14 e 15 que envolvem os supressores su 5 e su 8 respectivamente tais resultados podem ser explicados devido ao fato de esses supressores serem ligados ao supressor su 3.

Todavia os resultados sugerem a manutenção do efeito de supressão quando dois supressores para a mesma deficiência estão reunidos numa linhagem.

Tais não foram os resultados de GILMORE (1967) que observou que a reunião de dois supressores para a mesma deficiência em uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* produzia células aberrantes e de crescimento retardado.

TODD e CASSELTON (1973) observaram que em *Coprinus* havia infertilidade nos cruzamentos entre linhagens portadoras de genes supressores para a mesma deficiência. O mesmo fenômeno foi observado por SEALY-LEWIS e CASSELTON (1977), estudando supressores do gene met em *Coprinus*.

BAL e colaboradores (1979) estudando os supressores para a deficiência em adenina em *Aspergillus nidulans* também não tiveram sucesso em cruzar linhagens contendo dois supressores.

Em nossos experimentos sugerimos o efeito de manutenção de supressão, embora se tenha necessitado efetuar dezenas de cruzamentos até se conseguir resultados satisfatórios. Pudemos notar que a presença de um gene supressor tende a diminuir a fertilidade dos cruzamentos. Porém, estudos ainda

devem ser efetuados para que se venha confirmar a hipótese.

Foram também realizados heterocários e diplóides entre as linhagens provavelmente portadoras de dois genes supressores e a linhagem MSE. Os resultados obtidos e mostrados na Tabela 16 evidenciam que tanto heterocários quanto diplóides cresceram em ausência de ácido nicotínico e que provavelmente alguns dos segregantes continham dois supressores, reunidos na mesma linhagem e mantido o efeito de supressão.

5.4 - O MECANISMO DE AÇÃO DOS SUPRESSORES

O mecanismo de regulação da ação gênica conhecido por "sistema de regulação em cascata" proposto por PONTECORVO (1963), foi sugerido por MIRANDA FILHO (1972) e AZEVEDO (1974) para explicar o modo de ação dos genes supressores nic B8 das linhagens utilizadas neste trabalho. O mesmo sistema foi utilizado por MENEZES (1974), citada por MONTEIRO (1979), para explicar o modo de ação dos genes supressores de variantes deteriorados em *Aspergillus nidulans*.

Neste sistema de regulação, dois repressores estão envolvidos como reguladores da ação gênica. Nas linhagens selvagens, um dos repressores, designado repressor R_2 , tem a capacidade de interagir com os genes estruturais impedindo-os de produzirem mRNA que conduz a síntese de proteínas. O outro repressor, designado R_1 , interfere com a ação do repressor R_2 bloqueando sua ação e portanto incorrendo no funcionamento normal dos genes estruturais. Segundo MIRANDA FILHO (1972) o mutante nic B8 corresponderia a uma mutação no locus responsável pela produção do repressor R_1 e os supressores seriam mutações nos loci responsáveis pela produção dos repressores R_2 . A mutação supressora no repressor R_2 impede-o de produzir o repressor, havendo consequente transcrição normal do mRNA e, portanto, produção de proteínas.

Uma representação esquemática desse sistema é apresentado na Figura 2.

FIGURA 2 - Sistema de regulação em cascata (PONTECORVO, 1963)

MONTEIRO (1979) sugere um sistema alternativo do sistema proposto por MIRANDA FILHO e AZEVEDO (1974) para explicar a ação de genes supressores do mutante nic B8. Neste sistema proposto, o produto gênico do supressor atua como co-repressor que, juntamente com o repressor produzido pelo locus R_1 de síntese de ácido nicotínico, formam um complexo repressor que bloqueia a ação dos genes estruturais. Vários supressores nic B8 evidenciaram capacidade de interferir no mecanismo de síntese do tiosulfato de sódio, quer seja positivamente, quer seja negativamente.

A Figura 3 ilustra este aspecto.

- Extraído de MONTEIRO (1979)

FIGURA 3 - Sistema alternativo de regulação em cascata

Os nossos resultados podem ser perfeitamente explicados pelo sistema de regulação em cascata proposto por PON

TECORVO (1963) e utilizado por MIRANDA FILHO e AZEVEDO (1974) para explicar a ação dos supressores do mutante nic B8.

TODD e CASSELTON (1973) postulam que a manutenção do efeito de supressão quando dois supressores para a mesma deficiência são reunidos na mesma linhagem é uma das características de supressores missense. Trabalhando com os mutantes acu I de *Coprinus* que leva à incapacidade de crescimento em acetato como única fonte de carbono, observam que o mecanismo de supressão desses genes está relacionado a tipos modificados de tRNA, isto é, alterando a especificidade do codon. A mutação poderia ocorrer no gene estrutural que codifica o tRNA ou poderia ocorrer noutro gene e levá-lo a perda de função de algumas enzimas que modifica o tRNA.

CASSELTON e SHAHRIARI (1975) observaram que a ação dos supressores do mutante met-1-1 em *Coprinus* também está relacionada a alterações no tRNA.

CASSELTON (1979, comunicação pessoal) sugere que a ação dos supressores do mutante nic B8 também deve estar relacionada a estruturas alteradas de moléculas de tRNA.

Da análise de nossos dados podemos propor a hipótese de que os supressores do mutante nic B8 sejam do tipo missense e que envolvam ação de tRNA. Estas alterações poderiam ser tanto nos genes estruturais que codificam esses tRNA bem como a nível de transcrição ou tradução da informação genética.

A reunião de dois supressores para a mesma deficiência na mesma linhagem não envolveria competição de tRNA de modo que a ação supressão seria mantida.

A reunião das hipóteses da regulação em cascata e da que envolve tRNA alterados seria uma tentativa a mais de se explicar o modo de ação de genes supressores do mutante nic B8.

É óbvio que estudos mais acurados desses aspectos e novos estudos envolvendo o mecanismo de ação gênica além de trazer novos tópicos para estudos trarão também novas luzes sobre os mecanismos de ação da supressão gênica e a somatória do conhecimento acumulado tem sido o substrato do desenvolvimento da Genética e da Biologia em geral.

6 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho e que foram objeto de discussão no item anterior proporcionaram uma série de informações dadas a seguir:

- a - Os genes supressores do mutante nic B8 analisados neste trabalho mostraram-se específicos na sua ação de supressão. Isto quer dizer que são gene-específicos e foram incapazes de suprimir o mutante nic A2.
- b - A reunião de dois supressores para a mesma deficiência em uma única linhagem sugere manter o efeito de supressão.
- c - O efeito de manutenção da ação de supressão quando dois supressores para a mesma deficiência são reunidos numa mesma linhagem é típico de supressores "missense" e sugerimos que os genes supressores do mutante nic B8 das linhagens utilizadas neste trabalho sejam supressores "missense".

- d - O modo de ação dos supressores, relacionados com o mecanismo da regulação da síntese de ácido nicotínico, foi explicado com base no sistema de regulação em cascata proposto por PONTECORVO (1963) bem como foi sugerida a hipótese de, além da regulação em cascata, estejam envolvidos também tRNA de estrutura alterada. Estas alterações poderiam ocorrer tanto nos genes estruturais que codificam essas tRNA como a nível de transcrição ou tradução da informação genética.

7 - LITERATURA CITADA

- APIRION, D., 1962. A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice-versa in microorganisms. Nature, (London), 195: 959-961.
- AYLING, P. D., 1969. Methionine suppressors in *Aspergillus nidulans*: their genetics and behaviour in heterokaryons and diploids. Genetical Research (Camb.), 14: 275-289.
- AZEVEDO, J. L., 1973. Isolamentos de mutantes auxotróficos em fungos. In: AZEVEDO, J. L. e S. O. P. DA COSTA, ed. Exercícios Práticos de Genética São Paulo, Companhia Editora Nacional, 288 p.
- AZEVEDO, J. L. ; A. OLIVEIRA e A. J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. Summa Phytopathologica, 2: 237-241.

- AZEVEDO, J. L. e E. P. SANTANA, 1975. The use of chloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. Aspergillus News Letter, 13: 6.
- BARACHO, I. R. ; R. VENCovsky e J. L. AZEVEDO, 1970. Correlation between size and hybrid and selfed state of cleistothecia in *Aspergillus nidulans*. Transactions of the British Mycological Society, 54(1): 109-116.
- BAYLISS, F. T. e R. T. VINOPAL, 1971. Selection of ribosomal mutants by antibiotic suppression in yeast. Science, 174: 1339-1341.
- BERG, P. ; C. YANOFsky e J. CARBON, 1967. Missense suppression do to a genetically altered RNA. Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology, 31: 487-497.
- BISWAS, D. K. e L. GORINI, 1972. Restriction, de-restriction and mistranslation in missense suppression. Ribosomal discrimination of transfer RNA. Journal of Molecular Biology, 64: 119-134.
- BONNER, D. M., 1951. Gene-enzyme relationship in *Neurospora*. Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology, 16: 143-157.
- BORDIGNON OLIVEIRA, L. M. M., 1978. Resistência à arginina em linhagens deficientes para a síntese de lisina em *Aspergillus nidulans*. Dissertação apresentada a ESALQ/USP para obtenção do título de Mestre. 116 p. Piracicaba, São Paulo.

- BRENNER, S. e J. R. BECKWITH, 1965. Ochre mutants, a new class of suppressible nonsense mutants. Journal of Molecular Biology, 13: 629-637.
- BRODY, S. e C. YANOFSKY, 1963. Suppressor gene alteration of protein primary structure. Proceeding of National Academy of Sciences. USA, 50: 9-16.
- CAMPBELL, A., 1963. Fine structure genetics and its relation to function. Annual Review of Microbiology, 17: 49-60.
- CARBON, J. ; P. BERG e C. YANOFSKY, 1966. Studies on Missense suppression of the tryptophan synthetase A: protein mutant A36. Proceedings of National Academy of Sciences, USA, 56: 764-771.
- CARBON, J. e J. B. CURRY, 1968. Genetically and chemically derived missense suppression transfer RNAs with altered enzymic aminoacylation rates. Journal of Molecular Biology, 38: 201-216.
- CASSELTON, L. A., 1971. Suppressor genes. Science Progress (Oxford), 59: 143-160.
- CASSELTON, L. A. e H. SEALY LEWIS, 1976. Restoration of enzyme activity by recessive suppressor gene mutation in *Coprinus*. Heredity, 37(1): 154-155.
- CASSELTON, L. A. e H. SHAHRIARI, 1973. Complementation and allele specificity as tests of suppressor gene mechanisms in a fungus. Genetics, 74(2): 39.

- CASSELTON, L. A. e H. SHAHRIARI, 1975. Suppression of methionine mutants in *Coprinus*. II functional suppressors of methionine mutations. Molecular and General Genetics, 138(1): 33-40.
- CHALMERS, Jr. J. H. e T. W. SEAK, 1971. Supersuppressible mutants in *Neurospora* : mutants at the tryp 1 and tryp 2 loci affecting the structure of multienzyme complex in the tryptophan pathway. Genetics, 67: 353-363.
- CHANG, T. S., 1972. Genetic studies of a dome mutant and its suppressor gene in *Schizophyllum commune*. Australian Journal of Biological Science, 25(4): 757-764.
- CHILDS, J. D., 1967. Genetic analyses of suppressors of methionine mutants of *Salmonella typhimurium*. Heredity, 22: 425-434.
- CLUBERTSON, M. R. ; L. CHARNAS ; M. T. JONHSON e G. R. FINK, 1977. Frameshift and frameshifts suppressors in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 86(4): 745-764.
- CLUTTERBUCK, A. J., 1973. Gene symbols in *Aspergillus nidulans*. Genetical Research (Camb.), 21: 291-296.
- CLUTTERBUCK, A. J., 1974. *Aspergillus nidulans*. In: KING, R. C. , ed. Handbook of Genetics. New York and London , Plenum Press, I: 447-510.
- COPPIN - RAYNAL, E., 1977. Ribosomal suppressors and antisuppressors in *Podospira anserina*. Resistance to cycloheximide. Journal of Bacteriology, 131(3): 876-883.

- COX, B. S., 1971. A recessive lethal super-suppressor mutation in yeast and other psi phenomena. Heredity, 26: 211-232.
- COX, B. S., 1977. Allosuppressors in yeast. Genetical Research (Camb.), 30(2): 187-206.
- CRICK, F. H. C. ; L. BARNETT ; S. BRENNER e R. J. WATTS-TOBIN, 1961. General nature of the genetic code for proteins. Nature (London), 192: 1227-1232.
- DAVIS, R. H., 1961. Suppression of pyrimidine 3 mutants of *Neurospora* and its relation to arginine synthesis. Science, 134: 470-471.
- DAVIS, R. H., 1962. Consequences of a suppressor gene effective with pyrimidine and proline mutants of *Neurospora*. Genetics, 47: 351-360.
- DORN, G. L., 1967. A revised map of the eight linkage group of *Aspergillus nidulans*. Genetics, 56: 619-620.
- ELSEVIERS, D. e L. GORINI, 1975. Direct selection of mutants restricting efficiency of suppression and misreading levels in *Escherichia coli* B. Molecular and General Genetics, 137: 277-287.
- ESSER, K. e U. STAHL, 1973. Monokaryotic fruiting in the basidiomycete *Polyporus ciliatus* and its suppression by incompatibility factors. Nature, 244(5414): 304-305.

- FARMER, J. L., 1977. An allele-specific suppressor of white-coral in *Drosophila melanogaster*. Heredity, 39(2): 297-303.
- GAJEWSKI, W. e J. LITWINSKA, 1968. Methionine loci and their suppressors in *Aspergillus nidulans*. Aspergillus News Letter, 8: 9-10.
- GARVIN, R. T. e I. GORINI, 1975. A new gene for ribossomal restriction in *Escherichia coli*. Molecular and General Genetics, 137: 73-78.
- GILES, N. H., 1951. Studies on the mechanism of reversion in biochemical mutants of *Neurospora*. Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology, 16: 283-313.
- GILES, N. H. e C. W. H. PARTRIDGE, 1953. The effect of a suppressor on allelic inositolless mutant in *Neurospora crassa*. Proceeding of National Academy of Sciences, USA, 39: 479-488.
- GIRARD, J. e J. L. ROSSIGNOL, 1974. The suppression of gene conversion and intragenic crossing-over in *Ascobolus immer sus*: evidence for modifiers acting in the heterozygous state. Genetics, 76(2): 221-243.
- GORINI, L., 1970. Informational Suppression. Annual Review of Genetics, 4: 107-134.
- GORINI, L., 1973. The role of the ribosome in controlling translational fidelity. Heredity, 31(10): 420.

- GORINI, L., 1974. Streptomycin and misreading of the genetic code. Ribosomes. Cold Spring Harbour Laboratory, pp. 791.
- GORINI, L. e J. R. BECKWITH, 1966. Suppression. Annual Review of Microbiology, 20: 401-422.
- GUPTA, N. K. e H. G. KHORANA, 1966. Missense suppression of the tryptophan synthetase A - protein mutant A-78. Proceedings of National Academy of Sciences, USA, 56: 772-779.
- HARTMAN, P. E. e J. R. ROTH, 1973. Mechanisms of suppression. In: CASPARI, E. W., ed. Advances in Genetics, 17: 1-105.
- HAWTHORNE, D. E. e U. LEUPOLD, 1974. Suppressors in yeast. Current Topics in Microbiology and Immunology, 64: 1-49.
- HILL, C. W. ; J. FOULDS ; L. SOLL e P. BERG, 1969. Instability of a missense suppressor resulting from a duplication of genetic material. Journal of Molecular Biology, 39: 563-581.
- HOULAHAN, M. B. e H. K. MITCHELL, 1947. A suppressor in *Neurospora* and its use as evidence for allelism. Proceedings of National Academy of Sciences, USA, 33: 223-229.
- HOWARTH, S., 1958. Suppressor mutations in some cystine requiring mutants of *Salmonella typhimurium*. Genetics, 43: 404-418.

- KÄFER, E., 1961. The presence of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. Genetics, 46: 1581-1609.
- KOHOUT, J. e H. BERTRAND, 1976. Nuclear suppressors of the "poKy" cytoplasmic mutant in *Neurospora crassa*. I. Genetics and respiratory properties. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 18(2): 311-324.
- KOLTIN, Y. e P. R. DAY, 1976. Suppression of the Killer phenotype in *Ustilago maydis*. Genetics, 82(4): 629-637.
- LEIN, J. e P. S. LEIN, 1952. Studies on a suppressor of non-allelic acetate - requirement mutants of *Neurospora*. Proceedings of National Academy of Sciences, USA, 38: 44-48.
- LEWIS, S., 1961. Genetic analysis of methionine suppressors in *Coprinus lagopus*. Genetical Research (Camb.), 2: 141-155.
- LEWIS, D. e L. A. CASSELTON, 1975. Missense suppression in *Coprinus lagopus* associated with a chromosome duplication. Journal of General Microbiology, 88(1): 20-26
- LILLY, J. L., 1963. A possible technique for the simultaneous measurement of forward mutation rate in several cistrons. Aspergillus News Letter, 4: 18.
- McCREADY, S. e B. COX, 1973. Antisuppressors in yeast. Molecular and General Genetics, 124(4): 305-320.
- McCREADY, S. e B. COX, 1976. Suppressor-specificity of anti-suppressors in yeast. Genetical Research (Camb.), 28(2): 129-138.

- MCCULLY, K. S. e E. FORBES, 1965. The use of p-fluorophenyl alanine with "master strain" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. Genetical Research (Camb.), 6: 352-359.
- MILLS, D. I. e A. H. ELLINGBOE, 1969. The induction and characterization of recessive suppressor of arg-2 in *Schizosaccharomyces pombe*. Molecular and General Genetics, 104: 313-320.
- MITCHELL, I. G. e E. A. BEVAN, 1974. Suppressors of "blue" mutations in yeast. Genetical Research (Camb.), 23: 37-45.
- MITCHELL, M. B. e H. K. MITCHELL, 1952. Observation on the behaviour of suppressors in *Neurospora*. Proceedings of National Academy of Sciences, USA, 38: 205-214.
- MIRANDA FILHO, J. B., 1972. Supressores do mutante nic 8 em *Aspergillus nidulans*. Dissertação apresentada à ESALQ/USP para obtenção do título de Mestre. 83 p. Piracicaba, S. Paulo.
- MIRANDA FILHO, J. B. e J. L. AZEVEDO, 1974. Nicotinic acid suppressors in *Aspergillus nidulans*. Experientia (Basel) 30(4): 356-358.
- MONTEIRO, A. C., 1979. Isolamento e caracterização genética de supressores do mutante nic B8 em *Aspergillus nidulans*. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre, 145 p. Piracicaba, S. Paulo.

- MORGAN, D. H., 1966. Suppression of "purple" in *Coprinus lae-gopus* - an anomalous genetic situation. Genetical Research (Camb.), 7: 195-206.
- NEWCOMBE, K. D. e A. J. F. GRIFFITHS, 1973. The suppression of ad - 3 B mutants by supersuppressors in *Neurospora crassa*. Genetics, 75: 615-622.
- PICARD, M., 1973. Genetic evidence for a polycistronic unit of transcription in the complex locus 14 in *Podospora anserina*: II. Genetic analysis of informational suppressors. Genetical Research, 21(1): 1-15.
- PICARD-BENNOUN, M., 1976. Genetic evidence for ribosomal anti-suppressors in *Podospora anserina*. Molecular and General Genetics, 147(3): 299-306.
- PIOTROWSKA, M. ; M. SAVICKI e P. WEGLENSKI, 1969. Mutants of the arginine-proline pathway in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 55: 301-305.
- PONTECORVO, G., 1963. Microbial genetics retrospect and prospect. Proceedings of the Royal Society of Biology, 158: 123-146.
- PONTECORVO, G. ; J. A. ROPER ; L. M. HEMMONS ; K. D. MACDONALD e A. W. J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, 5: 141-238.
- REISSIG, J. L., 1963.a. Induction of forward mutants in the pyr-3 region of *Neurospora*. Journal of General Microbiology, 30: 317-325.

- REISSIG, J. L., 1963.b. Spectrum of forward mutants in the pyr-3 region of *Neurospora*. Journal of General Microbiology, 30: 327-337.
- ROPER, J. A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experientia, 8: 14-15.
- ROTHWELL, M. A. e M. H. L. GREEN, 1973. Non-sense suppressors with unusual properties. Heredity, 31(1): 138.
- RYCE, S. ; J. ATKINS e C. HUSSEY, 1973. Suppressors (UGA) wich also suppress frameshift mutations. Heredity, 31(1): 420.
- SADGOPAL, A., 1968. The genetic code after the excitement. Advances in Genetics, 14: 325-404.
- SEALY-LEWIS, H. e L. A. CASSELTON, 1976. Dominant and recessive suppressor genes of a met-5 mutation in *Coprinus*. Heredity, 37(1): 155.
- SEALY-LEWIS, H. e L. A. CASSELTON, 1977. Dominant and recessive informational suppressors of a missense mutation in *Coprinus*. Molecular and General Genetics, 151(2): 189-195.
- SHAHRIARI, H. e L. A. CASSELTON, 1973. Bypass and translational suppressors of a methionine mutant in the fungus *Coprinus lagopus*. Heredity, 31(1): 137.

- SHAHRIARI, H. e L. A. CASSELTON, 1974. Suppression of methionine mutants in *Coprinus*: I. Complementation and allele specificity as criteria of suppressor gene action. Molecular and General Genetics, 134(1): 85-92.
- STADLER, D. R., 1967. Suppressors of aminoacid uptake mutants in *Neurospora*. Genetics, 57: 935-942.
- TODD, N. K. e L. A. CASSELTON, 1972. Non-complementation between recessive suppressor gene mutations in *Coprinus lae-gopus*. Heredity, 28(2): 274.
- TODD, N. K. e L. A. CASSELTON, 1973. Non complementation and recessiveness as properties of missense suppressor genes in the fungus *Coprinus*. Journal of General Microbiology, 77(1): 197-207.
- WAGNER, R. P. e H. K. MITCHELL, 1955. Genetics and metabolism. New York, John Wiley and Sons, Inc., London, Chapman and Hall, Limited, 1^a ed., 444 p.
- WAGNER, R. P. e H. K. MITCHELL, 1964. Genetics and metabolism. New York, London and Sidney, John Wiley and Sons, Inc., 2^a ed., 673 p.
- WARR, J. R. e J. A. ROPER, 1965. Resistance to variou inhibitors in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 40: 273-281.
- WEGLENSKI, P., 1966. Genetical analysis of proline mutants and their suppressors in *Aspergillus nidulans*. Genetical Research (Camb), 8: 311-321.

- WEGLENSKI, P., 1967. The mechanism of action of proline suppressors in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 47: 77-85.
- WITKIN, E. M., 1969. Ultraviolet-induced mutation and DNA repair. Annual Review of Genetics, 3: 525-552.
- YANOFSKY, C. e P. St. LAWRENCE, 1960. Gene action. Annual Review of Microbiology, 14: 311-340.
- YOUNG, C. H. S. e B. S. COX, 1971. Enhanced observation of nonsense suppressor mutation frequency. Heredity, 27(3): 483.
- YOURNO, J. D. e S. R. SUSKIND, 1964.a. Suppressor gene action in the tryptophan synthetase system of *Neurospora crassa*: Genetic studies. Genetics, 50: 803-816.
- YOURNO, J. D. e S. R. SUSKIND, 1964.b. Wild-like enzyme in a suppressed tryptophan synthetase system of *Neurospora crassa*: Biochemical studies. Genetics, 50: 817-828.
- YUILL, E., 1939. Two new *Aspergillus* mutants. Journal of Botany, 77: 174-175.