**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE
SUPRESSORES DO MUTANTE**
*nicB8 EM *Aspergillus nidulans**

ANTONIO CARLOS MONTEIRO
UNIVERSIDADE DO AMAZONAS

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 Microbiologia Agrícola

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro 1979

Ao

Professor

e Orientador

Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

minha gratidão

e homenagem

A

meu pai
parentes e amigos

D E D I C O

"in memoriam"

de minha mãe,

Zenaide

do amigo,

Cláudio Porto

Uma singela homenagem

AGRADECIMENTOS

A todos que, direta ou indiretamente, prestaram sua colaboração na realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Particularmente, quero agradecer:

- Ao Professor e amigo *Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO*, mestre, orientador, pela espontaneidade, firmeza e alto espírito humanitário que lhes são peculiares.
- Ao Professor *Dr. ERNESTO PATERNIANI*, na pessoa do Diretor do Instituto de Genética da ESALQ/USP, pelo incentivo proporcionado.
- A *prezada* amiga *ALINE A.P. KLEINER*, pela colaboração e apoio constante, e sobretudo, pela simplicidade de sua amizade.
- Ao amigo *ISAIAS OLÍVIO GERALDI*, pela preciosa orientação na execução das análises estatísticas.
- Aos *professores* que contribuíram para minha iniciação e formação científica.
- Aos *colegas do curso de Pós-Graduação*, pela amizade, pelo incentivo e contribuição para minha formação.
- Aos *funcionários do Instituto de Genética*, em especial do *Setor de Genética de Microrganismos*, pela amizade, colaboração e assistência prestada.
- Ao *CNPq e a Universidade de Manaus*, pelos auxílios financeiros que possibilitaram a execução deste trabalho.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.	6
4. MATERIAIS E MÉTODOS.	38
4.1. Símbolos e fenótipos dos mutantes utilizados. .	38
4.2. Linhagens utilizadas.	39
4.2.1. Linhagem MSE	39
4.2.2. Linhagem <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₂</i>	40
4.2.3. Linhagem <i>nic⁺</i>	40
4.3. Meios de cultura.	41
4.3.1. Meio mínimo.	41
4.3.2. Meio completo.	41
4.3.3. Meio de galactose.	42
4.3.4. Meio de acetato de amônio.	42
4.3.5. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo	42
4.4. Soluções	43
4.4.1. Solução de ácido nucléico de leveduras..	43
4.4.2. Solução de vitaminas	43
4.4.3. Suplementos adicionados ao meio míni- mo	43
4.4.4. Solução de tween	44
4.4.5. Solução salina	44
4.4.6. Solução de cloroneb	45

	<u>Página</u>
4.5. Esterilização e incubação.	45
4.6. Placas de análise	45
4.7. Tratamento com mutagênico	46
4.8. Obtenção de supressores	47
4.9. Ensaio de supressão e isolamento de supressores. .	48
4.10. Porcentagem de sobrevivência a irradiação . .	49
4.11. Frequência de supressão	49
4.11.1. Frequência aparente de supressão. . .	50
4.11.2. Frequência real de supressão.	50
4.12. Ensaio de super-supressão	51
4.13. Ensaio de crescimento	51
4.14. Técnicas de análises genéticas.	53
4.14.1. Obtenção de heterocários	53
4.14.2. Teste do heterocário.	54
4.14.3. Análise mitótica.	54
4.14.4. Análise meiótica.	56
4.15. Análise estatística	57
5. RESULTADOS.	59
5.1. Obtenção de supressores	59
5.2. Ensaio de supressão e isolamento de supressores	60
5.3. Porcentagem de sobrevivência a irradiação . .	63
5.4. Frequência aparente e frequência real de supressão	64
5.5. Ensaio de super-supressão	64
5.6. Ensaio de crescimento	67
5.7. Análise genética	74

	<u>Página</u>
5.7.1. Teste do heterocário.	76
5.7.2. Análise mitótica e meiótica	76
5.7.3. Cruzamento da linhagem MSE com linha- gem <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂	79
5.7.4. Cruzamento da linhagem <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂ com as linhagens derivadas da MSE e conten- do o caráter supressor do ácido nicotí- nico	79
6. DISCUSSÃO	98
6.1. Obtenção, isolamento de supressores e fre- quência de supressão.	98
6.2. Análise genética	104
6.3. O mecanismo de ação dos supressores	109
6.4. Obtenção de super-supressores	116
6.5. A elongação micelial na determinação das po- tencialidades de supressão	119
7. CONCLUSÕES	126
8. SUMMARY	128
9. LITERATURA CITADA.	130

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Colônias independentes de ácido nicotínico exógeno obtidas espontaneamente e induzidas por luz ultra-violeta (resultado de quatro experimentos).	59
2 - Características morfológicas das colônias independentes de ácido nicotínico exógeno.	61
3 - Colônias independentes de ácido nicotínico exógeno que exibiram real caráter supressor	62
4 - Conotação preliminar atribuída aos supressores isolados, obtidos espontaneamente e por indução	63
5 - Porcentagem de sobrevivência dos confídios submetidos a irradiação com luz ultra-violeta	64
6 - Frequência aparente de supressão do caráter nic ⁺ obtida espontaneamente e por indução através de luz ultra-violeta	65
7 - Frequência real de supressão do caráter nic ⁺ obtida espontaneamente e por indução através de luz ultra-violeta	66
8 - Supressores de ácido nicotínico independentes de tiosulfato de sódio ou piridoxina.	68
9 - Dinâmica do ensaio de super-supressão.	69
10 - Medidas do crescimento em diâmetro, em milímetros, de colônias de 14 supressores e dois controles em quatro tempos de incubação	70
11 - Análise da variância do diâmetro de colônias de 16 linhagens (14 supressores e dois controles) em quatro tempos de incubação e três repetições (blocos) . .	71

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
12 - Análise da variância do diâmetro das colônias para o tempo de 120 horas de incubação em três repetições (blocos)	72
13 - Resultados do teste de Dunnett aplicado na comparação do crescimento em diâmetro de 14 supressores em relação ao controle MSE no tempo de 120 horas de incubação	75
14 - Conotações atribuídas aos isolados supressores da marca genética <i>nícB₈</i> , analisados geneticamente	77
15 - Segregação meiótica do cruzamento das linhagens supressoras com a linhagem <i>proA₁; pabaA₆; yA₂</i>	78
16 - Análise mitótica: Diplóide MSE// <i>proA₁; pabaA₆; yA₂</i>	80
17 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE com a linhagem <i>proA₁; pabaA₆; yA₂</i>	81
18 - Resultados das análises mitótica e meiótica das linhagens supressoras cruzadas com a linhagem <i>proA₁; pabaA₆; yA₂</i>	83
19 - Análise mitótica: Diplóide MSE <i>su 12 nicB₈</i> // <i>proA₁; pabaA₆; yA₂</i>	84
20 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE <i>su 12 nicB₈</i> com a linhagem <i>proA₁; pabaA₆; yA₂</i> ..	85
21 - Análise mitótica: Diplóide MSE <i>su 13 nicB₈</i> // <i>proA₁; pabaA₆; yA₂</i>	86
22 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE <i>su 13 nicB₈</i> com a linhagem <i>proA₁; pabaA₆; yA₂</i> . .	87
23 - Análise mitótica: Diplóide MSE <i>su 14 nicB₈</i> // <i>proA₁; pabaA₆; yA₂</i>	88
24 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE <i>su 14 nicB₈</i> com a linhagem <i>proA₁; pabaA₆; yA₂</i>	89

TabelaPágina

25 - Análise mitótica: Diplóide MSE su 15 <i>nicB₈</i> // <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₂</i>	90
26 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE su 15 <i>nicB₈</i> com a linhagem <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₂</i> . . .	91
27 - Análise mitótica: Diplóide MSE su 16 <i>nicB₈</i> // <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₂</i>	92
28 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE su 16 <i>nicB₈</i> com a linhagem <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₂</i>	93
29 - Análise mitótica: Diplóide MSE su 17 <i>nicB₈</i> // <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₂</i>	94
30 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE su 17 <i>nicB₈</i> com a linhagem <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₂</i> . .	95
31 - Análise mitótica: Diplóide MSE su 18 <i>nicB₈</i> // <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₂</i>	96
32 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE su 18 <i>nicB₈</i> com a linhagem <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₂</i> . .	97

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Marcadores genéticos da linhagem MSE.	39
2 - Marcadores genéticos da linhagem <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yf</i> ₂ ..	40
3 - Curva de crescimento em diâmetro de 14 supres- sores e dois controles em quatro tempos de in- cubação	73
4 - Sistema de regulação em cascata.	111
5 - Representação esquemática do funcionamento de um possível sistema alternativo de regulação gê- nica do metabolismo do ácido nicotínico	113

1. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o estudo e caracterização genética de supressores da marca *nícB₈* em *Aspergillus nidulans*. Aspectos como o aperfeiçoamento de critérios usados na seleção e isolamento de supressores, o significado da frequência de supressão como um método de determinação da atividade mutagênica, a caracterização das potencialidades de supressão de diversos genes e a obtenção de super-supressores foram particularmente analisados. Com esta finalidade, a linhagem MSE foi utilizada para a obtenção de supressores espontaneamente e por indução através de luz ultra-violeta.

A análise genética revelou a existência de diferentes supressores que foram localizados em grupos de ligação distintos do *Aspergillus nidulans*, a saber: três supressores no grupo de ligação IV, um supressor no grupo de ligação VI e dois supressores no grupo de ligação VII; somente uma mutação caracterizou-se como reversão verdadeira de *nícB₈*.

A metodologia utilizada mostrou-se apropriada na determinação da frequência de mutações induzidas. As divergências genéticas entre os supressores puderam ser evidenciadas pela medida da elongação micelial e ficou demonstrada a necessidade de se estabelecer critérios adequados para seleção e isolamento de supressores. O sistema de regulação em cascata foi utilizado para explicar o modo de ação de alguns supressores embora as evidências sugerissem a hipótese da existência de um sistema alternativo de regulação para outros supressores.

2. INTRODUÇÃO

A restauração de um fenótipo normal ou parcialmente normal, a despeito da persistência da mutação original, é classicamente chamada de *Supressão*.

O termo "supressão" originado da genética clássica de algumas décadas passadas é usado para designar a reversão de um fenótipo mutante através de uma segunda mutação em um locus distinto daquele da mutação original. Em contraste com certos genes (enhancers) cujas ações acentuam o fenótipo mutante, mutações supressoras condicionam características fenotípicas semelhantes àsquelas encontradas no tipo selvagem, muito embora os genes supressores não sejam encontrados em linhagens selvagens mas sejam obtidos por seleção de revertentes de um fenótipo mutante. Em alguns casos o fenótipo selvagem é completamente restaurado, em outros a restauração é apenas parcial. Através de recombinação, mutações supressoras podem ser geneticamente separadas das mutações que elas suprimem.

O conceito de supressão inclui ainda casos em que o gene supressor impede a manifestação de outros genes. Este tipo de ação supressora pode explicar certos casos de diferenciação sexual e diferenciação celular nos processos de desenvolvimento de organismos superiores, desempenhando importante papel na atividade biológica destes organismos, importância esta que se estende como uma das causas da variabilidade.

Embora já conhecidos a algumas décadas, os primeiros casos de supressão foram interpretados como duplicações gênicas apesar do fato de que alguns casos realmente consistiam de duplicações. Experimentos posteriores mostraram que supressão também pode resultar da interação entre genes não alelos (*HARTMAN e ROTH, 1973*). Atualmente intensivos estudos vem sendo desenvolvidos no sentido de determinar e esclarecer os mais variados aspectos do fenômeno biológico da supressão com especial ênfase as bases genético - moleculares notadamente em bactérias e leveduras.

Com base nestes trabalhos o valor do estudo da supressão está indubitavelmente estabelecido. Por exemplo, a análise de supressão intragênica vem oferecendo elementos básicos para nosso conhecimento do mecanismo pelo qual o código genético é decifrado; a supressão informacional tem contribuído na compreensão de certos aspectos do processo de tradução, em particular a natureza dos sinais, "in vivo", da termina-

ção e iniciação da cadeia e o papel dos ribossomos para assegurar uma leitura não ambígua do código genético (GORINI e BECKWITH, 1966).

Os estudos de supressão envolvendo a marca genética *nicB₈* do fungo *Aspergillus nidulans* foram iniciados com o trabalho de WARR e ROPER (1965). MIRANDA FILHO (1972) e MIRANDA FILHO e AZEVEDO (1974) isolaram 11 supressores *nicB₈* e caracterizaram geneticamente nove destes supressores propondo um mecanismo de regulação em cascata para explicar o modo de ação dos mesmos. O presente trabalho pretende dar continuidade a estes estudos. Com esta finalidade procurou-se obter e caracterizar geneticamente uma maior variedade de supressores, aperfeiçoando-se para isso os critérios usados no isolamento dos mesmos ao considerar-se distintos aspectos das colônias tais como morfologia, coloração, desenvolvimento, condição, etc., diferentemente dos últimos autores para os quais somente mereceu atenção o bom desenvolvimento observado. Além disso, o significado da frequência de supressão como um método de determinação da atividade mutagênica foi analisado, as potencialidades de supressão de diversos genes foram comparadas através da medida da elongação micelial e conduziu-se um experimento com a finalidade de se obter e posteriormente caracterizar super-supressores.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Um rápido exame da literatura a respeito do fenômeno da supressão nos mostra que, embora investigações tenham sido conduzidas em organismos superiores onde se destacam os trabalhos realizados com a mosca *Drosophila melanogaster* (LEE, 1970, 1973a, 1973b; PORTIN, 1975; PYATI, 1976; GIRTON e RUSSEL, 1977; WADDLE, 1978, entre outros), sem dúvida alguma os microrganismos, notadamente bactérias (revisões de GORINI e BECKWITH, 1966; GORINI, 1970; HARTMAN e ROTH, 1973), leveduras (revisões de HARTMAN e ROTH, 1973; HAWTHORNE e LEUPOLD, 1974) e fungos (MIRANDA FILHO, 1972; HARTMAN e ROTH, 1973) foram escolhidos pelos pesquisadores para desenvolver os estudos elucidativos deste fenômeno em função das vantagens inerentes que estes organismos apresentam.

Conforme já referimos anteriormente, supressores são genes que suprimem a expressão de um fenótipo mutante, sendo na maioria dos casos selecionados como reversões des

te fenótipo. Uma reversão surgida por uma mutação distinta de uma troca de base no locus mutante original é portadora de um gene supressor. Entretanto, se a nova mutação ocorrer em um outro sítio dentro do gene mutante original é chamada de supressão intra-locus ou intragênica; todavia, esta conceituação pode levar ao emprego incorreto do termo "supressão" que originalmente foi designado para aquelas mutações que ocorrem em um outro gene, o gene supressor, agora definido como supressor externo ou supressão extra-locus (HAWTHORNE e LEUPOLD, 1974).

A supressão intragênica ocorre por mutações através de trocas na sequência de pares de bases na molécula de DNA. Segundo HARTMAN e ROTH (1973), basicamente pode se processar de duas maneiras:

a) por adição ou deleção de um ou mais pares de bases que modificam a leitura da sequência de bases no sítio da mutação, além da adição ou deleção de conjuntos de três bases que também afetam as leituras subsequentes da cadeia de bases nitrogenadas (mutações frameshifts).

b) substituição de bases que conduzem a troca de um aminoácido por outro na cadeia polipeptídica (mutação missense) ou a terminação prematura da cadeia (mutação nonsense: amber ou UAG, ochre ou UAA e umber ou UGA). (Revisões de GORINI e BECKWITH, 1966; GAREN, 1968).

A supressão extra-locus ou externa é assim chamada não pelo fato de ocorrer fora do gene mutante, mas sim porque ela afeta a estrutura de uma segunda unidade funcional do material genético, isto é, é devida a supressão intergênica. Os supressores externos são sub-classificados (HARTMAN e ROTH, 1973) em:

a) supressores informacionais ou diretos que corrigem a sequência de aminoácidos de uma proteína mutante; a correção é efetuada através de modificações no sistema sintetizante de proteínas. Neste caso, o gene mutante ainda fornece RNA mensageiro mas ocasionalmente há um erro na leitura da região mutante da mensagem de modo que nas linhagens supressoras é formada uma proteína funcional. A supressão informacional (GORINI, 1970) inclui supressores externos de mutações "missense", "nonsense" e "frameshift"; é alelo específica e permite a diferenciação de homoalelos que aparecem identicamente em outros testes incluindo o teste de recombinação (HARTMAN e ROTH, 1973; HAWTHORNE e LEUPOLD, 1974).

b) supressores funcionais ou indiretos que permitem a produção do produto gênico na forma mutante mas compensando-o indiretamente de modo a permitir a expressão do fenótipo selvagem através de uma via alternativa ou um caminho paralelo (HARTMAN e ROTH, 1973; HAWTHORNE e LEUPOLD, 1974).

A evolução atual do estudo de supressão conduziu a necessidade de se estabelecer uma nomenclatura unificada devido ao crescente número de supressores caracterizados. As revisões de *GORINI (1970)* e *HARTMAN e ROTH (1973)* estabelecem os critérios para a designação e uso de símbolos em supressão.

Paralelamente, se a caracterização de supressores é cada vez maior em um número variado de organismos, novos aspectos correlatos ao fenômeno da supressão vem sendo relatados pelos pesquisadores. Entre estes aspectos podemos destacar o fenômeno da super-supressão. Mutações super-supressoras são mutações capazes de reverter simultaneamente o fenótipo de duas mutações originais independentes. A ocorrência de genes "super-supressores" tem sido mais constantemente relatada em leveduras (*HAWTHORNE e LEUPOLD, 1974; SMIRNOV et alii, 1974; GERLACH, 1975; CAPECCHI et alii, 1975; GERLACH, 1976*, entre outros) e no fungo *Neurospora* (*SEALE, 1970; CHALMERS e SEALE, 1971; SEALE, 1972; NEWCOMBE e GRIFFITHS, 1973; GRIFFITHS, 1975; SEALE, 1976*, entre outros).

~~McCREADY~~ *McCREADY e COX (1973, 1976)* descreveram a ocorrência de genes "antissupressores" em leveduras e *PICARD-BENNOUM (1976)* e *COPPIN-RAYNAL (1977)* descreveram a presença destes genes em *Podospora anserina*. Antissupressores são genes mutantes que exibem uma ação antagonista em relação ao

supressor. De modo geral os antissupressores diminuem o nível de supressão em vez de inativar completamente o supressor; as evidências genéticas obtidas sugerem que muitos dos antissupressores são mutantes ribossomais restritivos.

Uma outra classe de genes relacionados ao fenômeno da supressão, os "alossupressores", foram relatados por COX (1977). Alossupressores são genes mutantes recessivos que permitem um aumento no nível de supressão. Foram identificados em *Saccharomyces cerevisiae* como mutações designadas *sal* (*sal 3* e *sal 4*) cujos produtos gênicos parecem ser mais provavelmente proteínas envolvidas na determinação precisa da tradução ao nível do ribossomo.

Vários são os organismos nos quais o fenômeno da supressão tem sido estudado destacando-se entre eles, além dos fungos, as bactérias, as leveduras e nos organismos superiores a mosca *Drosophila melanogaster*.

Em bactérias destacam-se os estudos relacionados a supressão informacional (GORINI, 1970) embora as demais revisões aqui anteriormente referidas apresentem uma descrição extensa de trabalhos envolvendo bactérias, especialmente *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, sob os mais diversos aspectos e análises do problema da supressão.

Paralelamente, também é extenso o número de trabalhos que tem sido conduzidos com leveduras (revisão de HAWTHORNE e LEUPOLD, 1974) onde os estudos de supressão de mutações "missense", "nonsense" - ochre e amber" e mutações "frameshifts" são efetuados com bastante intensidade (GILMORE, 1967; HAWTHORNE, 1969; GILMORE et alii, 1971; YORNO et alii, 1964; GORMAN e GORMAN, 1971; apud PICARD-BENNOUM, 1976). Referências iniciais complementares podem ser encontradas no trabalho de MIRANDA FILHO (1972). Recentemente torna-se relevante ressaltar os trabalhos envolvendo super-supressão (HAWTHORNE e LEUPOLD, 1974; SMIRNOV et alii, 1974; GERLACH, 1975; CAPECCHI et alii, 1975; GERLACH, 1976), antissupressão (McCREADY e COX, 1973, 1976) e alossupressão (COX, 1977).

Em relação aos organismos superiores a maior parte dos estudos de supressão vem sendo conduzidos em *Drosophila melanogaster*. Na obra de WAGNER e MITCHEL (1955, 1964) pode se obter uma lista de supressores estudados nesta mosca e na revisão de HARTMAN e ROTH (1973) encontram-se analisados vários aspectos da supressão em *Drosophila*.

LEE (1970), conduziu uma investigação das características fenotípicas do super-supressor $su(Hw)^2$ em *Drosophila melanogaster* usando o mutante supressível sc^1 junto com o sistema de cerdas escutelar, dorsocentral e vertical da mosca. Uma grande semelhança entre o fenótipo mutante suprimido e fenótipos selvagens foi verificada, os quais eram

particularmente similares na distribuição de classes de cerdas. Num segundo trabalho (LEE, 1973a) o autor investigou as interrelações entre supressão e mutação reversa em *Drosophila*. Treze mutações reversas (back mutation) induzidas por raios X e três mutações espontâneas de Δc^1 junto com duas reversões de y^2 foram examinadas em várias combinações com o mutante extra-cerdas pyd^V e $\Delta u(Hw)^2$. No trabalho seguinte (LEE, 1973b) o autor estudou a questão relativa ao campo ou extensão da atividade do supressor. Setenta e dois mutantes ainda não testados foram agora submetidos a teste de supressão pelo gene $\Delta u(Hw)^2$; destes, somente seis foram suprimidos enquanto que a supressão de um mutante previamente testado, denominado Bar, suscitou dúvidas. O autor sugeriu que existem diferenças funcionais entre os três tipos de loci classificados por sua resposta em relação ao supressor $\Delta u(Hw)^2$.

Uma série extensa de trabalhos envolvendo diversos aspectos de supressão em *Drosophila* podem ser citados entre os quais destacamos os trabalhos de KIGER (1973), FARMER (1973), FINNERTY, BARTON, SCHALET, ELMER e SMITH (1973), DUDICK e WRIGHT (1973), PROUT, BUNDGAARD e BRYANT (1973), RASMUSSEN, MONTELL e OHRING (1973), BARR (1973), SPARROW e SANG (1974), WHITE (1975), PORTIN (1975), PYATI (1976), PERSON (1976), GIRTON e RUSSELL (1977), FARMER (1977), WOSNICK e WHITE (1977), WADDLE (1978), SLATKO e HIRAIZUMI (1978).

Em vegetais, além do trabalho em cevada de *JAIN (1966)*, algumas investigações foram conduzidas em milho como o trabalho de *PETERSON e LELEJI (1974)* que identificaram três alelos do locus *C* (um dos loci contribuintes para coloração da antocianina na aleurona do cerne), supressores da cor da aleurona; estes alelos foram diferenciados com base na potência de supressão da cor.

Sem a preocupação de uma abordagem ampla e detalhada do fenômeno da supressão em uma diversidade maior de organismos, interessa-nos considerar mais especificamente a supressão em fungos.

Embora em menor intensidade que em bactérias e leveduras, as investigações sobre o fenômeno da supressão em fungos vem sendo conduzidas especialmente em fungos filamentosos e basidiomicetos; o número crescente de trabalhos apresentados anualmente tem permitido um melhor esclarecimento do mecanismo da supressão nestes organismos. Algumas das investigações mais importantes serão aqui abordados por estarem mais intimamente relacionados com o presente estudo. Referências adicionais poderão ser obtidas no trabalho de *MIRANDA FILHO (1972)* e na revisão de *HARTMAN e ROTH (1973)*.

Investigações de supressão são descritas em vá

rios fungos.

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

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 e em oito linhagens a segregação apresentou frequências 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 em uma linhagem.

PICARD, MARGUERITE (1973) obteve 41 supressores de dois mutantes polares do segmento 29 em *Podospora anserina* após mutagênese com nitrosoguanidina e etil metanosulfonato. Os supressores foram diferenciados em três classes (classe I, II e III) pelo critério do espectro padrão. A capacidade de supressão, especificidade e dominância de supressores das três classes permitiram estabelecer duas hipóteses para caracterizar o tipo e ação dos supressores: na primeira hipótese, tRNA (s) poderiam estar envolvidos em todas as três classes de supressão; a classe I seria nonsense específica e classes II e III nonsense-missense. Na segunda, tRNA (s) estariam envolvidos somente na classe I enquanto ambiguidade ribossomal poderia ser responsável pela classe II e III de supressão.

PICARD-BENNOUN (1976) selecionou antissupressores com o auxílio de supressores informacionais em *Podospora anserina*. Quatro mutações no locus AS₁ e duas no locus AS₂ foram isoladas usando supressores alelos não específicos; quatro mutações no locus AS₃ e 45 no locus AS₄ foram obtidas usando um supressor nonsense. Todos os antissupressores eram parcialmente dominantes. As propriedades e o espectro de ação dos mesmos sugeriram que eles sejam mutações ribossomais restritivas. Para confirmar esta hipótese, COPPIN-RAYNAL (1977) conduziu um experimento no qual a resistência "in vivo" e "in vitro" a ciclohexamida (CHX) de várias linhagens mutantes su-

pressoras e antissupressoras foram analisadas. Vários mutantes exibiram uma sensibilidade modificada para CHX (é um inibidor ribossomal); uma comparação entre linhagens selvagens e linhagens mutantes conferiu a hipótese previamente feita de que estas mutações são expressas ao nível ribossomal. Realmente, os quatro mutantes do gene *AS*, eram resistentes a ciclohexamida; a diferença observada na taxa de incorporação de polifenilalanina entre antissupressores *AS*, supressores *su* e linhagem selvagem é um argumento adicional.

LABARERE e BERNET (1978) estudando uma mutação inibidora da incompatibilidade protoplasmática em *Podospora anserina* mostraram que a mutação no gene *modC*, selecionado para supressão da destruição da célula induzida por interação R/V (genes de incompatibilidade), também inibe a formação de três enzimas (laccase III e proteases III e IV) responsáveis pela lise da célula.

Em *Schizophyllum commune* também encontramos relatos da ocorrência de supressores. *CHANG (1972)*, analisando geneticamente um novo mutante designado "dome" (em forma de abóboda), *dm-10*, e um setor isolado de *dm-10* que se assemelha a linhagem selvagem na taxa de crescimento e morfologia, mostrou que o setor foi causado por um gene supressor *dm-10-s*. O gene *dm-10-s* é específico para *dm-10* e *dm-9* mas não afeta os genes *dm-2*, *dm-5* e *dm-7* da mesma série. O gene

dm-10-s é uma espécie de supressor intergênico que pode estar localizado em qualquer ponto do genoma e produz um indutor capaz de restringir o repressor produzido pelos genes *dm-9* e *dm-10* restaurando a morfologia do tipo selvagem.

KOLTIN, STAMBERG e RONEN (1975), estudando as frequências de mutações espontâneas na meiose e mitose para dois loci em *Schizophyllum commune* detectaram a ocorrência de mutações supressoras para ambos os loci examinados. Mutações *ade*⁺ descobertas após meiose incluíram 38,5% dos supressores de *ade* 5⁻ enquanto após mitose somente 8% das mutações eram supressores. Os supressores foram localizados em cinco sítios, dos quais quatro eram intimamente ligados a marca *ade-5*. Das mutações *ura*⁺ descobertas após meiose, 14% eram supressores ligados; somente uma mutação *ura*⁺ obtida na amostragem mitótica era um supressor do mesmo sítio.

Em uma série de três trabalhos destinados a estudar o mecanismo de conversão gênica em *Ascobolus immersus*, LEBLON (1972a, 1972b) e LEBLON e ROSSIGNOL (1973) induziram 72 ascósporos mutantes para cor sendo 25 por acridina (ICR 170), 18 por N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NG) e 19 por etil metanossulfonato (EMS). Todos os mutantes foram cruzados com a linhagem selvagem e seu espectro de conversão determinado. Para estabelecer as relações entre o tipo de alteração genética que ocorre em um mutante e o espectro de conversão a ele

associado, foi feita uma tentativa para caracterizar as alterações genéticas em uma amostra de cinco mutantes para cor do esporo por reversão específica. Todos os mutantes reverterem por "back-mutation" (mutação reversa). Reversão de um dos mutantes foi possível através de um gene supressor externo; outros dois supressores estudados eram alelo-específicos mas não gene-específicos na sua supressão e por isso comportavam-se como super-supressores. Reversão de dois mutantes por mutação em um segundo sítio intragênico e estudos de supressores intragênicos indicaram que eles são do tipo "frameshift".

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 do esporo (respectivamente *b 1*, *b 2*, *b 4*, *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*) está na condição heterozigótica.

LEBLON e PAQUETTE (1978) em um estudo de reversão para cor do ascósporo em mutantes induzidos por EMS ou ICR 170 em *Ascobolus immersus* isolaram 23 novos supressores

intragênicos dentro do locus *b 2*. Os supressores foram localizados em três grupos distintos no mapa da estrutura do gene que contém 21 sítios. Os autores discutiram um modelo de reversão de acordo com a especificidade conhecida de EMS e ICR 70 em *Ascobolus immersus*.

No fungo basidiomiceto *Coprinus*, vários trabalhos relatam a identificação de supressores. Supressores do gene *pur* (pigmentação púrpura) foram identificados por MORGAN (1961, 1965) em *Coprinus lagopus* enquanto LEWIS (1961) estudou supressores do mutante *met 1* neste fungo.

TODD e CASSELTON (1972) estudaram o fenômeno da não complementação e recessividade entre mutações gênicas supressoras em *Coprinus lagopus*. O papel do tRNA missense su^+ foi determinado em organismos haplóides e diplóides. Dois grupos de genes su^+ que combinam com as propriedades de su^+ missense foram descritos. Os autores sugeriram que a não-complementação entre genes recessivos su^+ em fungos é uma propriedade de genes missense su^+ que atuam na tradução, especificando tRNA (s) modificados que alteram as especificidades dos codons.

SHAHRIARI e CASSELTON (1973) determinaram que uma mutação no gene *met 1* de *Coprinus* pode ser suprimida por cinco genes supressores recessivos diferentes. Dois destes genes su^+ , *su-1* e *su-2* complementam quando combinados em um

dicário heterozigoto e os três outros remanescentes *su-3*, *su-4* e *su-5* embora complementando com *su-1* e *su-2* não se complementam entre si em qualquer combinação. O mecanismo de supressão destes genes é diferente: *su-1* e *su-2* são alelos não específicos enquanto *su-3*, *su-4* e *su-5* são alelos específicos. Num trabalho complementar CASSELTON e SHAHRIARI (1973) comentaram os vários aspectos genéticos da recessividade e não complementação de genes supressores missense em fungos envolvendo tRNA (s) modificadores que alteram as especificidades dos codons. Prosseguindo nos estudos de não complementação e recessividade, TODD e CASSELTON (1973) usaram mutações no gene *acu-1* que conduz a inabilidade para o uso de acetato como única fonte de carbono, para selecionar mutações gênicas recessivas *su*⁺. De cinco alelos *acu-1* testados, dois, *acu-1-2* e *acu-1-4* eram suprimidos. Três genes diferentes *su*⁺ suprimiam a mutação *acu-1-2* e dois genes *su*⁺ suprimiam a mutação *acu-1-4*. Todas as mutações supressoras *su*⁺ eram completamente alelo-específicas pois somente suprimiam a mutação *acu-1* 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.

No trabalho subsequente SHAHRIARI e CASSELTON (1974) 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 alelos específicos pois somente suprimiram a mutação *met-1-1*. Em seguida os autores (CASSELTON e SHAHRIARI, 1975) testaram a habilidade destes supressores para 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 parental 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 descoberto 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.

OZIER-KALOGEROPOULOS e GUERDOUX (1975) verificaram que a mutação *níc-2* de *Coprinus radiatus* é instável na meiose. Linhagens derivadas de um mutante inicial foram divididas em duas classes, os "genomas neutros" e os "genomas agressivos". As características e as relações destas duas classes são apresentadas no trabalho.

CASSELTON e SEALY-LEWIS (1976) identificaram a presença de quatro genes supressores do locus *acu-1* em *Coprinus*, um gene estrutural para a síntese de acetil-Co A sintetase. O alelo *acu-1-34* foi suprimido pelos quatro supressores os quais são alelo específicos, recessivos e não exibiram complementação em diplóides duplos heterozigotos ou dicários. Os mesmos autores (SEALY-LEWIS e CASSELTON, 1976) isolaram cinco genes supressores da mutação *met-5-1*. Todos os supressores são alelos específicos; dois são recessivos e exibiram complementa-

ção normal em heterozigotos e dos outros três, dois são recessivos e exibiram não complementação enquanto o terceiro é dominante.

Por fim, *SEALY-LEWIS e CASSELTON (1977)* analisando 21 mutações gênicas supressoras da mutação *met-5-1* *mis-sense* de *Coprinus* separaram-nas em seis grupos (A a F) baseados na dominância ou recessividade, ligação com o locus *met-5*, complementação em células heterozigóticas e comportamento do crescimento. A alelo-especificidade, tipo de supressão, eficiência em função do crescimento foram analisados para todos os grupos considerados.

Um dos principais organismos onde o fenômeno da supressão tem sido objeto de um número apreciável de investigações genéticas é o fungo filamentoso *Neurospora crassa*. Referências preliminares de trabalhos envolvendo os mais variados aspectos de supressão neste fungo podem ser obtidos em *MIRANDA FILHO (1972)*.

SEALE (1968) constatou a presença em *Neurospora* de supressores dos loci *am 17* e *am 5* (locus *am* é responsável pela síntese da enzima glutamato desidrogenase - GDH). A presença de super-supressores neste fungo também foi constatada por *SEALE (1970)*. Os super-supressores eram capazes de suprimir a linhagem duplo-mutante *am 17-tayp-3* ocorrida com uma frequência de $2/10^5$ de sobrevivência a luz ultra-violeta dan-

do uma taxa de 50% e foram localizados como supressores exter nos para ambos os loci *am* e *tryp-3*. Quatro super-supressores foram capazes de restaurar um produto gênico de *am*, glutamato desidrogenase, qualitativamente distinta daquela produzida pe lo selvagem. Cada um destes super-supressores foi mapeado em um braço distinto de determinado grupo de ligação. *CHALMERS* e *SEALE* (1971) constataram a presença de super-supressores para os loci *tryp-1* e *tryp-2*.

SEALE (1972) mapeou cinco mutações super-supressoras em *Neurospora crassa* escolhidas de um total de 48 revertentes que geneticamente purificados e cruzados com a linhagem selvagem mostraram conter uma mutação supressora. Análise de tétrades e esporos ao acaso foram usados para demonstrar que cada um se comportava como um gene simples no cruzamento. Os super-supressores *ssu 1* e *ssu 4* foram localizados no braço direito e esquerdo do grupo de ligação VII, respectivamente, os super-supressores *ssu 2* e *ssu 3* localizavam-se no braço direito do grupo de ligação I enquanto o super-supressor *ssu 7* localizava-se entre as marcas *ad 8* e *p lo* no grupo de ligação VI.

BRINCK (1972), estudando reversões de uma linhagem de *Neurospora crassa* carregando o alelo *mt-k* (resistente a 4 metil-triptofano) relatou um tipo adicional de revertentes que resultam de mutações em um locus não ligado. Estes revertentes constituem mutações supressoras aparente-

mente alelo-específicas, desde que de todos os alelos $mt-h$ testados somente o alelo $mt-h$ 26 foi suprimido. O autor descreveu algumas propriedades do sistema de transporte de triptofano em linhagens revertentes $mt-h^+$, $mt-h^-$ e $mt-h$.

NEWCOMBE e GRIFFITHS (1973) e *GRIFFITHS e NEWCOMBE (1973)* testaram a ação de oito super-supressores em 76 mutantes para o locus *ad-3B* induzidos por mutagênicos de transição de pares de bases. Destes, 13 mutantes foram suprimidos por um gene super-supressor ao menos. A maioria dos mutantes suprimidos pertenciam a classe de mutantes nonsense embora tenha sido encontrada supressão em outras classes, incluindo mutações missense, aumentando a possibilidade de que alguns super-supressores sejam um conjunto de supressor missense/nonsense. Culturas *ad-3B; ssu* não crescem à taxa de linhagem selvagem, mas em geral mostram um tipo de interrupção inicial periódica do padrão de crescimento linear que é alelo específica para *ad-3B* e *ssu* na taxa de crescimento e periodicidade.

Num trabalho complementar, *GRIFFITHS (1973)* montou um experimento através do qual buscou medir o grau de supressão pelo qual alguns alelos *ad-3B* são suprimidos pelos mutantes super-supressores. A restauração do crescimento foi ~~examinada~~ pela medida linear da taxa de crescimento em tubos de 300 mm. Os cruzamentos foram todos do genótipo

ad-3B X *ssu*. Cinco conclusões principais puderam ser tiradas deste estudo pelo autor:

1) a taxa de crescimento não é nunca restaurada como a taxa do tipo selvagem.

2) a extensão da supressão é alelo específica *ad-3B* e também alelo específica *ssu*.

3) os genótipos *ad-3B;ssu* em geral mostram um tipo de interrupção inicial do padrão de crescimento que não é mostrado pelos outros genótipos.

4) culturas de esporos irmãos mostraram extraordinária sincronia no padrão de crescimento.

5) em algumas culturas *ad-3B;ssu* de interrupção inicial do crescimento surge um "escape" (setor cujo desenvolvimento atinge a taxa de crescimento do tipo selvagem) que é provavelmente devido a uma não reversão.

CHANG e CATCHESIDE (1973), em estudos genéticos na recombinação do locus *pan 2* em *Neurospora crassa* obtiveram o gene supressor *STC 1* que suprime o alelo *pan 2, Y 153-M 66* mas não suprime outros três loci. O supressor não mostrou nenhum efeito sobre os loci *tryp-3 (td 140)*, *tryp-3 (td 128)*, *am-1⁻⁵* e *am-1⁻¹⁷* que de modo geral são susceptíveis a todos os super-supressores conhecidos em *Neurospora*.

BROWN e AIUTO (1973) obtiveram reversões espontâneas e induzidas por ácido nitroso e quatro outros agentes mutagênicos no locus *met-1* em *Neurospora crassa*. O ácido nitroso mostrou ser um mutagênico efetivo em oito entre 19 alelos *met-1* estudados. Foram obtidos dois tipos de reversões denominadas FR'S e PR'S que cruzadas com a linhagem selvagem permitiram identificar três tipos de supressores: o primeiro não ligado ou frouxamente ligado ao locus *met-1*, o segundo ligado ao locus *met-1* e o terceiro causado por uma mutação reversa do mutante original. Os resultados da taxa de reversão para quatro outros mutagênicos (MNNG, EMS, OMHA, ICR-170), além de NA, em seis alelos *met-1* indicaram que deleções gênicas, substituição de pares de bases, adição ou deleção estão presentes no arranjo dos alelos estudados.

GRIFFITHS (1975), analisou quantitativa e qualitativamente, em uma análise de tétrades, a interação entre vários alelos *ad-3B* supressíveis e alguns genes super-supressores. Quantitativamente, verificou que há uma boa variação no significado das taxas de crescimento de culturas exibindo super-supressão; parte desta variação pode ser atribuída a variação na supressibilidade dos alelos *ad-3B*, parte a variação na eficiência de alelos *ssu* e parte a ação de genes modificadores. Qualitativamente, culturas *ad-3B;ssu* quase sempre exibem uma interrupção inicial do padrão de crescimento; entretanto é comum surgir um "escape" em direção ao crescimenu

to da linhagem selvagem.

SEALE, FINCHAM e BRETT (1976) e *SEALE, BRETT, BARON e FINCHAM (1977)* analisaram o significado da substituição de aminoácidos usando duas classes de revertentes *am-17* devido a mutações promovidas dentro do gene *am*. Nestes trabalhos os autores relataram as primeiras investigações, por análise de substituição de aminoácidos, da natureza molecular de *am-17* e da ação de alguns de seus supressores.

GRIFFITHS (1976), analisou a possibilidade de se usar um critério adicional de dominância ou recessividade de supressores e aplicá-los pela primeira vez para alelos *ssu* de *Neurospora*. A dominância é tomada para indicar supressores nonsense e recessividade para indicar supressores missense. Os resultados mostraram que embora os super-supressores sejam formalmente dominantes em um teste simples, testes posteriores indicaram que este tipo de dominância precisa ser melhor interpretado em sistemas genéticos envolvendo dois genomas fisicamente separados.

SEALE (1976), classificou fenotipicamente oito super-supressores de *Neurospora* de acordo com suas habilidades para suprimir dez alelos testados. Ao menos dez loci super-supressores em *Neurospora* exibem efeitos fenotípicos de supressores nonsense, segundo o autor. Os oito super-supressores foram divididos fenotipicamente em sete classes enquanto os dez

primeiros super-supressores caracterizados parecem constituir nove classes fenotipicamente distintas. As divisões em classes foram feitas baseadas no espectro de ação dos super-supressores.

KOHOUT e BERTRAND (1976), estudando o fenômeno da supressão de mutantes citoplasmáticos [*poky*] em *Neurospora crassa* cujas características são baixo crescimento, deficiências em citocromos mitocondriais *aa₃* e *b* mas excesso de citocromo *c* e sistema respiratório cianido-sensível, isolaram seis supressores nucleares designados *sup-1*, *sup-3*, *sup-4*, *sup-5*, *sup-10* e *sup-14*. Os genes supressores *sup* suprimiam o crescimento vagaroso do fenótipo [*poky*] e aliviavam parcialmente a deficiência da atividade respiratória. Os supressores não são alelos. Os autores sugeriram que as mutações supressoras afetam a estrutura e propriedades de proteínas mitocondrio-ribossomais.

No trabalho seguinte, *BERTRAND e KOHOUT (1977)* apresentaram evidências que mostram que o conteúdo de citocromos mitocondriais *aa₃* e *b* em linhagens [*poky*] contendo qualquer um dos seis supressores é significativamente maior que em linhagens [*poky*] não supressoras. Os autores apresentaram considerações a respeito do mecanismo de supressão do caráter de baixo crescimento e deficiências de citocromos de colônias [*poky*] e formularam possíveis explicações para este me

canismo.

No fungo *Aspergillus nidulans*, especificamente de que trata este trabalho, o fenômeno da supressão é relativamente pouco estudado. Os trabalhos iniciais, de modo geral envolvendo o isolamento e caracterização de supressores de algumas marcas genéticas tais como metionina (*meth*), ácido p-aminobenzóico (*paba*), prolina (*pro*), arginina (*arg*), encontram-se referidos no trabalho de MIRANDA FILHO (1972). Recentemente, um volume crescente de investigações envolvendo vários aspectos de supressão em *Aspergillus nidulans* vem sendo desenvolvidas.

Investigando evidências da existência de um sistema regulatório comum do anabolismo e catabolismo da arginina em *Aspergillus nidulans*, CYBIS, PIOTROWSKA e WEGLENSKI (1972) testaram duas mutações recessivas supressoras da prolina, *su E 11* e *su D 19* envolvidas na síntese de ornitina transcarbamilase (OTC), uma das enzimas que participam do catabolismo da arginina.

Em *Aspergillus nidulans*, arginina pode servir como fonte de prolina tanto para linhagens selvagens como para mutantes bloqueados nos primeiros passos do caminho biossintético da prolina. O uso da arginina para a síntese de prolina depende da presença e da indutibilidade (indução) de enzimas do catabolismo da arginina, arginase e OTase. Mutan-

tes com arginase e OTase não reprimidos foram obtidos em *A. nidulans* como supressores de mutações para prolina (BARTINIK e WEGLENSKI, 1974). A existência de um mecanismo comum envolvido na repressão, por glucose e amônio, de enzimas do catabolismo da arginina foi estudado por WEGLENSKI, BARTINIK e GAJEWSKI (1973).

Em *Aspergillus nidulans* o locus *are A* pode ser interpretado como responsável por uma proteína que é capaz de permitir e em alguns casos ser essencial para a síntese de enzimas do metabolismo do nitrogênio, mas que não pode funcionar em presença de amônio (ARST e COVE, 1973a). Mutações no locus *are A*, designadas *are A^h*, podem resultar na incapacidade em utilizar uma grande variedade de fontes de nitrogênio incluindo aminoácidos, purinas, amidas (acetamida), nitrato e nitrito sem contudo afetar o crescimento em amônio (ARST e COVE, 1973a, 1973b; HYNES, 1975); deste modo um número relativamente grande de mutações alélicas *are A* tem sido usadas para estudos genéticos da repressão metabólica do nitrogênio em *Aspergillus nidulans*.

ARST e COVE (1973a, 1973b) relataram a ocorrência de mutações supressoras designadas *cre A^d* que provavelmente conduzem a perda da repressão catabólica do carbono permitindo a utilização por linhagens *are A^h* de prolina e acetamida como fonte de nitrogênio em meio mínimo com glucose; mutações supressoras específicas denominadas *amd^d* e *prn^d* permi-

tem, respectivamente, a utilização de acetamida e prolina em duplos mutantes *are A⁻*.

HYNES (1972), estudando o mecanismo de síntese de amidase que é regulada por repressão pelo crescimento em glucose, isolou dois mutantes designados *amdT 102* e *amdT 19*. O gene *amdT 102*, mais tarde designado *are A 102*, produtor de acetamidase, resulta em uma insensibilidade da enzima a repressão por glucose e seu efeito é semidominante em relação a *amdT⁺*. O gene *amdT 19* resulta em aumento na sensibilidade para repressão por glucose e é recessivo em relação a *amdT⁺* e *amdT 120* no que se refere a síntese de acetamidase. Ambos os genes atuam diferentemente na síntese de outra enzima, a formamidase. Referências de loci supressores de *are A 102*, designadas *sar A* e *sar B* são encontradas em *POLKINGHORNE e HYNES (1975)*. *ARST e SCAZZOCCHIO (1975b)* discutiram a ação de uma mutação constitutiva iniciadora *uap-100*, selecionada como supressora da perda da atividade de transporte de xantina-ácido úrico em uma linhagem *are A-102* (*ARST e COVE, 1973a*).

Considerações adicionais de mutações supressoras envolvidas em estudos genéticos da repressão metabólica do nitrogênio podem ser obtidas em *ARST e McDONALD (1975)*, *ARST e SCAZZOCCHIO (1975a)* e *ARST (1976)*.

RAND e ARST (1977a, 1977b) descreveram a mutação *nis-5*, uma mutação fracamente ligada ao gene estrutural

para nitrato redutase (*nia D*) e nitrito redutase (*niir A*); *nis-5* é uma mutação reguladora que conduz a um baixo nível de atividade de nitrito redutase mas que não afeta a nitrato redutase. Ela suprime parcialmente mutações *niir A⁻* e *are A⁻* para utilização de nitrito.

Estudos mais diretamente relacionados ao fenômeno da supressão são relatados em *Aspergillus nidulans*.

MIRANDA FILHO (1972) e MIRANDA FILHO e AZEVEDO (1974) estudando a supressão da marca *nic8* em *A. 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 8* e *v 10* verificando-se que três supressores (*su 2*, *su 4* e *su 9*) são proximais em relação as marcas e outros quatro (*su 1*, *su 3*, *su 5* e *su 8*) são distais; o supressor *su 7* (que envolve duplicação) tem posição indeterminada e *su 6* e 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.

ARST, SCAZZOCCHIO e KRISTENSEN (1973) estudan-

do a via metabólica de síntese da lisina em *Aspergillus nidulans* isolaram seis loci onde uma mutação pode conduzir a auxotrofia para lisina. Num destes loci, designado *lys B*, uma mutação semidominante *su A 1 lys B* suprime *lys B* para o qual é fracamente locus específica. O supressor mostrou-se fracamente ligado aos genes estruturais da nitrato e nitrito redutase (*nia D* e *nia A*, respectivamente) localizados no grupo de ligação VII.

PASZEWSKI e GRABSKI (1974) investigando a regulação da biossíntese de aminoácidos sulfatados em *A. nidulans* identificaram uma mutação designada *Cys A 1* que suprime o mutante *meth 55* bloqueado para β -cistationase devido a repressão de homocisteína sintetase. LUKESZKIEWICZ e PASZEWSKI (1976) utilizaram a mutação *su A meth* (na qual algumas enzimas da síntese da metionina, incluindo sulfato permease, são constitutivas) para investigar o mecanismo regulatório envolvido na repressão da sulfato permease em *Aspergillus nidulans*.

MENEZES (1974) e MENEZES e AZEVEDO (1978) estudando variantes deteriorados que ocorrem espontaneamente ou através de indução em uma linhagem com duplicação cromossômica em *Aspergillus nidulans*, analisaram a ocorrência de reversões espontâneas e induzida dos determinantes da deterioração obtidos. Uma alta frequência de reversões ocorreu em todos os variantes deteriorados analisados; de nove reversões estudadas, oito delas mostraram que o mecanismo de reversão

é devido a genes supressores e apenas uma foi devida a reversão verdadeira. Os supressores estavam localizados em quase todos os diferentes grupos de ligação do fungo; nos casos em que supressores de diferentes deteriorados estavam localizados no mesmo grupo de ligação, o teste de alelismo mostrou que estes genes não eram alelos indicando uma possível especificidade de ação.

Para explicar o mecanismo de ação dos supressores foi postulado um mecanismo com base no sistema de regulação em cascata.

WARING e SCAZZOCCHIO (1976), obtiveram, através do mutagênico nitrosoguanidina, duas classes de revertantes de uma mutação citoplasmática (CS 67) que confere sensibilidade ao calor em *Aspergillus nidulans*. Uma das classes compreende supressor nuclear mapeado em dois loci localizados nos cromossomos III e VII. A segunda classe de revertantes consiste em herança citoplasmática. Oito genes supressores restauraram o crescimento da linhagem selvagem a 20°C enquanto dois resultaram em supressão parcial do fenótipo sensível a baixa temperatura.

OLIVEIRA (1978), estudando mutantes derivados de linhagens *lys*⁻, capazes de resistir a concentrações de arginina que inibem o crescimento da linhagem original, constatou que o desaparecimento do fenótipo *lys*⁻ poderia ser atri-

buido a supressão do gene *lys A 1*. Analisando geneticamente mutantes obtidos espontaneamente e por indução através de luz ultra-violeta ou EMS, verificou que o fenótipo *lys*⁻ havia desaparecido por ação de genes supressores do gene *lys A 1*. Nove genes mutantes foram mapeados em seis dos oito grupos de ligação do *Aspergillus nidulans*: três supressores estavam no grupo de ligação III, dois supressores estavam no grupo de ligação II, um no grupo de ligação IV, um no grupo VI, um no grupo VII e um supressor no grupo de ligação VIII. O teste de alelismo revelou que os dois mutantes mapeados no grupo de ligação II não eram alelos e os três mutantes do grupo de ligação III eram alelos, resultando então sete diferentes supressores. Em apenas um caso houve evidência de reversão verdadeira *lys A 1* para *lys A 1*⁺.

As primeiras evidências de mutações super-supressoras em *Aspergillus nidulans* foram descritas por BAL, MACIEJKO, KAJTANIAK e GAJEWSKI (1978) que obtiveram reversões simultâneas de mutações em dois loci diferentes da linhagem *yA 2*; *adA 24*; *metG 4*; *phenA 2* de *Aspergillus nidulans*. As reversões para os loci *ad A* e *met G* mostraram serem devidas a mutações supressoras monogênicas. Dos sete supressores analisados (*sup 1*, *sup 2*, *sup 3*, *sup 4*, *sup 5*, *sup 6* e *sup 7*), *sup 3* suprime somente o requisito para adenina, *sup-5* suprime somente o requisito para metionina enquanto os cinco demais supressores suprimem tanto as mutações *met G 4* como *ad A 24*, cons

tituindo-se, portanto, em genes super-supressores. As mutações supressoras são locus não específicas e sítio específicas; isto torna possível que elas sejam supressoras de mutações non-sense.

Mutações supressoras alelo-específicas isoladas por co-reversão de mutações em *Aspergillus nidulans* foram parcialmente caracterizadas por ROBERTS, MARTINELLI e SCAZZOCCHIO (1978). Ao menos um supressor atua simultaneamente em um alelo para três loci *alx*, *sB* e *alc A*, especificando alantoniase, sulfato permease e álcool desidrogenase, respectivamente. Vários outros alelos atuam conjuntamente nas mutações *sB* e *alx*. Evidências iniciais identificaram duas mutações supressoras, *sup-101* e *sup-105*, no mesmo locus no grupo de ligação III. O supressor *sup-105* somente suprime *alx 4* enquanto *alx 4*, *sB 43* e *alc A 125* são co-suprimidas por *sup 101* indicando, portanto, que este locus supressor pode exibir heterogeneidade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Símbolos e fenótipos dos mutantes utilizados

Símbolos	Fenótipos
Morfológicos	
<i>wa</i> ₃	Conídios brancos
<i>ya</i> ₂	Conídios amarelos
Nutricionais	
<i>adE</i> ₂₀	Requisito para adenina
<i>proA</i> ₁	Requisito para prolina
<i>pabaA</i> ₆	Requisito para ácido p-aminobenzóico
<i>pyroA</i> ₄	Requisito para piridoxina
<i>sB</i> ₃	Requisito para tiosulfato
<i>nicB</i> ₈	Requisito para ácido nicotínico
<i>riboB</i> ₂	Requisito para riboflavina
Fontes de carbono	
<i>facA</i> ₃₀₃	Não crescimento em meio contendo acetato como única fonte de carbono.
<i>galA</i> ₁	Não crescimento em meio de galactose como única fonte de carbono.

Supressores

su nicB₈

Supressor do mutante *nicB₈*

su A₁adE₂₀

Supressor do mutante *adE₂₀*

A origem, descrição e localização dos mutantes utilizados podem ser encontrados em DORN (1967), CLUTERBUCK (1973) e CLUTERBUCK (1974).

4.2. Linhagens utilizadas

4.2.1. Linhagem MSE (Master Strain E) contendo marcadores genéticos em todos os oito grupos de ligação (McCULLY e FORBES, 1965) como se observa na Figura 1.

Grupos de ligação	Marcadores genéticos		
	<i>su A₁adE₂₀</i>	<i>yA₂</i>	<i>adE₂₀</i>
I		o	
	<i>uA₃</i>		
II		o	
	<i>galA₁</i>		
III		o	
		<i>pyroA₄</i>	
IV		o	
		<i>lacA₃₀₃</i>	
V		o	
	<i>ΔB₃</i>		
VI			
		<i>nicB₈</i>	
VII		o	
		<i>riboB₂</i>	
VIII		o	

Figura 1 - Marcadores genéticos da linhagem MSE.

Obs.: Os centrômeros estão representados por "o". As posições dos marcadores genéticos não estão em escala no mapa. Os fenótipos dos marcadores genéticos podem ser encontrados no item 4.1.

4.2.2. Linhagem *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂

Contém marcadores genéticos no grupo de ligação I conforme constituição genética apresentada na Figura 2.

Grupos de ligação	Marcadores genéticos
I

Figura 2 - Marcadores genéticos da linhagem *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂.

Obs.: O centrômero está representado por "o". As posições dos marcadores genéticos não estão em escala no mapa. Os fenótipos dos marcadores genéticos podem ser encontrados no item 4.1.

4.2.3. Linhagem *níc*⁺

Prototrófica para todos os marcadores genéticos da linhagem MSE, obtida como segregante de um cruzamento entre as linhagens MSE e *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂ (FAVRAUD e AZEVEDO, 1978).

As duas primeiras linhagens utilizadas foram obtidas da coleção existente no Setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, sendo originárias do Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra; a terceira linhagem foi gentilmente ce

dida por *FAVRAUD*, Setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética, ESALQ, USP.

As linhagens foram mantidas em tubos de ensaio com meio completo em ágar inclinado à cerca de 4°C, com repurificação a intervalos de seis meses.

A linhagem MSE foi utilizada para obtenção de genes supressores do mutante *nícB₈*. Os mutantes supressores foram mantidos em estoque como anteriormente referido.

4.3. Meios de cultura

4.3.1. Meio mínimo (*PONTECORVO et alii, 1953*)

Nitrato de sódio (NaNO ₃)	6,00 g
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O). . .	0,52 g
Fosfato dihidrogenado de potássio (KH ₂ PO ₄) . . .	1,52 g
Cloreto de potássio (KCl).	0,52 g
Sulfato de ferro (FeSO ₄)	0,01 g
Sulfato de zinco (ZnSO ₄)	0,01 g
Glicose	10,00 g
Ágar	15,00 g
Água destilada	1.000 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4%.

4.3.2. Meio completo (*PONTECORVO et alii, 1953*)

Adicionou-se ao meio mínimo:

Peptona	2,00 g
Caseína hidrolisada.	1,50 g

Extrato de levedura 0,50 g
 Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras . . 2,5 ml
 Solução de vitaminas 1,0 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4%.

4.3.3. Meio de galactose

Preparado da mesma forma que o meio mínimo (item 4.3.1.) apenas substituindo-se a glicose por galactose como fonte de carbono.

4.3.4. Meio de acetato de amônio (APIRION, 1962)

Acetato de amônio 12,00 g
 Fosfato dihidrogenado de potássio (KH_2PO_4) . . . 3,00 g
 Cloreto de sódio (NaCl) 2,00 g
 Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).. 0,50 g
 Sulfato de ferro (FeSO_4) 0,01 g
 Sulfato de zinco (ZnSO_4) 0,01 g
 Ágar 15,00 g
 Água destilada 1.000 ml

O pH foi ajustado para 6,1 com NaOH 4%.

4.3.5. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

Ao meio mínimo líquido adicionou-se 2% de meio completo também líquido. Distribuiu-se 2,5 ml da mistura em tubos de ensaio, autoclavando-os em seguida.

4.4. Soluções

4.4.1. Solução de ácido nucleico de leveduras

Ácido nucleico de leveduras - 2 g em 15 ml de solução 1 N de HCl.

Ácido nucleico de leveduras - 2 g em 15 ml de solução 1 N de NaOH.

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

4.4.2. Solução de vitaminas

Riboflavina	100,0 mg
Ácido nicotínico	100,0 mg
Aneurina (tiamina).	50,0 mg
Piridoxina.	50,0 mg
Ácido p-aminobenzóico	10,0 mg
Biotina	0,2 mg
Água destilada esterilizada	100,0 ml

A solução foi aquecida em banho-maria durante 15 minutos e conservada em frasco escuro no refrigerador a 4°C , sob clorofórmio.

4.4.3. Suplementos adicionados ao meio mínimo

Foram preparadas soluções estoques de suplementos adicionando-se a cada um deles 100 ml de água destila

da esterilizada. As soluções foram aquecidas em banho-maria durante 15 minutos e conservadas em frasco escuro no refrigerador a 4°C.

Solução estoque (100 ml de H ₂ O)		Quantidade adicionada por placa (20 ml de meio de cultura)	Concentração final do meio de cultura
Tiossulfato de sódio	2,0 mg	0,1 ml	100,00 µg/ml
Prolina	1,0 mg	0,1 ml	50,00 µg/ml
Adenina	500,0 mg	0,1 ml	25,00 µg/ml
Riboflavina	10,0 mg	0,1 ml	0,50 µg/ml
Ácido nicotínico	10,0 mg	0,1 ml	0,50 µg/ml
Piridoxina	5,0 mg	0,1 ml	0,25 µg/ml
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	5,0 mg	0,1 ml	0,25 µg/ml

4.4.4. Solução de tween - 0,1% (V/V)

tween 80	0,1 ml
Água destilada	100 ml

Distribuiu-se 2,5 ml da solução em tubos de ensaio, autoclavou-se e conservou-se à temperatura ambiente.

4.4.5. Solução salina (0,89%)

NaCl	8,9 g
Água destilada	1.000 ml

Distribuiu-se 9,0 ml da solução em frascos, autoclavou-se e conservou-se à temperatura ambiente.

4.4.6. Solução de cloroneb - 2% (1,4 - dicloro - 2,5 - dimetoxil benzeno)

Cloroneb (Dupon do Brasil S/A - princípio ativo = 65%) 100 mg
Água destilada esterilizada 50 ml

A solução foi aquecida em banho-maria durante 15 minutos e conservada em frasco escuro no refrigerador a 4°C.

4.5. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções de tween e salina foram sempre esterilizadas em autoclave durante 15 minutos a pressão de 1 atmosfera.

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

4.6. Placas de análise

Para as análises genéticas das colônias foram utilizadas placas de Petri de 10 cm de diâmetro, contendo meio completo, meio mínimo, meio mínimo suplementado com todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento e meio míni-

mo suplementado com todos os requisitos nutricionais, exceto aquele sob análise. Utilizaram-se também placas contendo meio de galactose e placas contendo meio de acetato de amônio suplementados com todos os requisitos nutricionais.

4.7. Tratamento com mutagênico

Com a finalidade de aumentar a frequência de mutação, a linhagem MSE foi submetida a tratamento com luz ultra-violeta.

Conídios de colônias de três a quatro dias de incubação foram suspensos em tubos contendo 2,5 ml de tween e agitados para desagregação das cadeias. A quantidade de conídios da suspensão foi estimada em hematímetro (câmara de Neubauer) e em seguida retirou-se 1 ml da suspensão e diluiu-se em 9 ml de salina. Uma alíquota desta diluição foi utilizada para obtenção de mutantes espontaneamente e a suspensão restante foi transferida para uma placa de Petri esterilizada para irradiação. A lâmpada utilizada foi a Mineralight (253 nm) a 14 centímetros de distância da suspensão de conídios ao filamento. O tempo de irradiação foi de dois minutos, tempo este adequado para se obter uma sobrevivência de 1 a 5% a irradiação ultra-violeta para a linhagem MSE (*PIZZI-RANI, comunicação pessoal*).

4.8. Obtenção de supressores

As suspensões de confídios foram preparadas conforme o ítem 4.7; o procedimento inicialmente adotado foi o seguinte:

a) A alíquota de 1 ml retirada da diluição inicial foi transferida para frasco contendo 9 ml de salina; dessa nova diluição foram semeados 0,1 ml por placa contendo meio mínimo suplementado com piridoxina, tiossulfato de sódio e riboflavina para a obtenção espontânea de mutantes.

b) Da suspensão irradiada, ítem 4.7., 1 ml foi transferido para frasco com 9 ml de solução salina; desta nova diluição foram semeados 0,1 ml por placa contendo meio mínimo suplementado com piridoxina, tiossulfato de sódio e riboflavina para obtenção de mutantes induzidos.

Desta mesma suspensão foram semeados, após diluições apropriadas, 0,1 ml por placa contendo meio completo para determinação da porcentagem de sobrevivência.

Nos experimentos para obtenção de supressores que se seguiram, de modo a evitar diluições da suspensão de confídios, além da inicial, alíquotas de 0,1 ml desta foram diretamente semeadas em placas com meio conforme já descrito, tantas alíquotas quantas necessárias (de 15 a 20), repetindo-se este procedimento também para a suspensão irradiada.

Após 72 horas de incubação observou-se e anotou-se o crescimento das colônias nas placas destinadas a obtenção de supressores espontaneamente e por indução. As colônias foram então purificadas em meio completo. Do mesmo modo, anotou-se o crescimento das colônias nas placas destinadas a determinação da porcentagem de sobrevivência.

4.9. Ensaio de supressão e isolamento de supressores

Com a finalidade de se determinar a exatidão do caráter supressor, as colônias independentes de ácido nicotínico exógeno obtidas conforme o ítem anterior foram organizadas em placas de 26 pontos em meio completo, placas mestras, inoculando-se cada uma das colônias em um dos pontos da placa (AZEVEDO, 1973). Confeccionou-se tantas placas quantas necessárias para testar um número significativo de colônias purificadas e de acordo com a sequência das mesmas nas placas, cada colônia recebeu um número inicial de identificação.

As placas assim organizadas foram replicadas por meio de um replicador multifio (AZEVEDO *et alii*, 1976) para placas contendo meio completo, meio mínimo suplementado com piridoxina, riboflavina, tiosulfato de sódio e ácido nicotínico e meio mínimo suplementado com todos os requisitos anteriores a exceção de ácido nicotínico. As leituras do crescimento das colônias foram realizadas nos tempos de 36, 48, 72

e 96 horas de incubação e os supressores isolados após uma repetição.

4.10. Porcentagem de sobrevivência a irradiação

Um cálculo estimativo do número de conídios viáveis após a irradiação com luz ultra-violeta pode ser feito adotando-se o procedimento relatado no item 4.8.

O número de conídios sobreviventes, por mililitro de suspensão semeada, foi determinado considerando-se todas as diluições efetuadas e o número médio de colônias sobreviventes em cada placa. A porcentagem de sobrevivência foi calculada pela fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de conídios sobreviventes}}{N^{\circ} \text{ de conídios da suspensão inicial}} \times 100$$

4.11. Frequência de supressão

Devido ao fato de podermos detectar inicialmente colônias independentes de ácido nicotínico exógeno, colônias nic^{+} , e posteriormente colônias realmente supressoras da marca genética $nicB_{8}$, devemos calcular duas frequências de supressão, a aparente e a real, respectivamente.

4.11.1. Frequência aparente de supressão

O cálculo da frequência aparente de supressão foi executado segundo as fórmulas:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de colônias nic}^{+} \text{ encontrado}}{N^{\circ} \text{ de conídios da suspensão inicial}} \times 1.10^6 = \text{supressão espontânea}$$

$$\frac{N^{\circ} \text{ de colônias nic}^{+} \text{ encontrado}}{N^{\circ} \text{ de conídios sobreviventes}} \times 1.10^6 = \text{supressão induzida}$$

onde:

N° de colônias nic^{+} = número médio encontrado em dez placas já que foram semeados 0,1 ml por placa, isto é, 1 ml total.

1×10^6 = taxa normal de ocorrência de mutações viáveis.

4.11.2. Frequência real de supressão

Determinou-se identicamente à frequência aparente de supressão, apenas substituindo-se o número de colônias nic^{+} pelo número "determinado" de colônias supressoras que foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de colônias nic}^{+} \text{ encontrado} \times N^{\circ} \text{ de colônias supressoras obtido}}{N^{\circ} \text{ de colônias nic}^{+} \text{ ensaiadas}}$$

4.12. Ensaio de super-supressão

Para se determinar se as colônias supressoras da marca genética *nícB₈* tinham capacidade de suprimir, conjuntamente, outra deficiência nutricional além de ácido nicotínico, as colônias isoladas foram organizadas em placas mestras de 26 pontos e com auxílio do replicador multifio foram inoculadas em placas de Petri contendo os seguintes meios de cultura:

- Meio mínimo.
- Meio mínimo suplementado com piridoxina, riboflavina, tiossulfato de sódio e ácido nicotínico.
- Meio mínimo suplementado com todos os requisitos anteriores exceto ácido nicotínico, ácido nicotínico e tiossulfato de sódio, ácido nicotínico e riboflavina e ácido nicotínico e piridoxina, respectivamente.

Decorridas 48, 72 e 96 horas de incubação foram efetuadas leituras do crescimento das colônias. O experimento foi realizado com três repetições sendo que cada repetição era uma réplica do crescimento observado na última leitura da montagem anterior.

4.13. Ensaio de crescimento

Confídios de colônias com cinco dias de incubação foram suspensos em tubos contendo 2,5 ml de tween e agitados para desagregação das cadeias. As quantidades de confí-

dios das suspensões foram estimadas em aproximadamente 10^7 a 10^8 confídios por ml.

Utilizando-se de um fio de níquel-cromo as suspensões de confídios de colônias supressoras da marca *nícB₈* e da linhagem *níc⁺* foram inoculadas em placas de Petri contendo meio mínimo suplementado com piridoxina, riboflavina e tiosulfato de sódio; para a inoculação da suspensão de confídios da linhagem MSE as placas continham meio suplementado como anteriormente ao qual se adicionou ácido nicotínico.

A inoculação foi feita imergindo-se o fio de níquel-cromo na suspensão de confídios e tocando-se pontualmente, uma só vez, no centro geométrico da placa. Medidas do crescimento em diâmetro das colônias foram feitas nos tempos de 72, 96, 120 e 144 horas de incubação.

Os diâmetros das colônias foram medidos com o auxílio de um contador de colônias (Hellige). Retirada a tampa, a placa era invertida sobre o campo visual do contador e os centros geométricos de ambos sincronizados; sobre o eixo horizontal do campo visual do contador eram assinalados nas laterais da placa dois pontos de referência. Girando-se a placa no sentido anti-horário sobre o campo visual do contador, quando os pontos de referência superpunham-se a cada um dos quatro eixos que dividem o círculo em oito semi-círculos iguais, com o auxílio de uma régua milimétrica (sempre a mesma) efe-

tuavam-se as medidas dos limites das colônias nas posições coincidentes com o eixo horizontal do campo do contador.

A luz de fundo do contador de colônias aliada a lente de aumento colocada à frente do observador possibilitam uma visualização melhorada dos limites da colônia contribuindo para o aperfeiçoamento das medidas.

O experimento foi conduzido com três repetições, sendo medidos os diâmetros de quatro colônias em cada repetição tanto para supressores como para controles.

4.14. Técnicas de análises genéticas

4.14.1. Obtenção de heterocários

Para obtenção de heterocários procedeu-se de acordo com o método descrito por *PONTECORVO et alii* (1953). Em tubos de ensaio contendo meio mínimo líquido mais 2% de meio completo foram colocados conídios da linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₂* e de uma das colônias supressoras da marca genética *nicB₈* ou da linhagem MSE. O meio completo favorece um pequeno crescimento das hifas, o suficiente para que possa haver anastomose entre elas. Após três a quatro dias de incubação formou-se uma película na superfície do meio. Esta película foi removida, recortada e transferida para placas com meio mínimo sólido as quais após sete a dez dias de incubação desenvolveram setores tipicamente heterocarióticos que continham núcleos geneticamente dis-

tintos na mesma hifa, o que permitiu o crescimento.

4.14.2. Teste do heterocário

Os heterocários foram ensaiados de acordo com o método descrito por *JINKS (1963)*. Através deste ensaio pode-se determinar se o caráter supressor das colônias era condicionado por fator citoplasmático ou não.

Os heterocários foram preparados conforme o item 4.14.1. Com o auxílio de uma alça de platina retiraram-se conídios formados pelo heterocário, transferindo-os para tubos com soluções de tween. Após diluições convenientes foram semeados 0,1 ml em placas contendo meio completo que depois de três dias de incubação exibiram colônias brancas e amarelas, respectivamente colônias supressoras e linhagem *proA₁*; *pabaA₆*; *yA₂* envolvidas no cruzamento. As colônias supressoras foram transferidas para placas de análise contendo meio mínimo, meio mínimo suplementado com piridoxina, riboflavina, tiosulfato de sódio e ácido nicotínico e meio mínimo suplementado como anteriormente, exceto ácido nicotínico. Decorridas 36, 48 e 72 horas de incubação efetuou-se a leitura das placas anotando-se o crescimento das colônias.

4.14.3. Análise mitótica

A análise mitótica foi desenvolvida através do

ciclo parassexual, segundo o método descrito por *PONTECORVO et alii*, 1954. Nos setores heterocarióticos obtidos de acordo com o item 4.14.1., a maioria dos conídios formados são haplóides e por consequência não se desenvolvem em meio mínimo; porém, pode ocorrer fusão de núcleos haplóides formando núcleos diplóides heterozigóticos que originam conídios diplóides (*ROPER*, 1952) os quais são capazes de se desenvolverem em meio mínimo.

Pelo fato da porcentagem de aparecimento de conídios diplóides ser muito baixa, grande número de conídios de setores tipicamente heterocarióticos foram transferidos para solução de tween (aproximadamente 10^7 conídios por ml) sendo semeados em placas contendo meio mínimo. Após 72 horas de incubação isolaram-se diplóides heterozigotos.

A identificação dos diplóides é baseada em sua capacidade de crescimento em meio mínimo e no tamanho dos conídios (*ROPER*, 1952). A medição dos conídios foi feita em microscópio com ocular micrométrica, tomando-se cadeias de cinco conídios em lâminas com lisol diluído (1:10).

A indução para haploidização dos diplóides foi feita usando-se cloroneb (*AZEVEDO e SANTANA*, 1975) que inibe o crescimento de diplóides. A haploidização ocorre através de aneuploidia com perdas sucessivas de cromossomos (*KÄFER*, 1961). A técnica consiste em inocular-se conídios em quatro

pontos equidistantes na placa onde foi colocado meio completo que recebeu a droga na proporção de 25 µg/ml de meio de cultura. Após sete a dez dias de incubação surgiram setores brancos e amarelos que foram purificados em meio completo e a seguir inoculados um a um em 26 pontos fixos em placa com meio completo. Após três dias de incubação essa placa serviu como placa mestra que foi replicada para placas de análise por meio do replicador multifio. As leituras das placas foram feitas com 36, 48 e 72 horas de incubação, anotando-se as colônias que cresceram e as que não cresceram.

4.14.4. Análise meiótica

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

Os heterocários obtidos conforme o item 4.14.1., foram transferidos para placas com meio mínimo; as placas foram convenientemente vedadas com fita celulósica para propiciar a formação de cleistotécios e incubadas por dez dias (*AZEVEDO, 1973*). Findo este período de incubação os cleistotécios de maior tamanho (*BARACHO, AZEVEDO e VENCovsky, 1970*) foram removidos sob lupa e rolados em meio mínimo para retirar os conídios aderentes e as células de Hülle. Cada cleis-

totécio limpo foi transferido para tubos de ensaio contendo solução de tween e com o auxílio de uma pipeta foram esmagados contra as paredes do tubo libertando os ascósporos. Com a mesma pipeta foram lavadas as paredes do tubo suspendendo-se deste modo os ascósporos na solução de tween. De cada suspensão foram realizadas diluições de 1:10 em salina e a suspensão restante conservada no refrigerador. Dos frascos de salina foram semeados 0,1 ml em placas com meio completo e o restante também guardado no refrigerador. Após 72 horas de incubação foi possível verificar se os cleistotécios eram híbridos, escolhendo-se um entre eles para análise dos ascósporos.

Os ascósporos do cleistotécio selecionado foram semeados em placas contendo meio completo e após 72 horas de incubação foram transferidos para placas mestras em meio completo. Depois de três dias de incubação as 26 colônias foram replicadas para as placas de análise por meio de um replicador multifio. As leituras das placas foram feitas com 36, 48 e 72 horas de incubação anotando-se o crescimento ou não das colônias.

4.15. Análise estatística

As medidas do crescimento em diâmetro das colônias supressoras (item 4.13.) foram analisadas estatisticamente.

A análise da variância foi feita segundo o delineamento em parcelas subdivididas (*STEEL e TORRIE, 1960*). Para detectar as diferenças no crescimento de cada mutante supressor com a linhagem MSE original e a linhagem *níc⁺* (controles) foi aplicado o teste de Dunnett (*STEEL e TORRIE, 1960*) através da fórmula:

$$dms = t_{(tabela)} \sqrt{2 s^2 R/r}$$

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção de supressores

Colônias metabolicamente independentes de ácido nicotínico exógeno (nic^+), foram obtidas espontaneamente e por indução através de luz ultra-violeta em quatro experimentos distintos a partir da linhagem MSE, pelo método descrito no ítem 4.8.

Os números correspondentes de colônias obtidas em cada experimento encontram-se ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Colônias independentes de ácido nicotínico exógeno obtidas espontaneamente e induzidas por luz ultra-violeta (resultado de quatro experimentos).

Experimento número	Supressão	Placas se- meadas	Colônias nic^+ obtidas	Total
I	Espontânea	15	25	73
	Induzida	15	48	
II	Espontânea	20	75	171
	Induzida	20	96	
III	Espontânea	14	70	196
	Induzida	14	126	
IV	Espontânea	18	57	139
	Induzida	20	82	

Após purificação em meio completo as colônias nic^+ obtidas foram submetidas a teste de supressão.

5.2. Ensaio de supressão e isolamento de supressores

A finalidade do presente ensaio foi o de eliminar possíveis fenócópias ou instabilidade que possam ter sido responsáveis pelo caráter nic^+ exibido pelas colônias que se mostraram hábeis em crescerem em meio mínimo não suplementado com ácido nicotínico (item 5.1.), determinando-se assim o número real de colônias definitivamente supressoras.

Para facilitar a identificação e execução de ensaios posteriores as colônias, quando crescendo em meio mínimo não suplementado com ácido nicotínico, foram divididas em grupos de acordo com suas características morfológicas. A descrição destas características encontra-se na Tabela 2.

Em função do elevado número de colônias encontrado, uma amostra significativa de cada tratamento teve seu real caráter supressor ensaiado conforme descrito no item 4.9. A Tabela 3 apresenta os resultados colhidos neste ensaio.

Tabela 2 - Características morfológicas das colônias independentes de ácido nicotínico exógeno.

Grupo	Crescimento	Morfologia	Identificação
G ₁	Relativamente grande	Bem desenvolvida, densa conidiação, inicialmente branca tornando-se rosada.	Grande
G ₂	Variado	Conidiação esparsa, cor rosada.	Esparsa
G ₃	Médio	Desenvolvimento limitado, pouca conidiação, cor rosada ou acinzentada.	Semi-compacta
G ₄	Pequeno	Desenvolvimento compacto, pouca conidiação, cor branca.	Compacta
G ₅	Variado	Desenvolvimento irregular, micélio aéreo, conidiação escassa, inicialmente branca tornando-se rosada.	Micelial

Tabela 3 - Colônias independentes de ácido nicotínico exógeno que exibiram real caráter supressor.

Experi- mento	Supressão	Colônias ensaiadas	Supressores obtidos	Porcen- tagem
I	Espontânea	23	8	34,78%
	Induzida	44	31	70,45%
II	Espontânea	50	25	50,00%
	Induzida	50	38	76,00%
III	Espontânea	25	16	64,00%
	Induzida	25	18	72,00%
IV*	Espontânea	(57)	29	50,00%
	Induzida	(82)	60	73,12%

*Valores estimativos uma vez que o teste de supressão somen
te foi executado para os três primeiros experimentos.

Após obtidas as colônias realmente supressoras da marca genética *nícB₈*, 40 delas foram isoladas e estocadas em tubos contendo meio mínimo inclinado suplementado com todos os requisitos nutricionais, exceto ácido nicotínico. A título de estabelecer uma conotação preliminar para estes isolados, ao número inicial de identificação (item 4.9.) acrescentou-se o símbolo "su" conforme está ilustrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Conotação preliminar atribuída aos supressores isolados, obtidos espontaneamente e por indução.

Supressores obtidos espontaneamente				Supressores obtidos por indução			
su 45 (G ₄)	su 51 (G ₄)			su 3 (G ₁)	su 6 (G ₁)	su 8 (G ₁)	
su 59 (G ₃)	su 63 (G ₅)			su 13 (G ₄)	su 20 (G ₃)	su 23 (G ₃)	
su 65 (G ₅)	su 120 (G ₁)			su 25 (G ₃)	su 26 (G ₂)	su 31 (G ₂)	
su 121 (G ₁)	su 122 (G ₁)			su 34 (G ₂)	su 37 (G ₂)	su 42 (G ₂)	
su 124 (G ₁)	su 135 (G ₃)			su 43 (G ₂)	su 70 (G ₁)	su 79 (G ₁)	
su 138 (G ₃)	su 143 (G ₅)			su 82 (G ₁)	su 85 (G ₁)	su 92 (G ₄)	
su 150 (G ₅)	su 158 (G ₂)			su 97 (G ₄)	su 101 (G ₃)	su 105 (G ₃)	
su 166 (G ₂)				su 106 (G ₃)	su 109 (G ₂)	su 112 (G ₂)	
				su 116 (G ₂)			

(G) - Representa o grupo morfológico em que foram classificados (Tabela 2).

5.3. Porcentagem de sobrevivência a irradiação

Determinados de acordo com o exposto no item 4.10., em cada experimento, os valores para a sobrevivência

vência dos confídios irradiados encontram-se relatados na Tabela 5.

Tabela 5 - Porcentagem de sobrevivência dos confídios submetidos a irradiação com luz ultra-violeta.

Experimento	Número de confídios da suspensão inicial	Número de confídios sobreviventes	Porcentagem de sobrevivência
I	$1,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^5$	16,66%
II	$1,9 \times 10^6$	$2,9 \times 10^4$	1,53%
III	$1,6 \times 10^6$	$3,6 \times 10^4$	2,25%
IV	$2,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^4$	1,30%

5.4. Frequência aparente e frequência real de supressão

Equacionados segundo os raciocínios descritos nos itens 4.11.1. e 4.11.2., os dados referentes as frequências aparente e real de supressão encontram-se ilustrados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

5.5. Ensaio de super-supressão

Quando se observa o efeito produzido por certas mutações, notadamente as induzidas, percebe-se que, em certos casos, este efeito pode se sobrepor em relação a mais de um aspecto metabólico do material genético mutado. Relativamente ao caráter de supressão, uma mutação pode sobrepor seu

Tabela 6 - Frequência aparente de supressão do caráter nic^+ obtida espontaneamente e por indução através de luz ultra-violeta.

Experi- mento nº	Supressão	Colônias nic^+ encontradas	Placas semeadas	Média em dez placas	Frequên- cia em 10^6
I	Espontânea	25	15	17,0	113
	Induzida	48	15	32,0	128
II	Espontânea	75	20	37,5	20
	Induzida	96	20	48,0	1.655
III	Espontânea	70	14	50,0	32
	Induzida	126	14	90,0	2.500
IV	Espontânea	57	18	31,6	16
	Induzida	82	20	41,0	1.576

O número de confídios da suspensão inicial e de confídios sobreviventes são os mesmos apresentados na Tabela 5.

Tabela 7 - Frequência real de supressão do caráter nic⁺ obtida espontaneamente e por indução através de luz ultra-violeta.

E. nº	Supressão	Colônias nic ⁺ en- contradas	Colônias nic ⁺ en- saídas	Supres- sores obtidos	Supres- sores determi- nados	Média em dez pla- cas	Frequên- cia em 10 ⁶
I	Espontânea	25	23	8	8,7	5,8	39
	Induzida	48	44	31	33,8	22,5	90
II	Espontânea	75	50	25	37,4	18,7	10
	Induzida	96	50	38	73,0	36,5	1.250
III	Espontânea	70	25	16	44,8	32,0	20
	Induzida	126	25	18	90,7	65,0	1.806
IV	Espontânea	57	-	-	(29,0)	16,0	8
	Induzida	82	-	-	(60,0)	30,0	1.154

() - determinado estimativamente.

E. - experimento.

O número de confídios da suspensão inicial e de confídios sobreviventes são os mesmos apresentados na Tabela 5.

efeito metabólico e suprimir mais que uma deficiência nutricional, sendo neste caso denominada mutação super-supressora.

No teste conduzido para verificar a possibilidade de ocorrência de mutações super-supressoras (item 4.12.), 40 isolados ensaiados, em três repetições, mostraram que 22 supressores da marca genética *nícB₈* tinham também habilidade de crescerem em meio mínimo não suplementado com ácido nicotínico e tiosulfato de sódio, um supressor tinha habilidade de crescer em meio mínimo não suplementado com ácido nicotínico e piridoxina e que não houve crescimento algum quando riboflavina não se achava presente no meio de cultura.

A Tabela 8 é uma ilustração dos supressores que exibiram alguma habilidade de crescer em meio onde não estavam presentes dois requisitos nutricionais.

Para melhor ilustrar o desenvolvimento seguido durante a realização do ensaio, a Tabela 9 apresenta uma dinâmica do processo incluindo-se o resultado final obtido.

5.6. Ensaio de crescimento

Medidas do crescimento em diâmetro das colônias de 14 supressores e dois controles, efetuados de acordo com o descrito no item 4.13., apresentaram os resultados que são relacionados na Tabela 10.

Tabela 8 - Supressores de ácido nicotínico independentes de tiossulfato de sódio ou piridoxina.

Supressores de ácido nicotínico independentes de tiossulfato de sódio			Supressores de ácido nicotínico independentes de piridoxina		
su 3	su 6	su 8			su 42
su 25	su 34	su 42			
su 43	su 51	su 59			
su 63	su 65	su 70			
su 79	su 82	su 101			
su 105	su 116	su 120			
su 121	su 122	su 138			
su 143					

Tabela 9 - Dinâmica do ensaio de super-supressão.

Repetição	Meios de cultura	Colônias inoculadas	Crescimento e Incubação			Total parcial	Total final
			48 hs	72 hs	96 hs		
Primeira	MM	40	0	0	0	0	
	MM + T	40	40	40	40	40	
	MM + T ⁻ⁿ	40	40	40	40	40	
	MM + T ^{-ns}	40	21	27	32	32	
	MM + T ^{-np}	40	12	12	13	13	
	MM + T ^{-nr}	40	2	2	2	2	
Segunda	MM	40	0	0	0	0	
	MM + T	40	40	40	40	40	
	MM + T ⁻ⁿ	40	40	40	40	40	
	MM + T ^{-ns}	32	24	24	24	24	
	MM + T ^{-np}	13	7	8	9	9	
	MM + T ^{-nr}	2	1	1	1	1	
Terceira	MM	40	0	0	0	-	0
	MM + T	40	40	40	40	-	40
	MM + T ⁻ⁿ	40	40	40	40	-	40
	MM + T ^{-ns}	24	22	22	22	-	22
	MM + T ^{-np}	9	1	1	1	-	1
	MM + T ^{-nr}	1	0	0	0	-	0

onde:

MM = meio mínimo.

MM + T = meio mínimo suplementado com ácido nicotínico, piridoxina, riboflavina e tiosulfato de sódio.

MM + T^{-(n, ns, np, nr)} = meio mínimo suplementado com os requisitos nutricionais citados, exceto ácido nicotínico, ácido nicotínico e tiosulfato de sódio, ácido nicotínico e piridoxina e ácido nicotínico e riboflavina, respectivamente.

Para efeito de controle, a placa em meio mínimo da segunda e terceira repetições eram réplicas das placas MM + T das repetições anteriores.

Tabela 10 - Medidas do crescimento em diâmetro, em milímetros, de colônias de 14 supressores e dois controles em quatro tempos de incubação.

Supressores	Tempos de incubação			
	72 hs.	96 hs.	120 hs.	144 hs.
MSE*	30,56	42,56	54,75	67,73
nic ⁺ *	32,08	43,54	54,41	62,50
su 8	17,58	22,75	27,89	32,48
su 25	10,54	16,58	22,64	27,68
su 45	10,00	15,83	22,92	30,57
su 63	29,41	41,16	52,88	64,67
su 70	28,27	42,10	53,75	65,27
su 92	6,50	12,41	18,79	24,52
su 97	6,37	11,52	16,60	20,14
su 101	14,14	21,08	27,52	32,75
su 112	22,95	33,66	45,64	56,31
su 122	30,97	44,21	57,48	71,25
su 124	30,67	43,02	56,58	69,48
su 135	4,77	10,02	15,35	20,81
su 143	32,71	45,13	58,10	70,69
su 166	4,83	9,67	15,79	22,90

*Controles.

Os valores para cada supressor, em cada tempo, são médias de três repetições, com quatro colônias em cada repetição e quatro medidas de diâmetro em cada colônia, o mesmo acontecendo em relação aos controles.

Os meios de culturas utilizados encontram-se descritos no ítem 4.13.

A análise da variância dos dados referentes a este crescimento apresentou os resultados que são ilustrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Análise da variância do diâmetro de colônias de 16 linhagens (14 supressores e dois controles) em quatro tempos de incubação e três repetições (Blocos).

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F
Blocos (B)	2	533,31	266,65	15,53**
Linhagens (L)	15	46.410,14	3.094,01	180,20**
Supressores	13	39.755,25	3.058,10	178,11**
Controles	1	3,52	3,52	0,21 n.s.
Grupos	1	6.651,37	6.651,37	387,38**
Resíduo a	30	515,10	17,17	
Parcelas	47	47.458,55		
Tempo de incubação (T)	3	19.117,47	6.372,49	4.939,91**
T x L	45	2.632,71	58,50	45,35**
T x B	6	21,12	3,52	2,73*
Resíduo b	90	115,76	1,29	
Sub-parcelas	191	69.345,61	Média Geral = 32,94 C.V. Erro (a) = 12,58% C.V. Erro (b) = 3,45%	

**Significativo a 1% de probabilidade.

*Significativo a 5% de probabilidade.

n.s. = Não significativo.

A observação dos dados apresentados nas Tabelas 10 e 11 nos sugerem a existência de interações no crescimento de linhagens. A Figura 3 é uma ilustração do crescimento de controles e supressores.

Para se comparar o crescimento das colônias supressoras com os controles MSE e nic⁺ foi escolhido o tempo de 120 horas de incubação, visto ter sido este o tempo em que melhor se pode observar a morfologia das colônias em geral, delineando-se melhor os contornos, a conidiação, coloração, aspectos que favoreceram medições mais precisas.

A análise da variância para o tempo de 120 horas de incubação é apresentada na Tabela 12.

Tabela 12 - Análise da variância do diâmetro das colônias para o tempo de 120 horas de incubação em três repetições (blocos).

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F
Blocos	2	206,87	103,44	20,22**
Linhagens	15	14.135,10	942,34	184,19**
Supressores	13	12.150,20	934,63	182,54**
Controles	1	0,17	0,17	0,03n.s.
Grupos	1	1.984,73	1.984,73	387,64**
Resíduo	30	153,45	5,12	
	47	14.495,45	Média = 37,57 C.V. = 6,02%	

(**) = Significativo a 1% de probabilidade.

n.s. = Não significativo.

Figure 3 - Curva de crescimento em diâmetro de 14 supressores e dois controles em quatro tempos de incubação.

O teste de Dunnett (ítem 4.15.) aplicado aos 14 supressores para detectar suas diferenças em relação a linhagem MSE original (controle) revelou os resultados que são apresentados na Tabela 13; estes resultados referem-se a aplicação do teste no tempo de 120 horas de incubação.

Pelo fato de não haver diferença significativa entre o crescimento da linhagem MSE e o controle nic⁺ segundo pode ser constatado pela análise da variância expressa na Tabela 12, o teste de Dunnett não foi aplicado para comparar o crescimento dos supressores em relação a este controle.

5.7. Análise genética

Entre os supressores que tiveram seu crescimento, ao nível de supressão, analisados estatisticamente, sete foram selecionados para determinação genética do caráter supressor. Aspectos como morfologia das colônias, quantidade de conídios, desenvolvimento, habilidade de crescimento em meio não suplementado com outro requisito nutricional além de ácido nicotínico (ítem 5.5.) foram considerados na seleção dos supressores submetidos a análises genéticas, os quais receberam as conotações definitivas apresentadas na Tabela 14.

As análises genéticas foram também aplicadas a linhagem MSE original com o objetivo de se estabelecer um

Tabela 13 - Resultados do teste de Dunnett aplicado na comparação do crescimento em diâmetro de 14 supressores em relação ao controle MSE no tempo de 120 horas de incubação.

Supressores	Médias de crescimento ¹
su 8	27,89**
su 25	22,64**
su 45	22,92**
su 63	52,88 n.s.
su 70	53,75 n.s.
su 92	18,79**
su 97	16,60**
su 101	27,52**
su 112	45,64**
su 122	57,48 n.s.
su 124	56,58 n.s.
su 135	15,35**
su 143	58,10 n.s.
su 166	15,79**
MSE	54,75

¹Crescimento medido em milímetros.

d.m.s. (5%) = 5,5425

d.m.s. (1%) = 6,7803

**Significativo a 1% de probabilidade.

n.s. = Não significativo.

d.m.s. = diferença mínima significativa.

controle em relação as análises aplicadas as linhagens supressoras.

5.7.1. Teste do heterocário

Realizado conforme o ítem 4.14.1., o teste do heterocário aplicado a todas as linhagens supressoras analisadas mitótica e meioticamente ratificou plenamente a origem nuclear da supressão, uma vez que em todos os cruzamentos a totalidade das colônias obtidas dos heterocários mantiveram o caráter supressor indicando ser o mesmo determinado por um fator nuclear pois em nenhum caso este fator foi perdido no heterocário.

5.7.2. Análise mitótica e meiótica

A análise mitótica foi realizada com a finalidade de determinar o grupo de ligação em que se encontrava localizado o determinante genético do caráter supressor *nicB₈*. A possibilidade de ocorrência de reversões verdadeiras da marca genética *nicB₈* pressuporiam resultados idênticos para supressores cujos genes estivessem localizados no grupo de ligação VII, o que não seria possível distinguir através da análise mitótica; na análise meiótica, o surgimento de recombinantes deficientes para ácido nicotínico poderia elucidar esta dúvida.

Tabela 14 - Conotações atribuídas aos isolados supressores de
marca genética *nícB₈*, analisados geneticamente.

Conotações preliminares	Conotações definitivas - Linhagens -
su 63	MSE su 12 <i>nícB₈</i>
su 143	MSE su 13 <i>nícB₈</i>
su 70	MSE su 14 <i>nícB₈</i>
su 122	MSE su 15 <i>nícB₈</i>
su 124	MSE su 16 <i>nícB₈</i>
su 135	MSE su 17 <i>nícB₈</i>
su 8	MSE su 18 <i>nícB₈</i>

Os resultados da segregação meiótica foram obtidos por semeadura de uma amostra de ascósporos provenientes do cruzamento de cada linhagem supressora com a linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₂*; estes resultados são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15 - Segregação meiótica do cruzamento das linhagens supressoras com a linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₂*.

Cruzamento <i>proA₁; pabaA₆; yA₂</i> com:	Segregantes		Total	Proporção esperada	χ^2
	brancos	amarelos			
MSE *	64	54	118	1:1	0,8474 n.s.
MSE <i>su 12 nicB₈</i>	82	64	146	1:1	2,4931 n.s.
MSE <i>su 13 nicB₈</i>	61	63	124	1:1	0,0322 n.s.
MSE <i>su 14 nicB₈</i>	65	60	125	1:1	0,2 7 n.s.
MSE <i>su 15 nicB₈</i>	82	76	158	1:1	0,2279 n.s.
MSE <i>su 16 nicB₈</i>	71	75	146	1:1	0,1095 n.s.
MSE <i>su 17 nicB₈</i>	98	109	207	1:1	0,5845 n.s.
MSE <i>su 18 nicB₈</i>	139	133	272	1:1	0,1323 n.s.

*Cruzamento controle.

n.s. - Não significativo.

Na análise meiótica, para se comprovar o caráter supressor exibido pelas linhagens foi realizado cálculo estatístico através do teste χ^2 (PIMENTEL GOMES, 1973); devido a ocorrência do gene supressor a segregação esperada para

a marca genética *nicB₈* foi considerada na proporção de 3 segregantes *nic⁺* para um segregante *nic⁻*, enquanto a segregação esperada para as demais marcas genéticas considerou-se na proporção de 1:1.

5.7.3. Cruzamento da linhagem MSE com linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₂*

Executado a título de controle em relação as 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. As Tabelas 16 e 17 resumem os resultados colhidos nas análises mitótica e meiótica deste cruzamento.

5.7.4. Cruzamento da linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₂* com as linhagens derivadas da MSE e contendo o caráter supressor do ácido nicotínico

Os resultados das análises mitóticas e meióticas para cada cruzamento realizado estão apresentados nas Tabelas 19 a 32. Esses resultados permitiram definir se o caráter supressor de cada linhagem era devido a um gene supres-

Tabela 16 - Análise mitótica: diplóide MSE// *phoA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂.

Haplóide do diplóide MSE// <i>phoA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂			
Grupos de ligação	Marcadores	Grupo de ligação VII	
		<i>nic</i> ⁺	<i>nic</i>
I	<i>pho</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	6	15
	<i>pho</i> <i>paba</i>	1	3
II	<i>w</i> ⁺	2	3
	<i>w</i>	5	15
III	<i>gal</i> ⁺	3	11
	<i>gal</i>	4	7
IV	<i>pino</i> ⁺	4	11
	<i>pino</i>	3	7
V	<i>fac</i> ⁺	4	10
	<i>fac</i>	3	8
VI	<i>s</i> ⁺	3	9
	<i>s</i>	4	9
VIII	<i>ribo</i> ⁺	0	6
	<i>ribo</i>	7	12

Setores analisados = 25

Tabela 17 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE com a linhagem *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂.

Segregantes analisados				
Grupos de ligação	Marcador	Nº de colônias	Proporção esperada	χ^2
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	47	1:1	0,26 n.s.
	<i>pro</i> <i>paba</i>	52		
II	<i>w</i> ⁺	51	1:1	0,00 n.s.
	<i>w</i>	48		
III	<i>gal</i> ⁺	41	1:1	2,91 n.s.
	<i>gal</i>	58		
IV	<i>pyro</i> ⁺	54	1:1	0,82 . .
	<i>pyro</i>	45		
V	<i>fac</i> ⁺	55	1:1	1,22
	<i>fac</i>	44		
VI	<i>s</i> ⁺	49	1:1	0,01 n.s.
	<i>s</i>	50		
VII	<i>nic</i> ⁺	43	1:1	1,71 n.s.
	<i>nic</i>	56		
VIII	<i>ribo</i> ⁺	41	1:1	2,92
	<i>ribo</i>	58		

n.s. - Não significativo.

sor ou a uma possível reversão verdadeira, bem como a localização desses genes supressores. Exemplificando, para o cruzamento MSE *su 12 nicB₈* com a linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₂* os resultados da análise mitótica (Tabela 19) permitiram localizar o gene supressor no grupo de ligação VII sendo que a ocorrência de segregantes *nic⁻* (24) obtidos na análise meiótica (valor de recombinação) permitem inferir que não se trata de uma reversão da marca genética *nicB₈* (Tabela 20). O nível de significância a 0,1% de probabilidade observado para a segregação de tiosulfato de sódio sugere uma possível relação entre essa marca e o supressor *nicB₈*, relação esta que se torna mais evidente se considerarmos uma certa habilidade de crescimento da linhagem em meio onde tiosulfato de sódio não se achava presente. Já em relação ao cruzamento da linhagem MSE *su 18 nicB₈* com a linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₂*, as análises mitótica e meiótica indicam que o caráter supressor é devido a um gene localizado no grupo de ligação VII, ligado a marca *nicB₈* ou uma reversão verdadeira da mesma. Isso pode ser verificado pela observação das Tabelas 31 e 32.

Os resultados destas e das outras análises permitiram a construção da Tabela 18 onde estão sumarizadas as localizações dos supressores.

Tabela 18 - Resultados das análises mitótica e meiótica das linhagens supressoras cruzadas com a linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₂*

Cruzamento com <i>proA₁; pabaA₆; yA₂</i>	Análise mitótica grupo de ligação envolvido	Análise mei- ótica Segregação <i>nic⁺ / nic⁻</i>	Natureza da supressão
MSE <i>su 12 nicB₈</i>	VII	3:1 n.s.	gene <i>su 12 nicB₈</i>
MSE <i>su 13 nicB₈</i>	IV	3:1 n.s.	gene <i>su 13 nicB₈</i>
MSE <i>su 14 nicB₈</i>	IV	3:1 n.s.	gene <i>su 14 nicB₈</i>
MSE <i>su 15 nicB₈</i>	IV	3:1*	gene <i>su 15 nicB₈</i>
MSE <i>su 16 nicB₈</i>	VI	1:1 n.s. 3:1***	gene <i>su 16 nicB₈</i>
MSE <i>su 17 nicB₈</i>	VII	1:1 n.s. 3:1***	gene <i>su 17 nicB₈</i>
MSE <i>su 18 nicB₈</i>	VII	Não calculado	reversão de <i>nicB₈</i>

n.s. - Não significativo.

* - Significativo a 5% de probabilidade.

*** - Significativo a 0,1% de probabilidade.

Tabela 19 - Análise mitótica: diplóide MSE su 12 *nicB₈*// *proA₁*; *pabaA₆*; *yA₂*

Haplóide do diplóide MSE su 12 <i>nicB₈</i> // <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₂</i>		
Grupos de ligação	Marcadores	Segregantes
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	16
	<i>pro</i> <i>paba</i>	5
II	<i>w</i> ⁺	4
	<i>w</i>	17
III	<i>gal</i> ⁺	10
	<i>gal</i>	11
IV	<i>piro</i> ⁺	10
	<i>piro</i>	11
V	<i>fac</i> ⁺	15
	<i>fac</i>	6
VI	<i>s</i> ⁺	6
	<i>s</i>	15
VII	<i>nic</i> ⁺	21
	<i>nic</i>	0
VIII	<i>ribo</i> ⁺	14
	<i>ribo</i>	7

Setores analisados = 21

Tabela 20 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE *su 12 nicB₈* com a linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₂*.

Grupo de ligação	Marcador	Nº de colônias	Proporção esperada	χ^2
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺ <i>pro</i> <i>paba</i>	45 57	1:1	1,41 n.s.
II	<i>w</i> ⁺ <i>w</i>	52 50	1:1	0,00 n.s.
III	<i>gal</i> ⁺ <i>gal</i>	60 42	1:1	3,17 n.s.
IV	<i>pyro</i> ⁺ <i>pyro</i>	53 49	1:1	0,16 n.s.
V	<i>fac</i> ⁺ <i>fac</i>	55 47	1:1	0,62 n.s.
VI	<i>s</i> ⁺ <i>s</i>	22 80	1:1	32,98***
VII	<i>nic</i> ⁺ <i>nic</i>	78 24	1:1 3:1	28,58*** 0,12 n.s.
VIII	<i>ribo</i> ⁺ <i>ribo</i>	43 59	1:1	2,5 n.s.

n.s. - Não significativo.

*** - Significativo a 0,1% de probabilidade.

Valor de recombinação entre *su 12 nicB₈* - *nicB₈* = 47,05 ± 4,94%.

Tabela 21 - Análise mitótica: diplóide MSE *su 13 nicB₈// proA₁; pabaA₆; yA₂*

Haplóide do diplóide MSE <i>su 13 nicB₈// proA₁; pabaA₆; yA₂</i>			
Grupos de ligação	Marcadores	Grupo de ligação VII	
		<i>nic</i> ⁺	<i>nic</i>
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	13	6
	<i>pro</i> <i>paba</i>	1	3
II	<i>w</i> ⁺	1	0
	<i>w</i>	13	9
III	<i>gal</i> ⁺	8	4
	<i>gal</i>	6	5
IV	<i>pyro</i> ⁺	9	8
	<i>pyro</i>	5	1
V	<i>fac</i> ⁺	6	7
	<i>fac</i>	8	2
VI	<i>s</i> ⁺	5	5
	<i>s</i>	9	4
VIII	<i>ribo</i> ⁺	5	3
	<i>ribo</i>	9	6

Setores analisados = 23

Tabela 22 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE *su 13 nicB₈* com a linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₂*.

Segregantes analisados				
Grupos de ligação	Marcador	Nº de colônias	Proporção esperada	χ^2
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	45	1:1	1,2 n.s.
	<i>pro</i> <i>paba</i>	56		
II	<i>w</i> ⁺	51	1:1	0,0 n.s.
	<i>w</i>	50		
III	<i>gal</i> ⁺	57	1:1	1,67 n.s.
	<i>gal</i>	44		
IV	<i>pyro</i> ⁺	55	1:1	1,2 n.s.
	<i>pyro</i>	46		
V	<i>fac</i> ⁺	62	1:1	5,25*
	<i>fac</i>	39		
VI	<i>s</i> ⁺	57	1:1	1,67 n.s.
	<i>s</i>	44		
VII	<i>nic</i> ⁺	69	1:1	13,55***
	<i>nic</i>	32	3:1	2,65 n.s.
VIII	<i>ribo</i> ⁺	57	1:1	1,67 n.s.
	<i>ribo</i>	44		

n.s. - Não significativo.

* - Significativo a 5% de probabilidade.

*** - Significativo a 0,1% de probabilidade.

Valor de recombinação entre *su 13 nicB₈* - *pyroA₄* = 33,66 ± 4,7%.

Tabela 23 - Análise mitótica: diplóide MSE *su 14 nicB₈// proA₁; pabaA₆; yA₂*.

Haplóide do diplóide MSE <i>su 14 nicB₈// proA₁; pabaA₆; yA₂</i>			
Grupos de ligação	Marcadores	Grupo de ligação VII	
		<i>nic</i> ⁺	<i>nic</i>
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	12	5
	<i>pro</i> <i>paba</i>	4	2
II	<i>w</i> ⁺	5	0
	<i>w</i>	11	7
III	<i>gal</i> ⁺	10	2
	<i>gal</i>	8	5
IV	<i>pyro</i> ⁺	8	5
	<i>pyro</i>	8	2
V	<i>fac</i> ⁺	7	3
	<i>fac</i>	9	4
VI	<i>s</i> ⁺	4	1
	<i>s</i>	12	6
VIII	<i>ribo</i> ⁺	6	2
	<i>ribo</i>	10	5

Setores analisados = 23

Tabela 24 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE su 14 *nicB₈* com a linhagem *proA₁*; *pabaA₆*; *yA₂*.

Segregantes analisados				
Grupos de ligação	Marcador	Nº de co-lônias	Proporção esperada	χ^2
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺ <i>pro</i> <i>paba</i>	47 50	1:1	0,09 n.s.
II	<i>w</i> ⁺ <i>w</i>	50 47	1:1	0,00 n.s.
III	<i>gal</i> ⁺ <i>gal</i>	35 62	1:1	7,51**
IV	<i>pyro</i> ⁺ <i>pyro</i>	40 57	1:1	2,97 n.s.
V	<i>fac</i> ⁺ <i>fac</i>	50 47	1:1	0,09 n.s.
VI	<i>s</i> ⁺ <i>s</i>	21 76	1:1	31,1***
VII	<i>nic</i> ⁺ <i>nic</i>	70 27	1:1 3:1	19,06*** 0,41 n.s.
VIII	<i>ribo</i> ⁺ <i>ribo</i>	43 54	1:1	0,13 n.s.

n.s. - Não significativo.

** - Significativo a 1% de probabilidade.

*** - Significativo a 0,1% de probabilidade.

Valor de recombinação entre su 14 *nicB₈* - *pyroA₄* = 41,23 ± 5,0%

Tabela 25 - Análise mitótica: diplóide MSE *su 15 nicB₈// proA₁; pabaA₆; yA₂*.

Haplóide do diplóide MSE <i>su 15 nicB₈// proA₁; pabaA₆; yA₂</i>			
Grupos de ligação	Marcadores	Grupo de ligação VII	
		<i>nic</i> ⁺	<i>nic</i>
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	9	11
	<i>pro</i> <i>paba</i>	4	2
II	<i>w</i> ⁺	3	0
	<i>w</i>	10	13
III	<i>gal</i> ⁺	4	8
	<i>gal</i>	9	5
IV	<i>pyro</i> ⁺	7	10
	<i>pyro</i>	6	3
V	<i>fac</i> ⁺	6	6
	<i>fac</i>	7	7
VI	<i>s</i> ⁺	6	2
	<i>s</i>	7	11
VIII	<i>ribo</i> ⁺	3	2
	<i>ribo</i>	10	11

Setores analisados = 26

Tabela 26 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE *su 15 nicB₈* com a linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₂*.

Segregantes analisados				
Grupos de ligação	Marcadores	Nº de colônias	Proporção esperada	χ^2
I	<i>pro</i> ⁺	44	1:1	1,67 n.s.
	<i>pro</i>	57		
II	<i>w</i> ⁺	51	1:1	0,00 n.s.
	<i>w</i>	50		
III	<i>gal</i> ⁺	41	1:1	3,57 n.s.
	<i>gal</i>	60		
IV	<i>pyro</i> ⁺	45	1:1	1,19 n.s.
	<i>pyro</i>	56		
V	<i>fac</i> ⁺	45	1:1	1,19 n.s.
	<i>fac</i>	56		
VI	<i>s</i> ⁺	19	1:1	39,29***
	<i>s</i>	82		
VII	<i>nic</i> ⁺	65	1:1	8,32**
	<i>nic</i>	36	3:1	6,1 *
VIII	<i>ribo</i> ⁺	50	1:1	0,01 n.s.
	<i>ribo</i>	51		

n.s. - Não significativo.

* - Significativo a 5% de probabilidade.

** - Significativo a 1% de probabilidade.

*** - Significativo a 0,1% de probabilidade.

Valor de recombinação entre *su 15 nicB₈* - *pyroA₄* = 41,58 ± 4,9%

Tabela 27 - Análise mitótica: diplóide MSE *su 16 nicB₈// proA₁; pabaA₆; yA₂*.

Haplóide do diplóide MSE <i>su 16 nicB₈// proA₁; pabaA₆; yA₂</i>			
Grupos de ligação	Marcadores	Grupo de ligação VII	
		<i>nic</i> ⁺	<i>nic</i>
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	14	7
	<i>pro</i> <i>paba</i>	1	1
II	<i>w</i> ⁺	1	0
	<i>w</i>	14	8
III	<i>gal</i> ⁺	11	3
	<i>gal</i>	4	5
IV	<i>pyro</i> ⁺	8	3
	<i>pyro</i>	7	5
V	<i>fac</i> ⁺	11	4
	<i>fac</i>	4	4
VI	<i>s</i> ⁺	7	5
	<i>s</i>	9	3
VIII	<i>ribo</i> ⁺	2	2
	<i>ribo</i>	13	6

Setores analisados = 23

Tabela 28 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE su 16 *nicB₈* com a linhagem *proA₁;pabaA₆;yA₂*.

Segregantes analisados				
Grupos de ligação	Marcador	Nº de colônias	Proporção esperada	χ^2
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺ <i>pro</i> <i>paba</i>	41 60	1:1	3,57 n.s.
II	<i>w</i> ⁺ <i>w</i>	50 51	1:1	0,00 n.s.
III	<i>gal</i> ⁺ <i>gal</i>	43 58	1:1	2,22 n.s.
IV	<i>pyro</i> ⁺ <i>pyro</i>	51 50	1:1	0,01 n.s.
V	<i>fac</i> ⁺ <i>fac</i>	56 45	1:1	1,2 n.s.
VI	<i>δ</i> ⁺ <i>δ</i>	45 56	1:1	1,2 n.s.
VII	<i>nic</i> ⁺ <i>nic</i>	43 58	1:1 3:1	2,28 n.s. 56,36***
VIII	<i>ribo</i> ⁺ <i>ribo</i>	43 58	1:1	2,28 n.s.

n.s. - Não significativo.

*** - Significativo a 0,1% de probabilidade.

Tabela 29 - Análise mitótica: diplóide MSE *su 17 nicB₈// proA₁; pabaA₆; yA₂*.

Haplóide do diplóide MSE <i>su 17 nicB₈// proA₁; pabaA₆; yA₂</i>		
Grupos de ligação	Marcadores	Segregantes
I	<i>pro⁺ paba⁺</i>	22
	<i>pro paba</i>	2
II	<i>w⁺</i>	5
	<i>w</i>	19
III	<i>gal⁺</i>	11
	<i>gal</i>	13
IV	<i>pyro⁺</i>	11
	<i>pyro</i>	13
V	<i>fac⁺</i>	14
	<i>fac</i>	10
VI	<i>s⁺</i>	10
	<i>s</i>	14
VII	<i>nic⁺</i>	23
	<i>nic</i>	1
VIII	<i>ribo⁺</i>	7
	<i>ribo</i>	17

Setores analisados = 24

Tabela 30 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE su 17 *nicB₈* com a linhagem *proA₁;pabaA₆;yA₂*.

Segregantes analisados				
Grupos de ligação	Marcadores	Nº de co-lônias	Proporção esperada	χ^2
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	42	1:1	0,28 n.s.
	<i>pro</i> <i>paba</i>	56		
II	<i>w</i> ⁺	49	1:1	0,00 n.s.
	<i>w</i>	49		
III	<i>gal</i> ⁺	49	1:1	0,00 n.s.
	<i>gal</i>	49		
IV	<i>pyro</i> ⁺	47	1:1	0,16 n.s.
	<i>pyro</i>	51		
V	<i>fac</i> ⁺	47	1:1	0,16 n.s.
	<i>fac</i>	51		
VI	<i>s</i> ⁺	18	1:1	39,22***
	<i>s</i>	80		
VII	<i>nic</i> ⁺	51	1:1	0,16 n.s.
	<i>nic</i>	47	3:1	29,38***
VIII	<i>ribo</i> ⁺	50	1:1	0,04 n.s.
	<i>ribo</i>	48		

n.s. - Não significativo.

*** - Significativo a 0,1% de probabilidade.

Tabela 31 - Análise mitótica: diplóide MSE *su 18 nicB₈// proA₁; pabaA₆; yA₂*.

Haplóide do diplóide MSE <i>su 18 nicB₈// proA₁; pabaA₆; yA₂</i>		
Grupos de ligação	Marcadores	Segregantes
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	17
	<i>pro</i> <i>paba</i>	8
II	<i>w</i> ⁺	0
	<i>w</i>	25
III	<i>gal</i> ⁺	11
	<i>gal</i>	14
IV	<i>pyro</i> ⁺	14
	<i>pyro</i>	11
V	<i>fac</i> ⁺	10
	<i>fac</i>	15
VI	<i>s</i> ⁺	7
	<i>s</i>	18
VII	<i>nic</i> ⁺	25
	<i>nic</i>	0
VIII	<i>ribo</i> ⁺	7
	<i>ribo</i>	18

Setores analisados = 25

Tabela 32 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem MSE su 18 *nicB₈* com a linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₂*.

Segregantes analisados				
Grupos de ligação	Marcadores	Nº de colônias	Proporção esperada	χ^2
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	43	1:1	1,46 n.s.
	<i>pro</i> <i>paba</i>	55		
II	<i>w</i> ⁺	50	1:1	0,00 n.s.
	<i>w</i>	48		
III	<i>gal</i> ⁺	49	1:1	0,00 n.s.
	<i>gal</i>	49		
IV	<i>pyro</i> ⁺	55	1:1	1,46 n.s.
	<i>pyro</i>	48		
V	<i>fac</i> ⁺	54	1:1	1,02 n.s.
	<i>fac</i>	44		
VI	<i>s</i> ⁺	51	1:1	0,16 n.s.
	<i>s</i>	47		
VII	<i>nic</i> ⁺	98	3:1	(')
	<i>nic</i>	0		
VIII	<i>ribo</i>	56	1:1	2,00 n.s.
	<i>ribo</i>	42		

n.s. - Não significativo.

(') - Não foi calculado devido tratar-se de uma reversão verdadeira.

6. DISCUSSÃO

6.1. Obtenção, isolamento de supressores e frequência de supressão

Um número relativamente alto de colônias que exibiram crescimento em meio de cultura sem adição de ácido nicotínico (colônias nic^+), foi obtido após a semeadura tanto de conídios não irradiados como de conídios tratados por luz ultra-violeta (Tabela 1). Este resultado implicaria em uma frequência elevada de supressão da marca genética $nicB$, tanto espontaneamente como por indução através de luz ultra-violeta. Entretanto, um teste de supressão evidenciou que para muitas colônias o crescimento inicialmente observado em meio isento de ácido nicotínico não foi mantido quando as colônias foram replicadas para o mesmo meio e, em consequência, o número de supressores obtidos reduziu-se consideravelmente em ambos os tratamentos (Tabela 3). O fenômeno da não manutenção da capacidade de crescimento em meio onde ácido nicotínico não se achava presente pode ser explicado como devido a fenocópias

ou instabilidades.

Considerando-se tais aspectos, torna-se relevante determinar-se as frequências aparente e real de supressão (Tabelas 6 e 7) de modo a estabelecer valores que nos dêem uma idéia mais exata da ocorrência natural e induzida de mutações supressoras de uma determinada lesão. Comparando-se os valores calculados para as frequências aparente e real de supressão, determinadas para mutações induzidas e espontâneas (Tabelas 6 e 7), necessário torna-se efetuar uma correção de 57,5% na frequência aparente de supressão em relação a frequência real para mutações espontâneas e, identicamente, de 26,6% para mutações induzidas. A consideração de tais resultados constitui subsídios para uma avaliação quantitativa do potencial indutor do agente mutagênico utilizado pois que em média a frequência de supressão induzida é muitas vezes maior que a frequência de supressão espontânea e no entanto sua porcentagem de correção é somente a metade daquela.

SCOTT et alii (1973) estudando o efeito da quantidade de cófios no restabelecimento de mutações supressoras da deficiência para metionina após irradiação ultra-violeta em *Aspergillus nidulans* concluíram que a frequência de mutação induzida decresce quando o número de colônias revertentes por placa excede a 20; *GRIGG (1952)*, citado por estes autores, já havia determinado que, em *Neurospora*, quando a

quantidade de conídios excedia a taxa de 1.10^7 conídios/placa, o número de prototróficos restabelecidos declinava. *SCOTT et alii* (1976) verificaram que a não remoção de substâncias inibidoras da germinação de conídios em *Aspergillus nidulans* pode resultar em variações na sensibilidade de experimento para experimento.

Baseados nas conclusões a que chegaram estes autores, é de se esperar que, em nossos experimentos, possíveis interações estejam ocorrendo entre os conídios, principalmente no que se refere a quantidade de conídios semeados e que isto possa estar acarretando variações na sobrevivência dos mesmos (Tabela 5).

A frequência de supressão pode ser utilizada para avaliar a potência de indução de agentes mutagênicos. Dos sistemas que se valem dos fungos para detecção de agentes mutagênicos, os mais adequados foram os desenvolvidos por *SIDDIQI* (1962) e *LILLY* (1965) onde foi ensaiada a frequência de reversão do gene *methG 1* que pode ser devida a supressão ou reversão verdadeira.

SIDDIQI (1962) descreveu a ação do ácido nítrico em *Aspergillus nidulans* que mostrou ser um agente mutagênico efetivo; três locus supressores foram isolados, *Su A*, *Su B* e *Su C* que podiam ser distinguidos por diferentes aspectos exibidos pelas colônias. Frequências de reversões relativa-

mente altas, da ordem de 10^5 , puderam ser obtidas em diferentes tempos de tratamento ao mutagênico para os três loci supressores.

LILLY (1965) utilizou a supressão da deficiência em metionina para testar a ação de mutagênicos químicos. Segundo a autora, a existência de cinco ou mais genes supressores tem as seguintes consequências quando são usados mutagênicos: primeiramente, a chance de detecção de mutações induzidas é aumentada e, secundariamente, a ação de um possível mutagênico é provavelmente melhor detectada mesmo se ele não pode causar mutação em genes particulares.

OLIVEIRA (1978) usou o sistema de resistência a arginina em linhagens *lys⁻* para avaliar a potência de mutação de três agentes mutagênicos: luz ultra-violeta, metanosulfonato de etila e brometo de etídeo. Os resultados serviram para mostrar que EMS é mais potente que a luz ultra-violeta e esta mais potente que o brometo de etídeo na indução de mutações.

Em *Neurospora*, *BROWN e AIUTTO (1973)* encontraram frequências de reversões que vão desde 3,64 a 78,21 em 10^6 células para os oito alelos mais efetivos entre 19 mutantes deficientes em metionina induzidos por ácido nitroso. Para alguns alelos a taxa de reversão para ácido nitroso era nula enquanto o alelo que exibiu maior taxa de reversão foi o único

que mostrou reversão espontânea efetivamente ($1,99$ em 10^6). Para outros agentes mutagênicos usados (MNNG, ICR 70, EMS e OMHA) as taxas de reversões foram menores que para ácido nitroso e somente dois alelos (2-65 e 2-76), de substituição de pares de bases, exibiram taxas de reversões efetivas para todos os mutagênicos.

SCOTT *et alii* (1976) constataram que ocorre um declíneo exponencial na habilidade de formação de colônias e aumento quadrático na frequência de mutação quando há um aumento da dose incidente de radiação ultra-violeta em *Aspergillus nidulans*. Em conídios que tiveram as substâncias inibidoras da germinação removidas, a sobrevivência decresceu exponencialmente quando a dose aumentou.

BAL *et alii* (1978) verificaram que a frequência de mutação em 10^6 conídios viáveis foi de 28,7 para o locus *metG* 4, 2,8 para o locus *ada* 24 e 0,5 para reversão simultânea destes loci em *Aspergillus nidulans*. Segundo os autores, estas frequências de reversões são 100 vezes maiores que frequências de reversões anteriormente obtidas para os loci *metG* 1 e *ada*.

Em nossos experimentos comparamos a potencialidade da luz ultra-violeta em induzir mutantes para o sistema de supressão com a capacidade de obtê-los espontaneamente. Os dados obtidos para a frequência real de supressão nos mostram

que a luz ultra-violeta é um eficiente agente mutagênico pois que a frequência de mutações induzidas, exceto no caso de um experimento, foi em média mais que 100 vezes superior a frequência de mutações espontâneas, identicamente ao aumento na frequência de mutação supressora induzida por luz ultra-violeta determinado por *BAL et alii* (1978). Além disso, os valores aqui obtidos foram consideravelmente maiores que os valores encontrados por *BROWN e AIUTO* (1973) para o ácido nitroso e demais mutagênicos. A consideração de tais resultados à luz das conclusões a que chegaram *SIDDIQI* (1962) e *LILLY* (1965) nos levam a ponderar que a frequência de supressão seja um bom método na avaliação das potencialidades de agentes mutagênicos, e igualmente, que seja um bom teste de determinação de frequências de mutações induzidas.

A frequência real de supressão apresentada para o último experimento (Tabela 7) foi calculada estimativamente de modo a já apresentar uma utilização inicial do sistema de supressão como um método para determinação de frequência de mutação induzida.

Um outro aspecto que nos resta comentar foi a importância da seleção de supressores. Tipos diferentes de colônias puderam ser observadas nas placas destinadas a obtenção de supressores e estas colônias variavam quanto a sua capacidade de crescimento, forma, conidiação, coloração e densidade micelial. A idéia inicial foi que estas diferenças pu-

dessem ser reflexos de divergências genéticas relacionadas ao fenômeno da supressão e que, portanto, poderiam ser utilizadas para se obter diversos tipos de supressores.

Baseados nestas considerações, por ocasião do ensaio de supressão e isolamento de supressores, as colônias foram classificadas em grupos de acordo com suas características (Tabela 2) e como pudemos constatar, a utilização de isolados de diferentes grupos em ensaios posteriores permitiram caracterizar tipos diferentes de supressores e ainda foi de real importância para que outros aspectos da supressão, tais como eficiência dos supressores e mecanismo de ação, fossem melhor estudados. Não nos pode escapar também o fato de que foram detectadas reversões verdadeiras, reversões supressoras, que vários loci gênicos localizados em diversos grupos de ligação do *Aspergillus nidulans* estão envolvidos, fatos que sem dúvida assumem certa importância para os estudos genéticos da supressão neste fungo.

Portanto, as evidências parecem indicar que a adequação de critérios de seleção e isolamento de supressores são necessários e podem contribuir sobremaneira para o estudo do fenômeno da supressão.

6.2. Análise genética

A Tabela 18 resume os resultados obtidos na análise

mitótica e meiótica de sete linhagens analisadas. Através dela podemos constatar que, mitoticamente, supressores foram localizados em diversos grupos de ligação. As interpretações da análise meiótica permitiram que certas considerações fossem extensivas aos supressores como um todo, mas ao mesmo tempo sugeriu que particularizações fossem feitas de acordo com características semelhantes exibidas por grupos de supressores.

Salvo exceções em que o gene supressor estivesse ligado a marca *nicB₈*; de modo geral, caracterizaríamos como portadoras de genes supressores desta marca genética, as linhagens que, como resultado da análise meiótica, exibissem uma segregação de colônias nic^+/nic^- na proporção de 3:1, independentemente do grupo de ligação em que o mutante supressor estivesse localizado; o surgimento de recombinantes meióticos no grupo de ligação VII definiria tratar-se de mutação supressora e não de reversão verdadeira.

Segundo estas considerações podemos separar os mutantes nic^+ analisados em duas classes: as reversões verdadeiras e as supressões propriamente ditas de segregação 3:1. No entanto, a observação da Tabela 18 nos revela a existência de uma terceira classe de mutantes nic^+ cuja segregação meiótica na proporção de 3:1 apresentou um alto nível de significância, mas que metabolicamente eram capazes de suprimir a deficiência para ácido nicotínico.

É dentro deste padrão de classes que pretendemos conduzir a discussão dos mutantes nic^+ analisados.

O mutante *su 18 nicB₈* foi o único obtido cujas análises permitiram classificar como reversão verdadeira da marca *nicB₈*. A análise mitótica mostrou claramente que o gene supressor estava localizado no grupo de ligação VII já que todos os 25 segregantes analisados eram nic^+ . A análise meiótica forneceu as evidências de que se tratava de uma reversão verdadeira pois que todos os 98 segregantes analisados eram nic^+ mostrando que recombinação não ocorreu pois não surgiu um só caso de segregante nic^- .

Portanto, trata-se de um caso de reversão verdadeira ou supressão intra-locus não se podendo determinar no entanto, se a nova mutação ocorreu no sítio mutante original ou se outro sítio do mesmo locus está envolvido.

O supressor *su 18 nicB₈*, de morfologia alterada, na análise meiótica exibiu segregantes portadores da alteração na proporção de três normais para um alterado; na análise mitótica, no entanto, estes segregantes não foram verificados. Deste modo pode-se atribuir à supressão a alteração observada na morfologia.

Na segunda classe de mutações, que caracteristicamente exibiram segregação meiótica na proporção de 3:1,

podemos localizar os genes supressores em dois grupos de ligação, o grupo VII e o grupo IV.

O supressor *su 12 nicB₈* forneceu uma análise mitótica cuja interpretação permitiu facilmente localizar o gene mutante no grupo de ligação VII tendo em vista que todos os 21 segregantes analisados eram *nic⁺*. A hipótese de se tratar de uma reversão verdadeira foi afastada devido a ocorrência de recombinantes meióticos *nic⁻*. O valor de recombinação mostrou tratar-se de uma mutação em locus não ligado a marca *nicB₈*.

Os determinantes genéticos da supressão no caso dos supressores *su 13 nicB₈*, *su 14 nicB₈* e *su 15 nicB₈* foram localizados no grupo de ligação IV. As evidências a este respeito são mais características para o supressor *su 13*, enquanto para os supressores *su 14* e *su 15* esta foi a melhor interpretação obtida de suas análises mitóticas. Embora o valor de recombinação do supressor *su 13* evidenciasse sua proximidade em relação a marca *pyxoA₄*, nenhum destes supressores foi encontrado ligado a ela; o valor de recombinação dos supressores *su 14* e *su 15* sugere a possibilidade de que estes venham a ser genes alelos o que poderá ser verificado através de um teste de alelismo.

Observando-se as análises meióticas dos supressores *su 12*, *su 14* e *su 15* fica evidenciada uma possível in-

terferência do supressor *nic* em relação a segregação da marca ΔB_3 (segregação na proporção de 1:1 significativa a 0,1% de probabilidade), fazendo aumentar o número de segregantes s^- . Este aspecto será discutido em maiores detalhes em uma abordagem posterior.

A terceira classe de mutante *nic*⁺ obtidos, na qual se enquadram os supressores *su 16 nicB₈* e *su 17 nicB₈*, caracterizou-se por uma inversão marcante na segregação meiótica esperada; na interpretação das análises meióticas dos supressores desta classe observa-se que na segregação da marca *nicB₈* no grupo de ligação VII, a proporção de 1:1 segregantes *nic*⁺/*nic*⁻ não foi significativa contrariamente a proporção esperada de 3:1. Considerando-se que, metabolicamente estes mutantes são capazes de suprimir a deficiência para ácido nicotínico, evidencia-se a possibilidade de que o gene supressor venha a atuar de modo totalmente distinto dos genes supressores das classes anteriores.

Um possível mecanismo de ação para estes genes será discutido posteriormente. Na análise mitótica dos supressores desta classe, a melhor evidência para localização do determinante genético da supressão de *su 16 nicB₈* foi no grupo de ligação VI enquanto para o supressor *su 17 nicB₈* o gene foi localizado no grupo de ligação VII.

A consideração de tais resultados de um modo

global, nos levam a ponderar sobre o valor do método empregado na seleção e isolamento de mutantes *nic*⁺. MIRANDA FILHO (1972) e MIRANDA FILHO e AZEVEDO (1974) isolaram 11 supressores *nicB*₈, nove dos quais foram mapeados no grupo de ligação VII, o mesmo que encerra o locus *nicB*₈. Durante o isolamento destes supressores os autores basearam-se somente na capacidade de crescimento das colônias, selecionando apenas aquelas que exibiram os melhores desenvolvimentos.

Em nossos experimentos procuramos adotar critérios mais amplos, ainda que arbitrários, para proceder a seleção e isolamento de supressores. Deste modo, a classificação das colônias em grupos (vide Tabela 2) de acordo com várias características apresentadas e o fato de termos procurado abranger uma maior variabilidade em cada grupo constituiu um fator altamente significativo na caracterização dos supressores, pois que supressores em loci diversos e em diferentes grupos de ligação do *Aspergillus nidulans* puderam ser detectados. Além disso, a interpretação da análise meiótica evidenciou a existência de classes distintas de supressores, sugerindo que diferentes mecanismos de ação estivessem determinando a atuação dos supressores de cada classe.

6.3. 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 MIRANDA FILHO e AZEVEDO (1974) para explicar o modo de ação de oito supressores da marca genética *nicB₈*, sendo que um outro supressor por se tratar de um caso de supressão envolvendo duplicação no grupo de ligação VII, mereceu interpretação a parte. O mesmo sistema foi empregado por MENEZES (1974) para explicar o modo de ação de 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 R₂, tem a capacidade de interagir com os genes estruturais impedindo-os de produzirem o mRNA que conduz a síntese de proteínas. O outro repressor, designado R₁, interfere com a ação do repressor R₂ bloqueando sua ação e portanto incorrendo no funcionamento normal dos genes estruturais. Segundo MIRANDA FILHO (1972) o mutante *nicB₈* corresponderia a uma mutação no locus responsável pela produção do repressor R₁ e os supressores seriam mutações nos loci responsáveis pela produção dos repressores R₂. A mutação supressora no repressor R₂ impede-o de produzir o repressor, havendo consequente transcrição normal do mRNA e portanto, produção de proteínas.

Uma representação esquemática deste sistema é apresentada na Figura 4.

- extraído de *MIRANDA FILHO (1972)* -

Figura 4 - Sistema de regulação em cascata (*PONTECORVO, 1963*).

O mesmo sistema de regulação poderia ser utilizado para explicar o mecanismo de ação dos supressores das duas primeiras classes consideradas.

Na classe das reversões verdadeiras, uma segunda mutação no locus do repressor R_1 devolveria ao gene a capacidade de síntese do repressor R_1 que novamente poderia atuar no locus R_2 ou interagir com o repressor sintetizado pelo mesmo inativando-o e reconduzindo assim a condição verificada na linhagem selvagem.

Na classe de mutações supressoras de segregação meiótica 3:1 o mecanismo funcionaria segundo o esquema proposto por *MIRANDA FILHO (1972)* e portanto, mutações supres

soras no locus do repressor R_2 impediriam-no de sintetizar o repressor ou acarretariam na síntese de um repressor alterado de modo que os genes estruturais não fossem bloqueados na síntese de mRNA funcional.

No entanto, em relação a terceira classe de su pressores, ou seja, supressores de segregação meiótica 1:1, os resultados nos conduziram a interpretações hipotéticas de um possível mecanismo de ação que sugere alterações sensíveis no funcionamento do sistema anteriormente proposto.

Para o supressor *su 16 nicB₈*, onde na análise meiótica são observados 58 segregantes nic^- para 43 segregantes nic^+ o sistema de regulação poderia funcionar parcialmente do modo que foi proposto por *MIRANDA FILHO (1972)*, com o supressor *su* no locus R_2 conduzindo ao surgimento do fenótipo nic^+ (independência para ácido nicotínico). Entretanto, para explicar o alto número de segregantes nic^- obtidos, postuláramos a hipótese da existência de um funcionamento alternativo deste sistema onde o supressor *su* localizado no locus R_2 pudesse sintetizar um co-repressor que em interação com o repressor R_1 sintetizado pelo gene original (não mutante) do locus R_1 , constituiriam um complexo repressor ativo que bloquearia a ação dos genes estruturais, condicionando a manifestação do fenótipo nic^- (dependência para ácido nicotínico).

Portanto, o gene *su 16* poderia se comportar de

duas maneiras distintas: em presença da mutação para auxotrofia no locus R_1 , poderia atuar como supressor conduzindo ao funcionamento dos genes estruturais e em presença do gene não mutante (selvagem) no locus R_1 poderia atuar como co-repressor que participaria na formação de um complexo repressor da atividade dos genes estruturais.

Resumindo teríamos:

Na Figura 5 apresentamos um esquema representativo do funcionamento do sistema alternativo de regulação gênica.

Figura 5 - Representação esquemática do funcionamento de um possível sistema alternativo de regulação gênica do metabolismo do ácido nicotínico.

Na interpretação do mecanismo de ação do supressor *su 17 nicB₈*, os resultados nos sugerem a necessidade de se introduzir uma pequena variação no sistema alternativo hipoteticamente postulado para o supressor *su 16 nicB₈*, como forma de se buscar uma explicação para o modo de ação do supressor *su 17*.

Como já mencionamos anteriormente para outros, pela análise meiótica deste supressor verifica-se que o mesmo está interferindo também no metabolismo do tiossulfato de sódio. O mecanismo de ação do supressor *su 17* funcionaria nos moldes hipoteticamente postulados para o sistema alternativo no caso anterior, mas além de interagir com o repressor R₁ do sistema do ácido nicotínico, o produto gênico (co-repressor) do gene *su 17* situado no locus R₂ poderia ter a capacidade de interagir igualmente com o repressor R₁ do sistema do tiossulfato de sódio, e do mesmo modo bloquearia a ação dos genes estruturais deste sistema, o que explicaria o elevado número de segregantes deficientes para tiossulfato de sódio obtidos. Fica claro que estamos postulando também a hipótese de um sistema de regulação em cascata para o metabolismo do tiossulfato. Uma evidência em favor do mecanismo acima proposto foi a constatação de que a maioria dos setores *nic⁻* também eram *s⁻*.

Resumindo teríamos:

*O crescimento reduzido de alguns segregantes meióticos sugeriu que o supressor *su 17* tivesse alguma habilidade em suprimir parcialmente a deficiência para tiosulfato; esta hipótese, no entanto, não foi confirmada no ensaio de super-supressão.

Ao considerarmos a possibilidade da existência de sistemas de regulação como o anteriormente proposto por outros autores para explicar o modo de ação dos supressores e

do modelo alternativo aqui hipoteticamente postulado, fica evidente que novas investigações precisam ser conduzidas no sentido de se obter informações sobre alguns aspectos ainda não bem determinados da questão. A realização de testes bioquímicos que conduzam ao conhecimento do complexo de reações enzimáticas implicadas na biossíntese do ácido nicotínico em *Aspergillus nidulans* é, sem dúvida, um importante caminho a ser seguido.

Do ponto de vista genético, o sistema alternativo de regulação poderia ser ensaiado através do cruzamento de segregantes de fenótipo nic^- , mas de constituição genética $su; nic^+$, com segregantes originariamente nic^- ; o aparecimento de segregantes nic^+ serviria para mostrar que em presença do gene que confere independência para ácido nicotínico o supressor atua como repressor e, neste caso, o sistema estaria melhor fundamentado.

6.4. Obtenção de super-supressores

Super-supressores foram descritos pela primeira vez em *Aspergillus nidulans* por BAL *et alii* (1978) e eram capazes de suprimir simultaneamente as mutações *ad A* e *Met G*.

O ensaio conduzido neste trabalho na tentativa de se obter super-supressores em *Aspergillus* revelou que 22 mutantes nic^+ apresentavam capacidade de crescimento em meio

isento de tiosulfato de sódio e somente um supressor exibiu alguma habilidade de crescimento em meio onde piridoxina não estava presente.

O desenvolvimento destas colônias foi significativamente menor quando comparado com a linhagem MSE original ou com o próprio mutante nic^+ crescendo em meio somente não suplementado com ácido nicotínico. Uma ampla variabilidade no desenvolvimento, alterações na morfologia, coloração e condição destas colônias foi observado. Mutantes nic^+ dos cinco grupos morfológicos (G_1 a G_5) foram ensaiados e verificou-se o crescimento de representantes de todos os grupos.

Cinco destes mutantes nic^+ , hábeis em crescerem ao menos parcialmente em meio sem suplementação simultânea de ácido nicotínico e tiosulfato de sódio, quando analisados geneticamente não puderam ser caracterizados como super-supressores; são eles os supressores *su 12 nicB₈*, *su 13 nicB₈*, *su 14 nicB₈*, *su 15 nicB₈* e *su 16 nicB₈* (conotações definitivas).

Contudo, ao observarmos as análises meióticas dos supressores *su 12*, *su 14* e *su 15*, verificamos uma significância ao nível de 0,1% de probabilidade para a segregação da marca genética δB_3 na proporção de 1:1 segregantes s^+/s^- .

A observação de tais fatos nos conduzem mais uma vez a postular a interferência do supressor *nic* no metabo

lismo do tiosulfato de sódio. Para explicar esta interferência geneticamente, reportando-nos ao sistema de regulação em cascata, poderíamos extrapolar uma hipótese que nos parece a mais plausível: o produto gênico sintetizado pelo supressor nic no locus mutante R_2 poderia atuar, ainda que parcialmente, como se fosse o repressor R_1 do sistema regulatório do tiosulfato inativando de modo parcial o repressor R_2 ou formando um complexo repressor alterado que possibilitaria aos genes estruturais uma capacidade reduzida de síntese de mRNA das enzimas do metabolismo do tiosulfato. Esta capacidade do gene supressor nic seria apenas parcial e não o suficiente para carácterizá-lo como super-supressor.

Nas análises dos supressores *su 13* e *su 18* evidências não puderam ser observadas que nos conduzissem a quaisquer interpretações genéticas, ainda que especulativas para o efeito metabólico verificado no teste de super-supressão. Possivelmente alguma alteração metabólica não detectada geneticamente tenha ocorrido na biossíntese do tiosulfato e esta verificação depende de provas bioquímicas. Deve-se ressaltar, contudo, que estes foram os supressores que melhor desenvolvimento apresentaram em meio não suplementado com ácido nicotínico e tiosulfato de sódio simultaneamente.

Na análise meiótica dos supressores *su 14* e *su 17*, alguns segregantes exibiram um crescimento em meio isenu

to de tiossulfato, crescimento este ligeiramente compacto, lento e próximo da metade do crescimento do próprio segregante na placa com meio com todos os requisitos nutricionais. Para o supressor *su 14* este crescimento pode ser consequência da interferência do supressor *nic* na regulação do metabolismo do tiossulfato anteriormente considerada. Em relação ao supressor *su 17*, que metabolicamente não foi capaz de suprimir a deficiência para tiossulfato no teste de super-supressão, anteriormente já consideramos o relacionamento do supressor *nic* ao sistema regulatório do tiossulfato. Assim, em situações mais restritas o supressor *nic* poderia contribuir ligeiramente na supressão do tiossulfato. Esquematizando teríamos:

6.5. A elongação micelial na determinação das potencialidades de supressão

Segundo *GRIFFITHS (1975)*, em fungos filamentosos um caminho relativamente simples para quantificar o crescimento é a medida da taxa de elongação micelial. No experimento em que examinou tanto quantitativa como qualitativamente a interação entre vários alelos *ad-3B* supressíveis e vários genes super-supressores em *Neurospora*, cita o autor que talvez uma das principais conclusões que pode ser extraída de estudos de quantificações é que a variação na taxa de cres

cimento de supressores é devida a diferenças genéticas encontradas nas linhagens. A medida fenotípica da eficiência usada nestes estudos é indubitavelmente o reflexo de eventos ocorrendo ao nível molecular da supressão.

Repetindo *BUTCHER et alii* (1972), o melhor método para examinar a natureza de alguma diferença genética encontrada ou para confirmar similaridades é ainda a análise da variância.

MIRANDA FILHO (1972) mediu a eficiência de diversos supressores através da taxa de crescimento em meios de culturas distintos em diferentes tempos de incubação, obtendo diferenças marcantes no que diz respeito a capacidade de crescimento e comportamento de um modo geral das linhagens com supressores. A análise estatística evidenciou estas diferenças que foram interpretadas como sendo um reflexo das diferenças genéticas entre os supressores.

No ensaio de crescimento procuramos testar a eficiência de diversos supressores através da taxa de elongação micelial em comparação com duas linhagens controles, a linhagem MSE original e uma outra linhagem designada nic^+ , derivada da linhagem MSE.

Variações consideráveis puderam ser detectadas no comportamento dos diversos supressores quanto ao cresci-

mento (Tabela 10 e Figura 3). As diferenças entre as taxas de crescimento dos diversos supressores indicam claramente as divergências genéticas entre eles, principalmente se compararmos o crescimento de cada um em relação aos controles. Considerando-se que são linhagens supressoras isogênicas, as diferenças entre elas podem ser atribuídas ao supressor *nícB₈*. Estas diferenças foram demonstradas através da análise da variância do diâmetro das colônias dos 14 supressores ensaiados e dois controles em diferentes tempos de incubação (Tabela 11).

De modo geral todos os efeitos foram significativos, exceção feita aos controles. De maior importância cabe-nos considerar o efeito de linhagens (L) que indica existirem diferenças entre supressores e controles e o efeito de supressores, numa clara indicação das divergências dos supressores entre si. Obviamente a influência do tempo de incubação resultou altamente significativa e a interação tempo de incubação versus linhagem (T x L) indica que o ritmo de crescimento das diversas linhagens foi diferente nos diversos tempos de incubação.

Desta maneira, para melhor comparar o efeito do crescimento dos supressores em relação aos controles, pelas razões já expostas no item 5.6., foi escolhido o tempo de 120 horas de incubação. Pela análise da variância aplicada aos 14 supressores e os dois controles neste tempo de incubação (Tabela 12), fica evidente que interações estão ocorrendo entre supresso-

res e controles (efeito de linhagens) e entre supressores em si mesmos. A observação da Figura 3 nos permite uma melhor idéia destas interações e também perceber que isso ocorre de igual modo em outros tempos de incubação.

Realmente, merece destaque o fato de não ter sido significativo o efeito entre os controles em vista do fato de que a linhagem MSE cresceu em meio mínimo ao qual se adicionou todos os requisitos nutricionais e o controle nic⁺, identicamente aos supressores, cresceu em meio mínimo adicionado de todos os requisitos nutricionais exceto ácido nicotínico; a consideração de tais evidências nos levam a concluir que o ácido nicotínico exógeno não está influenciando no rendimento das linhagens.

Em vista destas considerações, o teste de Dunnett foi aplicado para detectar as diferenças dos 14 supressores em relação a linhagem MSE original, com a vantagem de possuir seguramente a mesma constituição (background) genética que os supressores.

Os resultados expostos na Tabela 13 indicam que não existem diferenças significativas entre os supressores su 63, su 70, su 122, su 124 e su 143 (estas conotações são as preliminares - vide Tabela 4) e os controles e portanto as potencialidades dos genes supressores em restaurar a condição selvagem são máximas; já em relação aos supressores su 8,

su 25, su 45, su 92, su 97, su 101, su 112, su 135 e su 166 a significância ao nível de 1% de probabilidade indica que as potencialidades destes genes em restaurar a condição selvagem é apenas parcial. A observação de Figura 3 é uma ratificação para estas considerações.

Em relação aos supressores analisados geneticamente, adotando-se aqui já as conotações definitivas (vide conversão na Tabela 14), cinco deles *su 12, su 13, su 14, su 15, su 16*, com genes localizados em diferentes grupos de ligação, grupos VII, IV, IV, IV e VI, respectivamente, exibiram eficiência se semelhante a linhagem MSE original mostrando que as potencialidades da supressão não depende da localização do gene supressor em relação aos diversos grupos de ligação do fungo.

Os supressores *su 17 e su 18*, cujos genes estão localizados no grupo de ligação VII, o mesmo da marca *nícB₈*, tem potencialidades de supressão reduzidas.

* * * * *

As informações extraídas deste trabalho representam algumas contribuições para o estudo do fenômeno da supressão e da deficiência para ácido nicotínico em *A. nidulans*. Entretanto, vários aspectos precisam ser ainda melhor investigados, entre os quais passaremos a sugerir alguns.

Na indução de supressores *nicB*₈ poderiam ser empregados diferentes agentes mutagênicos, como por exemplo, mutagênicos químicos cujo modo de ação é conhecido na tentativa de se estabelecer as bases moleculares da supressão em *Aspergillus*. Além do mais, as potencialidades de indução de mutações supressores de diversos mutagênicos poderiam ser comparadas através da frequência de supressão.

Em relação a luz ultra-violeta poder-se-ia estudar o efeito da dose e tempo de irradiação na obtenção de supressores *nicB*₈ e também poderia ser analisado o efeito do mutagênico na reversão de vários alelos.

Um aspecto que precisa, indubitavelmente, ser melhor esclarecido é o modo de ação dos supressores relacionado ao sistema de regulação da ação gênica. Em adição ao sistema de regulação em cascata proposto por MIRANDA FILHO (1972) e MIRANDA FILHO e AZEVEDO (1974) postulamos a existência de um sistema alternativo deste, mas sem dúvida alguma novas informações precisam ser obtidas com a finalidade de melhor esclarecer este mecanismo.

Novos supressores, presumivelmente localizados em grupos de ligação distintos possibilitarão a obtenção de informações que contribuirão para a compreensão do mecanismo da supressão e verificação da existência de mecanismos alternativos de biossíntese do ácido nicotínico. Neste aspecto a obtenção

de super-supressores poderá trazer contribuições de alto valor como ficou evidenciado pela interferência de supressores *nícB₈* no metabolismo do tiosulfato de sódio.

Paralelamente, a necessidade de investigações bioquímicas que conduzam ao conhecimento do complexo de reações que determinam a síntese de ácido nicotínico é sem dúvida um importante aspecto da supressão a ser trabalhado conforme ficou evidenciado nesta investigação.

Finalizando, o conhecimento do efeito da ação de dois ou mais supressores *nícB₈* colocados nos grupos de ligação de uma mesma linhagem, e investigações sobre a especificidade dos supressores (*COSTA, 1979 em preparação*), isto é, saber se estes supressores tem habilidade de suprimir também outros genes que condicionam deficiência em ácido nicotínico, seriam importantes aspectos que contribuiriam para um conhecimento mais amplo do fenômeno da supressão em *Aspergillus*.

Fica evidente que o conhecimento destes vários aspectos sugeridos trarão novos pontos a serem estudados pois isto constitui a essência da investigação científica e a somatória do conhecimento acumulado tem sido a base do desenvolvimento da Genética, da Biologia e da Ciência em geral.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho e que foram objetos de discussão no ítem anterior proporcionaram uma série de informações que enumeramos a seguir:

a) Na obtenção de supressores da marca genética *nicB₈*, espontaneamente e por indução através de luz ultra-violeta é necessário corrigir-se a frequência de supressão inicialmente detectada pois que muitas colônias aparentemente de fenótipo *nic⁺* são na realidade devidas a fenocópias ou instabilidade e não mantêm o caráter supressor quando replicadas.

b) A luz ultra-violeta revelou-se um potente indutor de mutações supressoras da marca genética *nicB₈* em *Aspergillus nidulans*; a frequência de supressão caracterizou-se como um bom método na avaliação das potencialidades de agentes mutagênicos e pode ser tomada como um bom teste para determinação de frequências de mutações induzidas.

c) Sete supressores analisados geneticamente foram mapeados em diferentes grupos de ligação: três genes foram localizados no grupo de ligação IV, um gene no grupo de ligação VI e dois genes no grupo de ligação VII; somente uma mutação caracterizou-se como reversão verdadeira de *nícB₈*.

d) O modo de ação dos supressores, relacionado 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, foi postulado também um sistema alternativo deste, no qual o produto gênico do supressor atua como co-repressor que juntamente com o repressor produzido pelo locus *R₁* da síntese de ácido nicotínico formam um complexo repressor que bloqueia a ação dos genes estruturais. Vários supressores *nícB₈* evidenciaram capacidade de interferir no mecanismo de síntese do tiosulfato de sódio quer seja positivamente, quer seja negativamente.

e) A medida da elongação micelial tomada para determinar as potencialidades de supressão dos genes mutantes caracterizou a existência de dois grupos de supressores: um em que a supressão é capaz de restaurar totalmente o crescimento do tipo selvagem e outro em que a restauração é apenas parcial. A análise da variância evidenciou que existem diferenças marcantes entre os supressores e que estas diferenças são devidas aos aspectos genéticos da supressão. O ácido nicotínico exógeno não é responsável por diferenças verificadas no crescimento das linhagens, incluindo-se os controles.

8. SUMMARY

The purpose of this paper is the study and genetic characterization of *nicB₈* suppressors in *Aspergillus nidulans*. Some aspects as the improvement of the criterion used in the selection and isolation of suppressors, the meaning of the suppression frequency as a method of determination of the mutagenic activity, the characterization of the suppression potentialities of various genes and the attainment of super-suppressors were particularly analysed. With this aim, the strain MSE was used for the spontaneous obtention of suppressors and by induction through the ultraviolet light. The genetic analysis showed the existence of different suppressors that were located in distinct linkage groups of the *Aspergillus nidulans*, namely: three suppressors in the linkage group IV, one in the linkage group VI and two suppressors in the linkage group VII; only one mutation was characterized as a true reversion of *nicB₈*.

The methodology used revealed itself appropriate in the determination of the frequency of induced mutations. The genetic divergences amongst the suppressors could become evident by the measurement of the mycelial elongation and a necessity of setting up the criterion more adequate for the selection and isolation of suppressors was shown. The cascade regulation system was applied to explain the mode of action of some suppressors, although the evidences suggested the assumption of an alternative regulation system for other suppressors.

9. 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.
- ARST, Jr., H.N., 1976. Integrator gene in *Aspergillus nidulans*. Nature, 262(5565):231-234.
- ARST, Jr., H.N. e D.J. COVE, 1973a. Nitrogen metabolic repression in *Aspergillus nidulans*. Molecular General Genetics, 126(2):111-141.
- ARST, Jr., H.N. e D.J. COVE, 1973b. Genetics of nitrogen metabolism in *Aspergillus*. Genetics, 74(2):s10.
- ARST, Jr., H.N. e D.W. McDONALD, 1975. A gene cluster in *Aspergillus nidulans* with an internally located cis-acting regulatory region. Nature, 254(5495):26-31.
- ARST, Jr., H.N., C. SCAZZOCCHIO e T. KRISTENSEM, 1973. A locus specific lysine suppressor in *Aspergillus nidulans*. Heredity, 31(3):429.

- ARST, Jr., H.N. e C. SCAZZOCCHIO, 1975a. Initiator constitutive mutation with an "Up-Promoter" effect in *A. nidulans*. Nature, 254(5495):31-34.
- ARST, Jr., H.N. e C. SCAZZOCCHIO, 1975b. An initiator constitutive mutation with "Up-Promoter" activity in *Aspergillus nidulans*. Heredity, 34(2):291.
- AZEVEDO, J.L., 1973. Isolamento 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. 288p.
- AZEVEDO, J.L., A. OLIVEIRA e A.J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replícadador 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.
- BAL, J., D.M. MACIEJKO, E.M. KAJTANIAK e W. GAJEWSKI, 1978. Supersuppressors in *Aspergillus nidulans*. Molecular General Genetics, 159(2):227-228.
- 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.
- BARR, H.J., 1973. Chromosome suppressors of variegating position effects in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 74(2):s16.

- BARTNIK, E. e P. WEGLENSKI, 1974. Regulation of arginine catabolism in *Aspergillus nidulans*. Nature, 250(5467):590-592.
- BERTRAND, H. e J. KOHOUT, 1977. Nuclear suppressors of the (poky) cytoplasmic mutant in *Neurospora crassa*. II. Mitochondrial cytochrome systems. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 19(1):81-91.
- BRINCK, N.G., 1972. Tryptophan transport in *Neurospora crassa* by various types of *mtx* revertants. Journal of General Microbiology, 73(1):153-160.
- BROWN, L.P. e R. AIUTO, 1973. Chemically induced reversion and suppression of methionine - I. Alleles of *Neurospora crassa*. Mutation Research, 21(5):251-255.
- BUTCHER, A.C., J. CROFT e M. CRINDLE, 1972. Use of genotype environmental interaction analysis in the study of natural populations of *Aspergillus nidulans*. Heredity, 29(3):263-283.
- CAPECCHI, M.R., S.H. HUGLES e G.M. WAHL, 1975. Yeast super-suppressors are altered tRNAs capable of translating a nonsense codon in vitro. Cell, 6(3):269-277.
- 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 General Genetics, 138(1):33-40.

- CHALMERS, Jr., J.H. e T.W. SEALE, 1971. Supersuppressible mutants in *Neurospora*: Mutants at the try-1 and try-2 loci affecting the structure of the multienzyme complex in the tryptophan pathway. Genetics, 67:353-363.
- CHANG, S.T., 1972. Genetic studies of a done mutant and its suppressor gene in *Schizophyllum commune*. Australian Journal of Biological Science, 25(4):757-764.
- CHANG, S.T. e D.G. CATCHESIDE, 1973. An allele specific suppressor of pan 2 mutants in *Neurospora crassa*. Genetics, 74(2):s44.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1973. Gene symbols in *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, 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 *Podospora anserina*. Resistance to cycloheximide. Journal of Bacteriology, 131(3):876-883.
- COSTA, C.V., 1979. Interação entre supressores do mutante pa ra ácido nicotínico em *Aspergillus nidulans* (no prelo).
- COX, B.S., 1977. Allosuppressors in yeast. Genetical Research, 30(2):187-206.
- CYBIS, J., M. PIOTROWSKA e P. WEGLENSKI, 1972. Genetic control of the arginine pathway in *Aspergillus nidulans*. Common regulation of anabolism and catabolism. Molecular General Genetics, 118(3):273-277.

- DORN, G.L., 1967. A revised map of the eight linkage group of *Aspergillus nidulans*. Genetics, 56:619-620.
- DUDICK, M. e T.R.F. WRIGHT, 1973. A temperature-sensitive allele of suppressor of forked in *Drosophila*. Genetics, 74(2):s67.
- 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., 1973. Suppressor genes of a new allele of white coral in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 74(2):s76-s77.
- FARMER, J.L., 1977. An allele-specific suppressor of white-coral in *Drosophila melanogaster*. Heredity, 39(2):297-303.
- FAVRAUD, L. e J.L. AZEVEDO, 1978. Produção de biomassa em 11 nhagens de *Aspergillus nidulans* com supressores da deficiência em ácido nicotínico. Ciência e Cultura (supl.), 30(7):522-523.
- FINNERTY, V.G., L.M. BARTON, A. SCHALET, W.A. ELMER e P.D. SMITH, 1973. The suppressor of forked mutation: a putative protein synthesis mutant in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 74(2):s79-80.
- GAREN, A., 1968. Sense and nonsense in the genetic code. Science, 160:149-159.
- GERLACH, W.L., 1975. Genetic properties of some amber - ochre supersuppressors in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular General Genetics, 138(1):53-64.

GERLACH, W.L., 1976. Mutational properties of *supP* amber-ochre supersuppressors in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular General Genetics, 144(2):213-215.

GIRARD, J. e J.L. ROSSIGNOL, 1974. The suppression of gene conversion and intragenic crossing-over in *Ascobolus immersus*: Evidence for modifiers acting in the heterozygous state. Genetics, 76(2):221-243.

GIRTON, L.E. e M.A. RUSSEL, 1977. The effects of chloramphenicol on a temperature sensitive lethal allele of suppressor forked in *Drosophila melanogaster*. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 19(3):573.

GORINI, L., 1970. Informational suppression. Annual Review of Genetics, 4:107-134.

GORINI, L. e J.R. BECKWITH, 1966. Suppression. Annual Review of Microbiology, 20:401-422.

GRIFFITHS, A.J.F., 1973. Growth restoration of Ad-38 mutants of *Neurospora crassa* in the presence of supersuppressor genes. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 15(3): 658.

GRIFFITHS, A.J.F., 1975. Growth patterns of adenine 38 supersuppressors strains of *Neurospora crassa*. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 17(2):227-240.

GRIFFITHS, A.J.F., 1976. Evidence for nuclear restriction of supersuppressor gene products in *Neurospora* heterokaryons. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 18(2):35-38.

GRIFFITHS, A.J.F. e K.D. NEWCOMBE, 1973. The action of supersuppressors on Ad-38 mutations of *Neurospora crassa*. Genetics, 74(2):s101.

HARTMAN, P.E. e J.R. ROTH, 1973. Mechanisms of suppression.
In: Caspari, E.W., ed. Advances in Genetics, New York
and London, Academic Press, vol.17, 516p.:1-105.

HAWTHORNE, D.C. e D. LEUPOLD, 1974. Suppressors in yeast.
In: Arber et al., ed. Current Topics in Microbiology
and Immunology, Berlin and New York, Springer - Verlag,
vol.64, 157p.:1-47.

HYNES, M.J., 1972. Mutants with altered glucose repression
of amidase enzymes in *Aspergillus nidulans*. Journal of
Bacteriology, 111(3):717-722.

HYNES, M.J., 1975. A cis-dominant regulatory mutation
affecting enzyme induction in the eucaryote *Aspergillus
nidulans*. Nature, 253(5488):210-212.

JAIN, M.L., 1966. Biochemical definition of yellow
virescent and light green suppressor mutation in barley.
Genetics, 45:813-818.

JINKS, J.L., 1963. Extrachromosomal Inheritance. New Jersey,
Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs. 177p.

KÄFER, E., 1961. The presences of spontaneous recombination
in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. Genetics,
46:1581-1609.

KIGER, Jr., J.A., 1973. The inability of a *Drosophila
melanogaster* transfer RNA to suppress an amber mutation
in vitro. Genetics, 74(2):s138-s139.

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.

KOLTIN, Y., J. STAMBERG e R. RONEN, 1975. Meiosis as a source of spontaneous mutations in *Schizophyllum commune*. Mutation Research, 27(3):319-326.

LABARÈRE, J. e J. BERNET, 1978. A mutation inhibiting protoplasmic incompatibility in *Podospora anserina* that suppresses an extracellular laccase and protoperithecium formation. Journal of General Microbiology, 109(1):187-189.

LEBLON, G., 1972a. Mechanism of gene conversion in *Ascobolus immersus*. I. Existence of a correlation between the origin of mutants induced by different mutagens and their conversion spectrum. Molecular General Genetics, 115:36-48.

LEBLON, G., 1972b. Mechanism of gene conversion in *Ascobolus immersus*. II. The relationship between the genetic alterations in *b1* or *b2* mutants and their conversion spectrum. Molecular General Genetics, 116(4):322-335.

LEBLON, G. e N. PAQUÈTE, 1978. Intragenic suppression at the *b2* locus in *Ascobolus immersus*. I. Identification of three distinct groups of suppression. Genetics, 90(3):475-488.

LEBLON, G. e J.L. ROSSIGNOL, 1973. Mechanism of gene conversion in *Ascobolus immersus*. III. The interaction of heteroalleles in the conversion process. Molecular General Genetics, 122:165-182.

- LEE, G.L.G., 1970. The phenogenetics of a supersuppressor in *Drosophila melanogaster*. I. Phenotypic characterization and suppressor efficiency. Australian Journal of Biological Science, 23(1):645-655.
- LEE, G.L.G., 1973a. The phenogenetics of a supersuppressor in *Drosophila melanogaster*. II. Suppression and back-mutation. Australian Journal of Biological Science, 26(1):189-199.
- LEE, G.L.G., 1973b. The phenogenetics of a supersuppressor in *Drosophila melanogaster*. III. Supression at individual loci. Australian Journal of Biological Science, 26(4):903-909.
- LEWIS, D., 1961. Genetic analysis of methionine suppressors in *Coprinus lagopus*. Genetical Research, 2:141-155.
- LEWIS, D. e L.A. CASSELTON, 1975. Missense suppression in *Coprinus lagopus* associated with a chromossome duplication. Journal of General Microbiology, 88(1):20-26.
- LILLY, L.J., 1965. An investigation of suitability of the meth₁ in *Aspergillus nidulans* for the study of induced and spontaneous mutation. Mutation Research, 2:192-195.
- LUKESZKIEWICZ, Z. e A. PASZEWSKI, 1976. Hyper-represible operator-type mutant in sulfate permease gene of *Aspergillus nidulans*. Nature, 259(5541):337-338.
- McGULLY, K.S. e FORBES, 1965. The use of p-fluorophenylalanine with "master strain" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. Genetical Research, 6:352-359.
- MACREADY, S.J. e B.S. COX, 1973. Antisuppressors in yeast. Molecular General Genetics, 124(4):305-320.

- McCREADY, S.J. e B.S. COX, 1976. Suppressor specificity of antisuppressors in yeast. Genetical Research, 30(2): 129-138.
- MENEZES, E.M., 1974. Análise genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Dissertação apresentada a ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre. 114p. Piracicaba, São Paulo.
- MENEZES, E.M. e J.L. AZEVEDO, 1978. Reversion in variants from a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. Molecular General Genetics, 164:255-258.
- MIRANDA FILHO, J.B., 1972. Supressores do mutante *níc₈* em *Aspergillus nidulans*. Dissertação apresentada a ESALQ/USP, para obtenção do título de mestre. 83p. Piracicaba, São Paulo.
- MIRANDA FILHO, J.B. e J.L. AZEVEDO, 1974. Nicotinic acid suppressors in *Aspergillus nidulans*. Experientia (Basel), 30(4):356-358.
- MORGAN, O.H., 1961. Recombination and complementation between suppressor genes in *Coprinus lagopus*. Heredity, 16:239.
- MORGAN, D.H., 1965. Suppression of "purple" in *Coprinus lagopus* and anomalous situation. Genetical Research, 7: 195-206.
- NEWCOMBE, K.D. e A.J.F. GRIFFITHS, 1973. The suppression of *ad 3B* mutants by supersuppressors in *Neurospora crassa*. Genetics, 75(4):615-622.

OLIVEIRA, L.M.M.B., 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. 116p. Piracicaba, São Paulo.

OZIER-KALOGEROPOULOS, O. e J.L. GUERDOUX, 1975. Modifications of high frequency of reversion of the nicotinic 2 mutant of *Coprinus radiatus*: II. Polymorphism of strain with low frequencies of reversion. Mutation Research, 33(2/3): 113-133.

PASZEWSKI, A. e J. GRABSKI, 1974. Regulation of S-amino acids biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. Role of cysteine and/or homocysteine as regulatory effectors. Molecular General Genetics, 132(4):307-320.

PERSON, K., 1976. Reversible temperature sensitive fertility in *Drosophila melanogaster*. Hereditas, 8(2):249.

PETERSON, P.A. e O. LELEJI, 1974. Diferencial activity of dominant aleurone color suppressors in maize. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 16(2):389-398.

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-BENNOUM M., 1976. Genetic evidence for ribosomal antisuppressors in *Podospora anserina*. Molecular General Genetics, 147(3):299-306.

PIMENTEL GOMES, F., 1973. Curso de estatística experimental. 5ª imp., São Paulo, Livraria Nobel S/A. 430p.

- POLKINGHORNE, M. e M.J. HYNES, 1975. Mutants affecting histidine utilization in *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, 25(2):119-136.
- 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. McDONALD e A.W.J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, 5:141-238.
- PONTECORVO, G., E. TARR-GLOOR e E. FORBES, 1954. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. Journal of Genetics, 52:226-237.
- PORTIN, P., 1975. Allelic negative complementation at the abruptex locus of *Drosophila melanogaster*. Genetics, 81(1):121-133.
- PROUT, T., J. BUNDGAARD e S. BRYANT, 1973. Population genetics meiotic drive suppressors. Genetics, 74(2):s220.
- PYATI, J., 1976. Position effect suppression of ribosomal RNA gene in *Drosophila melanogaster*. Non-autonomous in gynandromorphs?. Genetical Research, 28(1):89-91.
- RAND, K.N. e H.N. ARST Jr., 1977a. A novel regulatory mutation in *Aspergillus nidulans*. Heredity, 39(3):433.
- RAND, K.N. e H.N. ARST Jr., 1977b. A mutation in *Aspergillus nidulans* which affects the regulation of nitrite reductase and is tightly linked to its structural gene. Molecular General Genetics, 155(1):67-76.

- RASMUSSEN, B., I. MONTELL e L. OHRING, 1973. In vivo and in vitro studies of GTP - cyclohydrolase activity in some different eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. Genetics, 74(2):s225.
- ROBERTS, T.J., S.D. MARTINELLI e C. SCAZZOCCHIO, 1978. Allele-specific suppressor mutations in *Aspergillus nidulans*. Heredity, 41(1):129.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experientia, 8:14-15.
- SEALE, T.W., 1968. Reversion of the *am* locus in *Neurospora*: evidence for nonsense suppressors. Genetics, 58:85-99.
- SEALE, T.W., 1970. Monallelic supersuppressors in *Neurospora*. Genetics, 64:57.
- SEALE, T.W., 1972. Supersuppressors in *Neurospora crassa*. I. Induction, genetic localization and relationship to a missense suppressors. Genetics, 70:385-396.
- SEALE, T.W., 1976. Supersuppressor action spectrum in *Neurospora*. Molecular General Genetics, 148(1):105-108.
- SEALE, T.W., M. BRETT, A.J. BARON e J.R.S. FINCHAM, 1977. Amino acid replacements resulting from suppression and missense reversions of a chain terminator mutation in *Neurospora*. Genetics, 86(2):261-274.
- 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 General Genetics, 151(2):189-195.
- SEALE, T.W., J.R.S. FINCHAM e M. BRETT, 1976. Amino acid replacement analysis of suppression and missense reversion of a nonsense mutation in *Neurospora*. Heredity, 37(3):452.
- SCOTT, B.R., T. ALDERSON e D.G. PAPWORTH, 1973. The effect of plating densities on the retrieval of methionine suppressor mutations after ultraviolet or gamma irradiation of *Aspergillus*. Journal of General Microbiology, 75: 235-239.
- SCOTT, B.R., T. ALDERSON e D.G. PAPWORTH, 1976. UV mutagenesis in inhibitor depleted conidia of *Aspergillus nidulans*. Mutation Research, 35(2):213-220.
- 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 supressor gene action. Molecular General Genetics, 134(1):85-92.
- SIDDIQI, O.H., 1962. Mutagenic action of nitrous acid on *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, 3:303-314.
- SLATKO, B. e Y. HIRAIZUMI, 1978. Genetic suppression of male recombination activity in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 88(4):s92.

- SMIRNOV, V.N., V.G. KREIER, L.V. LIZLOVA, V.M. ANDRIANOVA e S.G. INGE-VECHTOMOV, 1974. Recessive super suppression in yeast. Molecular General Genetics, 129(2):105-121.
- SPARROW, J.C. e J.H. SANG, 1974. Physiological genetics of melanotic tumours in *Drosophila melanogaster*: VIII. The role of choline in the expression of the tumor *tubw* and of its suppressors, *su tu*. Genetical Research, 24(2): 215-227.
- STEEL, R.G.D. e J.H. TORRIE, 1960. Principles and procedures of statistics. New York, Mc Graw-Hill Company Inc. 481p.
- TODD, N.K. e L.A. CASSELTON, 1972. Non complementation between recessive supressor gene mutations in *Coprinus lagopus*. Heredity, 28(2):274.
- TODD, N.K. e L.A. CASSELTON, 1973. Non complementation and recessiveness as proprieties of missense suppressor genes in the fungus *Coprinus*. Journal of General Microbiology, 77(1):197-207.
- WADDLE, F.R., 1978. Evidence for multiple suppressors of segregation distorter on a third chromossome in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 88(4):s106.
- WAGNER, R.P. e H.K. MITCHELL, 1955. Genetics and metabolism. New York, John Wiley and Sons, Inc., London, Chapman and Hall, Limited, 1a. edition. 444p.
- WAGNER, R.P. e H.K. MITCHELL, 1964. Genetics and metabolism. New York, London and Sydney, John Wiley and Sons, Inc., 2a. edition. 673p.

WARING, R.B. e C. SCAZZOCCHIO, 1976. Suppressors of a mitochondrially inherited mutation in *Aspergillus nidulans*. Heredity, 37(1):153.

WARR, J.R. e J.A. ROPER, 1965. Resistance to various inhibitours in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 40:273-281.

WEGLENSKI, P., E. BARTINIK e W. GAJEWSKI, 1973. Glucose and ammonium repression of arginine catabolic enzymes in *Aspergillus nidulans*. Genetics, 74(2):s293.

WHITE, B.N., 1975. An analysis of transfer RNA in five minute and two suppressor mutants of *Drosophila melanogaster*. Genetics, 80(3):s83-s84.

WOSNICK, M.A. e B.N. WHITE, 1977. A doubtful relationship between a transfer RNA modification and suppression in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 86(2):s71.

--ooo000ooo--