

MUTANTES LETAIS TERMOSENSÍVEIS EM *ASPERGILLUS NIDULANS*¹

P. C. DE OLIVEIRA* & M. H. ANDERSEN**

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

SUMÁRIO: Amostras termossensíveis (42°C) de *A. nidulans* foram obtidas pela irradiação com U.V. Dentre 18 mutantes termossensíveis, 3 demonstraram que o determinante da termossensibilidade era causado por efeitos associados com o núcleo e foram selecionados para estudos posteriores.

Foram sintetizados diplóides entre amostras normais e os três mutantes (mais um) exibindo letalidade a 42°C e foi verificada uma completa recessividade em todos os casos.

Para fins comparativos foram feitas tentativas para encontrar casos de "adaptação". Heterocários nutricionais balanceados, entre *ts1* e amostras do tipo selvagem para o alelo correspondente, mostraram resultados bastante diferentes quando experimentados em diferentes tempos de incubação inicial a 37°C e depois transferidos para 41°C. Os heterocários praticamente não apresentaram resposta adaptativa às mudanças de temperatura.

A ligeira diferença de comportamento heterocário: heterozigoto provavelmente é resultante do efeito de dosagem.

Os resultados reafirmam e oferecem confiança na estabilidade dos heterocários quando em condições constantes de meio.

OS mutantes letais condicionais comportam a categoria dos mutantes termossensíveis, onde genes essenciais tornam-se inativos a altas temperaturas, mas, não a baixas temperaturas.

Em Bacteriófago *T₄*, há uma larga e heterogênea classe de mutantes termossensíveis estudada por EDGAR, DENHARDT & EPSTEIN⁽³⁾.

Em outros microrganismos, tais mutantes têm sido explorados em diversos estudos genéticos e bioquímicos.

Há poucas referências sobre estes mutantes em *Aspergillus* (4, 8, 9, 1). Até o presente, não têm sido exploradas as comparações dos fenótipos dos heterocários e dos heterozigotos correspondentes, em mutantes termossensíveis de *Aspergillus nidulans*, que é um dos poucos organismos a se prestar ao estudo comparativo da interação entre alelos, em um mesmo núcleo (diplóides) e em um citoplasma comum separados pelas membranas nucleares (heterocários).

1 Recebido para publicação em 7 de maio de 1974.

* Pesquisador em Biologia do Instituto Oswaldo Cruz e Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

** Bolsista do Instituto Oswaldo Cruz.

Este trabalho tem também a finalidade de ampliar o conhecimento de tais mutantes e complementar as investigações sobre *adaptação* (6, 2).

MATERIAL E MÉTODOS

As técnicas gerais usadas foram as de PONTECORVO, ROPER, HEMMONS, MACDONALD & BUFTON (10), WARR & ROPER (14) e CUNHA (2).

As amostras de *Aspergillus nidulans* empregadas neste trabalho eram provenientes da coleção do Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, foram conservadas a 5°C, em meio completo (MC). Os alelos mutantes usados foram descritos por PONTECORVO *et al.* (10). Os de maior importância são: *y* conídio amarelo; *w*₃, conídio branco; *bi*₁, *pyro*₄, *nic*₂ e *nic*₈, *ribo*₂ e *ribo*₅, *s*₃ exigências nutricionais respectivamente para biotina, piridoxina, ácido nicotínico, riboflavina e tiosulfato; *su*₁*ad*₂₀, supressor de *ad*₂₀; *facA*, inabilidade de crescer em meio de acetato; *gal*₁, inabilidade de crescer vigorosamente em meio de galactose; *Act*₁ (semidominante), resistência à actidione; e *tsl*₄, inabilidade de crescer a 42°C.

Meios

Meio mínimo (MM), Czapek-Dox com 1% de glicose. Meio completo (MC), um meio complexo contendo extrato de levedo, caseína hidrolisada, ácido nucleico hidrolizado, vitaminas, etc. Os meios sólidos contêm 2,5% de agar.

Isolamento de mutantes termossensíveis

A amostra *bi*₁; *tsl*₄ foi fornecida pelo Departamento de Genética da Universidade de Sheffield. Os demais mutantes termossensíveis foram obtidos pela irradiação da amostra *bi*₁ com luz ultravioleta.

RESULTADOS

Isolamento dos mutantes termossensíveis

A indução dos mutantes foi realizada pela irradiação, com lâmpada de mercúrio emitindo principalmente radiações de 2.537 Å de comprimento de onda, de 20 ml da suspensão de conídios da amostra de *A. nidulans bi*₁, em placa de *Petri* de 150 mm de diâmetro, aberta e com agitação contínua. Ao todo, aproximadamente, 60.000 conídios foram tratados, em 5 irradiações diferentes, e com uma taxa de cerca de 4% de sobreviventes expressa em função de um controle não irradiado. Computando os resultados das experiên-

cias, assim pode-se resumir: As sobreviventes de morfologia normal, 2.376 colônias, foram testadas nos meios MM, suplementadas com biotina, MC e nas temperaturas de 34° e 42°C. As leituras foram feitas com 48 h de incubação. Foram notadas as seguintes alterações: 6 colônias apresentaram crescimento reduzido ou nulo em MM acrescido de biotina e em MC a 34°C; 4 colônias só cresceram em MC e a 34°C; 2 colônias apresentaram morfologia colonial diferente a 42°C em ambos os meios; 15 apresentaram crescimento muito reduzido ou nulo em MM suplementado com biotina a 34°C e 42°C; e finalmente 18 colônias apresentaram crescimento reduzido ou nulo em MM suplementado com biotina e em MC a 42°C.

Deste grupo de 18 amostras foram selecionadas, para o desenvolvimento do presente trabalho, 3 mutantes com as seguintes características: a) incapacidade de crescimento a 42°C; b) não apresentarem, a 37°C qualquer indício de alteração do fenótipo (quanto ao crescimento, morfologia colonial e exigência nutricional); c) apresentarem, tais características estáveis nas suas subculturas; d) quando submetidos ao teste do heterocáριο demonstrarem clara evidência de que o determinante da termossensibilidade era causado por efeitos associados com o núcleo (6).

Estes mutantes receberam as designações: I – *bi*₁; *tsl* 185. II – *bi*₁; *tsl* 184. III – *bi*₁; *tsl* 189.

Não foram feitas tentativas para demonstrar a identidade dos alelos nas amostras termossensíveis usadas. Só a amostra *bi*₁; *tsl* 189, foi analisada do ponto de vista genético, apresentando indicação da presença da marca *tsl* no "linkage group" IV, e uma translocação não recíproca III; V (1).

Algumas tentativas foram realizadas com o fito de sintetizar amostras *tsl* e também portadoras de marcas morfológicas e nutricionais diversas. Não houve persistência neste intento, por se dispor da possibilidade de variar o outro componente do heterocáριο ou heterozigoto.

Expressão da termossensibilidade

1. Foram conjugadas quatro diferentes amostras de termossensíveis (I – *bi*₁; *tsl* 185; II – *bi*₁; *tsl* 184; III – *bi*₁; *tsl* 189; e IV – *bi*₁; *tsl* 4), com a "Master Strain E", e a partir de seus heterocários balanceados, foram obtidos os respectivos diplóides heterozigotos (11). Submetidos ao teste de dominância os diplóides comportaram-se como o tipo selvagem, isto é, não termossensíveis, e os heterocários mostraram desenvolvimento quase desprezível, à temperatura de 41°C não podendo ser interpretado como uma efetiva complementação.

2. Procurando explorar a dosagem dos alelos *tsl*⁻, *tsl*⁺, em função das temperaturas de cultivo, subculturas do heterocáριο *bi*₁; *tsl* 189 + MSE, foram mantidas a diferentes temperaturas e as proporções destes alelos foram avaliadas seguindo a técnica de

abordagem indireta pela avaliação conidial (2). Foram feitos três inóculos de subcultura em cada placa e quatro placas para cada temperatura diferente. A tomada de conídios para a avaliação foi sempre feita no sexto dia de incubação. Ante a sugerida variação na exigência de biotina pelo *A. nidulans*, a

diferentes temperaturas (13), esta vitamina foi acrescentada ao MM (50 mg/l), de duas das placas cultivadas a 41°C e houve muito pouca melhoria no aspecto de seus heterocários e nenhuma alteração na proporção conidial. Os resultados vão expostos na tabela I.

Tabela I

Proporção de conídios no heterocáριο $bi_1; tsl\ 189 + MSE$ em MM e em várias temperaturas

Temperatura °C	N.º total de Colônias	Colônias verdes (%)	Colônias brancas (%)	Observações sobre desenvolvimento de heterocáριο
28	2.693	68	32	Pobre
34	2.413	66	34	Bom
37	1.956	66	34	Excelente
41	1.163	50	50	Reduzido e esbranquiçado

3. Estudando uma possível "adaptação" inúmeros heterocários foram sintetizados e alguns foram exaustivamente explorados:

I - $bi_1; tsl\ 185 + y; pyro_4$.

Esta combinação heterocariótica apresentou um crescimento a 37°C com a proporção de 69% de conídios verdes, para 31% de conídios amarelos, em um total de 324 conídios avaliados (222 verdes, 102 amarelos). Entretanto, era contra-indicada sua utilização, pois houve o aparecimento de setores cotonosos, que poderiam ser atribuídos, talvez, a uma herança citoplasmática (12).

II - $bi_1; tsl_4 + y; pyro_4$.

III - $bi_1; tsl\ 184 + y; nic_2; ribo_5$.

Depois de várias tentativas de forçar a heterocariose entre os componentes do item II e III não obtivemos sucesso, talvez por incompatibilidade entre as amostras (2, 5, 4).

IV - $bi_1; tsl\ 189 + MSE$.

Este heterocáριο foi particularmente estudado. As suas subculturas foram inicialmente mantidas a 37°C,

e decorridos períodos variáveis de tempo foram transferidas para estufa a 41°C. Só as subculturas mantidas, no mínimo, 48 horas a 37°C, apresentaram heterocários com aspectos normais. As subculturas mantidas 30 ou menos horas a 37°C apresentaram um desenvolvimento similar entre si e precário. As proporções conidiais alcançadas nestas diversas condições, parecem oferecer pouco auxílio para o estudo da adaptação. Os resultados dos equilíbrios obtidos são mostrados na tabela II.

V - $bi_1; tsl\ 184 + y; pyro_4$.

Este heterocáριο foi testado à semelhança do anterior, obtendo-se os resultados: Subculturas sempre a 37°C: 70% colônias verdes, 30% colônias amarelas; subculturas inicialmente mantidas 72, 48 e 24 h a 37°C e a seguir a 41°C, assim como, as cultivadas sempre a 41°C: 8% colônias verdes, 92% colônias amarelas. Observaram-se apenas variações de $\pm 2\%$ para as diferentes determinações.

Parecem ser de fundamental importância os dois pontos em que os resultados dos heterocários IV e V diferem entre si: 1.º) No heterocáριο IV a proporção dos alelos altera, aproximadamente, de $2\ tsl^- : 1\ tsl^+$, para $1\ tsl^- : 1\ tsl^+$. Enquanto no heterocáριο V, passa,

Tabela II

Proporção conidial no heterocário $bi_1; tsl 189 + MSE$, alterando o tempo da temperatura inicial do desenvolvimento

N.º de horas de cultivo 37°C*	N.º total de Colônias contadas	Colônias verdes (%) (ts_1^-)	Colônias brancas (%) (ts_1^+)	Observações sobre desenvolvimento do heterocário
Sempre	1.255	68	32	Excelente
48	1.194	62	38	Excelente
30	1.499	48	52	Muito pobre
24	1.233	48	52	Muito pobre
12	1.330	49	51	Muito pobre
9	1.345	53	47	Muito pobre
6	1.175	48	52	Muito pobre
4	1.276	52	48	Muito pobre
2	1.806	47	53	Muito pobre
0	1.163	50	50	Muito pobre

* Após este período inicial de incubação a 37°C, as placas foram transferidas para a estufa a 41°C.

aproximadamente, de $2\ ts_1^- : 1\ ts_1^+$, para $1\ ts_1^- : 9\ ts_1^+$.
2.º) No conjugado IV, um estabelecimento inicial da heterocariose parece proteger o seu desenvolvimento. O que não parece ocorrer no heterocário V, onde, mesmo com uma dilatação do período inicial de incubação a 37°C, aparenta não garantir o desenvolvimento, em equilíbrio, do heterocário.

VI - $bi_1; tsl 185 + Act_1; pyro_4; nic_8$.

Tentando demonstrar a não interferência de marcas visuais em heterocários balanceados onde, também, estaria presente u'a marca responsável pela termosensibilidade, foi estabelecido e testado o heterocário acima. Apesar de ter apresentado um crescimento exce-

lente e supostamente heterocariótico, ele demonstrou características insuficientes para permitir a escolha segura de áreas de amostragem para a avaliação conidial. Muito provavelmente uma escolha inadequada de áreas heterocarióticas foi a responsável pelos resultados difíceis de serem interpretados contraditórios, expostos na tabela III. Talvez estes resultados estejam refletindo a inabilidade do conjugado de encontrar uma proporção nuclear que pudesse satisfazer as necessidades nutricionais dos componentes e suas exigências quanto ao equilíbrio ts_1^- , ts_1^+ , em função da temperatura experimental. Por outro lado, a trabalhosa caracterização dos componentes (para maior segurança foram testados também quanto às exigências nutricionais) desaconselhou qualquer persistência no intento.

Tabela III

Proporção conidial no heterocário $bi_1; tsl 185 + Act_1; pyro_4; nic_8$, alterando o tempo da temperatura inicial do desenvolvimento

N.º de horas de cultivo 37°C	N.º total de Colônias testadas	% de Colônias tsl^- e bi^-	% de colônias $tsl + Act_1, pyro_4, nic_8$
Sempre	19*	58	42
72	156	72	28
48	155	98	2
30	88*	78	22
24	156	100	—
0	155	98	2

* Por motivos técnicos não foi possível repetir para aumentar a amostragem.

DISCUSSÃO

Os mutantes letais condicionais termossensíveis foram escolhidos para o presente trabalho pela facilidade de obtenção (os resultados o demonstraram), pelo cômodo manuseio técnico e por permitir um estudo comparativo com outros mutantes já explorados do ponto de vista de complementação e adaptação.

Confirmando a expectativa, os diplóides heterozigotos com sua proporção fixa de 50% do alelo tsl^- mostraram-se termossensíveis. Portanto, em termos genéticos, o alelo tsl^- é recessivo. Entretanto, o precário, mas existente, desenvolvimento do heterocário que oferece uma útil flexibilidade na proporção nuclear, sugeriria uma semidominância do referido alelo quando em heterocariose. É muito provável que a diferença entre heterocário e heterozigoto seja o resultado do efeito de dosagem. Os termos “recessivo” e “dominante” somente poderiam ser referidos à heterocariose quando a razão nuclear fosse de 1:1 (2).

Um alelo semidominante, Act_1 , foi usado satisfatoriamente para mostrar mudanças adaptativas da taxa nuclear em heterocários de acordo com WARR & ROPER (14) e CUNHA (2). Os heterocários balanceados em marcas nutricionais, por si só, parecem não ser muito adequados para explorar esta alteração adaptativa e gradual (6). Evitando, até certo ponto, ou evidenciando as limitações impostas pelas combinações deste tipo, o uso de mutantes letais condicionais termossensíveis poderia oferecer uma ideal alternativa. Entretanto, seria temerário aceitar os atuais resultados como favoráveis a uma resposta adaptativa. A interpretação do comportamento destes heterocários, nestas condições, merece reserva e cautela.

Em 1953, PONTECORVO *et al.* (10) levantaram a questão se, no mecanismo de manutenção do heterocário, a seleção poderia alterar a razão nuclear no interior das hifas ou se há uma taxa diferencial de multiplicação das hifas de acordo com a proporção nuclear que elas soem possuir. Os resultados obtidos se não são supor-

te, pelo menos, estão de acordo com a hipótese mais simples, aceitando tais adaptações como provenientes da seleção entre hifas, pois as portadoras de um perfeito equilíbrio heterocariótico seriam preferencialmente selecionadas entre as hifas homocarióticas ou as com desvantagens na proporção nuclear.

SUMMARY

Temperature sensitive lethal mutants in *Aspergillus nidulans*

Temperature sensitive strains (42°C) of *Aspergillus nidulans* were obtained by U.V. irradiation. The mutant alleles had not been located and among 18 thermosensitive mutants three gave clear evidence that the determinant of thermosensitivity was caused by effects associated with the nucleus and were selected for further studies.

Diploids have been synthesised between normal strains and the three latter variants exhibiting lethality at 42°C and a complete recessivity of the character in each case was shown.

For comparative purposes attempts were made to find instances of "adaptation". Nutritionally balanced heterokaryons, between *tsl* and the wild type strains for the corresponding alleles had shown quite different results when experienced on increasing initial incubation time at 37°C and then were transferred to 41°C. Heterokaryons had not showed adaptative response to the changes of temperature. The heterokaryon: heterozygote slight difference of behavior doubtless arose as result of dosage effects.

The results reinforced and offered some confidence in heterokaryon stability under constant environmental conditions.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Adolpho da Rocha Furtado pela discussão do manuscrito. Ao Técnico de Laboratório, Sr. José de Moraes e Silva pelo eficiente preparo da vidraria e meios de cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – CUNHA, P. R. DA & NGA, B. H., 1968, Preliminary studies of a temperature sensitive mutant of *A. nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 9: 14.
- 2 – CUNHA, P. R. DA, 1970, A study of aspects of heterokaryosis in *Aspergillus nidulans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 68 (1): 119-167.
- 3 – EDGAR, R. S.; DENHARDT, G. H. & EPSTEIN, R. H., 1964, A comparative genetic study of conditional lethal mutations of bacteriophage *T₄ D*. *Genetics*, 45: 635.
- 4 – FORBES, E. & U. K. SINHA, 1966, Location of some temperature sensitive mutants. *Aspergillus News Letter*, 7: 17.
- 5 – GRINDLE, M., 1963, Heterokaryon compatibility of unrelated strains in the *Aspergillus nidulans* group. *Heredity*, 18: 191-204.
- 6 – JINKS, J. L., 1952, Heterokaryosis: A system of adaptation in wild fungi. *Proc. Roy. Soc., B* 140: 83-99.
- 7 – JINKS, J. L. & M. GRINDLE, 1963, The genetical basis of heterokaryon incompatibility in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 18: 407-412.
- 8 – NEDER, R. N., 1965, Temperature sensitive lethals in *A. nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 6: 6.
- 9 – OLIVEIRA, P. C. DE & M. H. ANDERSEN, 1971, Comportamento de mutantes termosensíveis em *Aspergillus nidulans*. *III Congresso Brasileiro de Microbiologia*.
- 10 – PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D. & BUFTON, A. W. J., 1953, The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advanc. Genet.*, 5: 141-238.
- 11 – ROPER, J. A., 1952, Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8: 14.
- 12 – ROPER, J. A., 1958, Nucleo-cytoplasmic interactions in *Aspergillus nidulans*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 23: 141-154.
- 13 – ROPER, J. A., 1966, Culture temperature and biotin requirement in *Aspergillus*. *Aspergillus News Letter*, 7: 22.
- 14 – WARR, J. R. & ROPER, J. A., 1965, Resistance to various inhibitors in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 40: 273-281.