



MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO NO FUNGO *Sordaria fimicola*

Lyria Mori, Maria Augusta Querubim Rodrigues Pereira e Carlos Ribeiro Vilela.

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Enviar correspondência para Lyria Mori, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 11.461, São Paulo - SP, 05422-970, Brasil.

E-mail: lmori@ib.usp.br; guquerubim@gmail.com; crvilela@ib.usp.br

Resumo

Nessa atividade é proposta a execução de um mapeamento cromossômico no fungo *Sordaria fimicola* que se baseia na determinação da frequência relativa dos ascos recombinantes entre dois marcadores, sendo um deles o centrômero. Além de permitir o uso do centrômero como marcador, outra vantagem da atividade proposta é possibilitar a análise dos produtos das meioses individuais a partir de fotomicrografias, sem a necessidade da realização de cruzamentos e da confecção de lâminas.

Introdução

O mapeamento cromossômico é um método de determinação da posição de um gene em relação a outro marcador, que pode ser outro gene ou, no caso de alguns fungos, o centrômero.

O primeiro mapa cromossômico da história da genética, publicado em 1913, foi feito para o cromossomo X de *Drosophila melanogaster* por A. H. Sturtevant com base na frequência relativa de indivíduos recombinantes para genes localizados naquele cromossomo (Sturtevant, 2001). Em *Drosophila melanogaster* ($2n = 8$), as quatro células haplóides resultantes da meiose de cada célula diplóide ficam misturadas com as células haplóides resultantes das meioses de outras células. O mesmo acontece na maioria dos organismos.

Entretanto, em leveduras, como por exemplo *Saccharomyces cerevisiae*, as quatro células haplóides (ascósporos) resultantes da meiose de cada célula diplóide ficam isoladas, embora desordenadamente, dentro de um saco esférico denominado asco. Todavia, essa desordenação não ocorre nas espécies de fungos dos gêneros *Sordaria* e *Neurospora*, pois os produtos (ascósporos) de cada célula que se divide por meiose ficam arranjados linearmente dentro de um asco cilíndrico. Isto acontece porque o asco cilíndrico, sendo muito estreito, faz com que o fuso meiótico fique alinhado com o eixo maior do asco, não sobrando espaço para outro tipo de arranjo.

O fungo microscópico *Sordaria fimicola* é homotático (que se reproduz sexuadamente a partir de apenas um tipo de hifa haplóide) e cosmopolita, sendo geralmente encontrado em fezes de herbívoros. De fato, *fimicola* (*fimi* = fezes; *cola* = habitante) é um termo latino que literalmente significa “habitante das fezes”. Trata-se de um fungo que, exceto por uma breve fase diplóide ($2n = 18$) que precede a meiose, tem basicamente um ciclo de vida haplóide ($n = 9$), sendo constituído por hifas multinucleadas. Porém, com a fusão das extremidades de duas hifas há formação de uma célula binucleada que se multiplica várias vezes por mitose dando origem a várias células também binucleadas. Nesta fase pode ocorrer a fertilização por meio da fusão dos pares de núcleos, formando assim as células mononucleadas diplóides ($2n$) que darão origem aos ascos que ficam aprisionados dentro do corpo de frutificação piriforme, denominado peritécio (Fig. 1).

A divisão meiótica de cada célula mononucleada produz 4 núcleos haplóides que sofrem uma mitose originando assim 8 núcleos haplóides que, por sua vez, diferenciam-se em ascósporos que são mantidos em ordem linear no interior do asco cilíndrico. Esse arranjo reflete diretamente a ordem das cromátides no núcleo de uma célula diplóide em processo de meiose (Fig. 2). Esse processo ordenado é que permite identificar quais das quatro cromátides participaram efetivamente do evento da permuta entre os dois marcadores (no caso, um gene e o centrômero) durante a recombinação intracromossômica, possibilitando o cálculo da distância relativa entre eles. Se as trocas ocorrem entre um par de alelos marcadores e o centrômero, os alelos diferentes (um selvagem e o outro mutante) só irão se separar durante a segunda divisão meiótica, pois as cromátides irmãs (uma delas permutada) ficam presas pelos seus centrômeros.

Em *Sordaria fimicola* esse cálculo da distância relativa entre um determinado gene e o centrômero é feito dividindo-se por dois a porcentagem de ascos recombinantes. Isto porque a porcentagem de ascos recombinantes corresponde à frequência de ascos onde houve per-

mutação entre o gene analisado e o centrômero, enquanto que a frequência de recombinação corresponde à metade da frequência de quiasmas, uma vez que, dos 4 produtos de cada meiose, apenas dois são recombinantes.

Assim sendo, a distância em centimorgans (cM) entre um gene e o centrômero é dada por:

$$\frac{\text{Número de ascospores recombinantes}}{\text{Número total de ascospores analisados}} \times 100 = \text{cM}$$

onde,
um centimorgan (cM) = 1% de recombinantes

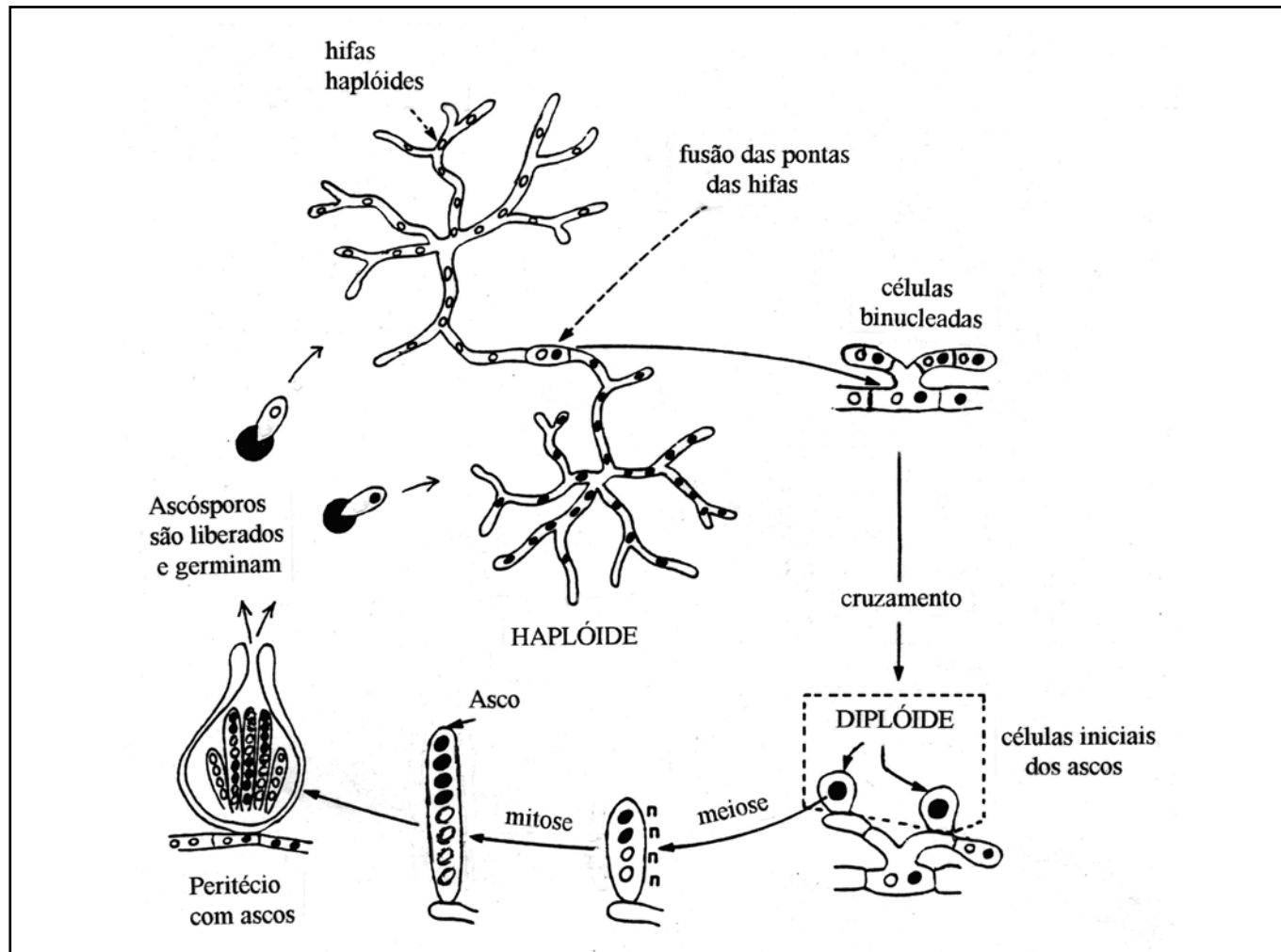


Figura 1. Diagrama simplificado do ciclo de vida do fungo *Sordaria fimicola* (modificado de Jones & Rickards, 1992).

Objetivos

1. Determinar o número de ascospores recombinantes, ou seja, aqueles nos quais ocorreu uma permutação entre um gene (no caso, o que determina a cor do esporo) e o centrômero, por meio da análise de uma amostra de ascospores ordenados em *Sordaria fimicola*;
2. calcular a distância relativa entre os dois marcadores (o gene e o centrômero);
3. relembrar e ordenar os eventos que ocorrem na meiose;
4. comparar o método de mapeamento em fungos com o utilizado para o mapeamento cromossômico em outros organismos, por exemplo *Drosophila melanogaster*.

Função pedagógica

Essa atividade prática permite que o aluno, ao analisar a ordenação dos ascospores dentro dos ascospores, interprete o movimento pelo qual passam as cromátides durante o processo de meiose que foi sucedido por uma divisão mitótica. Além de reforçar a metodologia de mapeamento cromossômico, ela permite uma revisão das etapas da meiose.

Preparando a atividade

Essa aula prática é ideal para ser desenvolvida por grupos de 4 alunos. Cada aluno receberá três fotos distintas, por exemplo, um determinado aluno receberá as fotos 3A, 3C e 3E, outro aluno receberá as fotos 3B, 3D, 3F, e assim por diante.

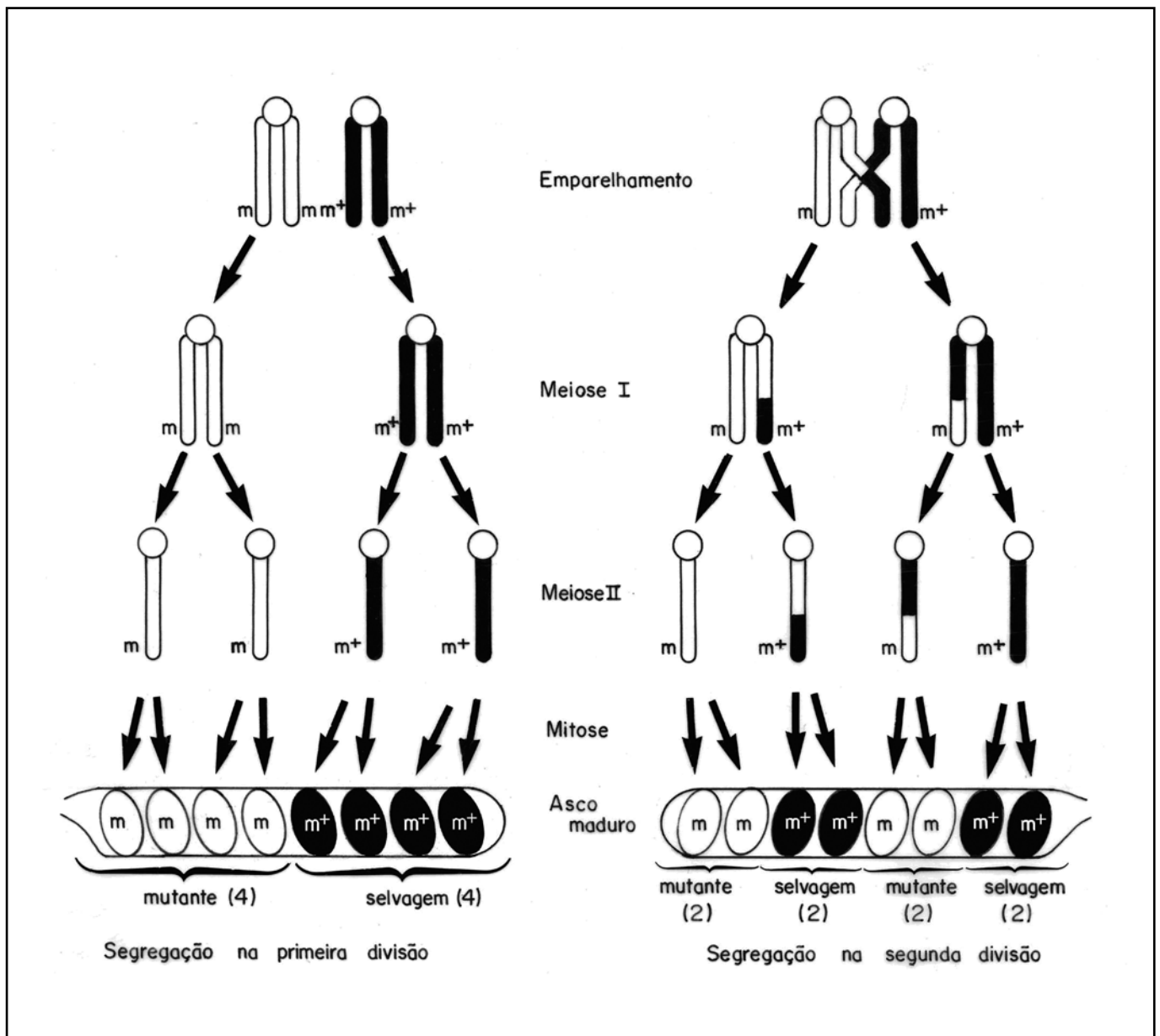


Figura 2. Em *Sordaria fimicola* a produção de um asco contendo 8 ascósporos haplóides (n) a partir de uma célula diplóide ($2n$) envolve uma divisão meiótica seguida de uma divisão mitótica. A posição relativa dos ascósporos claros e escuros reflete a ordem das cromátides no núcleo de uma célula em meiose, permitindo a dedução da ocorrência de permutação entre duas das quatro cromátides (meiose representada à direita), além disso, permite também a identificação daquelas que efetivamente participaram da permutação (modificado de Stansfield, 1985).

Materiais

- cópias das fotomicrografias (Figuras 3 e 4) em número suficiente para todos os alunos;
- uma cópia, por grupo, da tabela para anotação dos resultados (Tabela 1);
- uma cópia, por grupo, do texto com a Introdução e o Procedimento.

Procedimento

- 1) Analise as fotomicrografias recebidas, observe ascos contendo ascósporos no seu interior, ascósporos estes

que se originaram do cruzamento entre uma linhagem selvagem (ascósporos escuros) e uma mutante (ascósporos claros) de *Sordaria fimicola*. Observe que o arranjo linear de ascósporos claros e escuros difere entre os vários ascos. Analise somente os ascos íntegros, ou seja, com oito ascósporos. Determine a distribuição de ascósporos claros e escuros em pelo menos 20 ascos.

Nos ascos, o arranjo do tipo quatro ascósporos escuros e quatro claros ($4m^+ : 4m$) se forma quando não ocorreu permuta entre o gene marcador e o centrômero. Quando ocorreu permuta entre o gene marcador

e o centrômero, o arranjo dos ascósporos escuros e claros dentro do asco será do tipo 2:2:2:2 que, por sua vez, pode se distribuir em diferentes ordenações:

- a) 2 escuros : 2 claros : 2 escuros : 2 claros;
- b) 2 claros : 2 escuros : 2 claros : 2 escuros;
- c) 2 escuros : 4 claros : 2 escuros;
- d) 2 claros : 4 escuros : 2 claros.

2) Na tabela abaixo, anote os dados obtidos e faça o somatório da análise do seu grupo.

3) Calcule a distância (em centimorgans = cM) entre o gene e o centrômero. Este cálculo deverá ser feito com o somatório dos dados dos quatro alunos do grupo.

Lembre-se:

- a) para cada par de cromossomos homólogos duplicados e emparelhados somente duas das quatro cro-

mátides sofrem permutação e, portanto, somente metade dos ascósporos resultante é recombinante, pois a outra metade é classificada como sendo do tipo parental (não recombinante);

- b) a unidade de distância relativa, denominada centimorgan (cM), corresponde a 1% de recombinantes (por convenção).

4) Existe dominância entre o alelo selvagem e o mutante? Justifique a sua resposta. Em caso de resposta afirmativa, qual é o alelo dominante?

5) Como pode ser explicada a formação de ascos contendo 8 ascósporos escuros, ou 8 ascósporos claros (Fig. 6)?

6) Discutir eventuais diferenças nas distâncias obtidas pelos vários grupos de alunos.

Tabela 1. Resultados das análises dos ascos.

TIPOS DE ASCOS	NÚMERO (n)	
	SEUS DADOS	SOMATÓRIO DO GRUPO
4m+ : 4m		
4m : 4m+		
2m+ : 2m: 2m+: 2m		
2m : 2m+ : 2m : 2m+		
2m+ : 4m : 2m+		
2m : 4m+ : 2m		
Total		

Bibliografia e leitura adicional recomendada

Azevedo, J. L. Análise de ascos ordenados em *Sordaria fimicola*. In: Azevedo, J. L. & Costa, S. O. P. (org.) *Exercícios práticos de Genética*. São Paulo, Editora Universidade de São Paulo, 1973.

Fincham, J. R. S. *Genetic Analysis: Principles, Scope and Objectives*. Oxford, Blackwell Science, 1994.

Griffiths, A. H., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. & Gelbart, W. M. *An Introduction to Genetic Analysis*, 7a ed. New York, W. H. Freeman, 2000.

Jones, R. N. & Rickards, G. K. *Practical Genetics*. Chichester, John Wiley, 1992.

Mertens, T. R. & Hammersmith, R. L. *Genetics Laboratory Investigations*, New Jersey, Prentice Hall, 1995.

Stansfield, W. D. *Genética*, 2ª ed. São Paulo, McGraw-Hill, 1985.

Sturtevant, A. H. *A History of Genetics*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

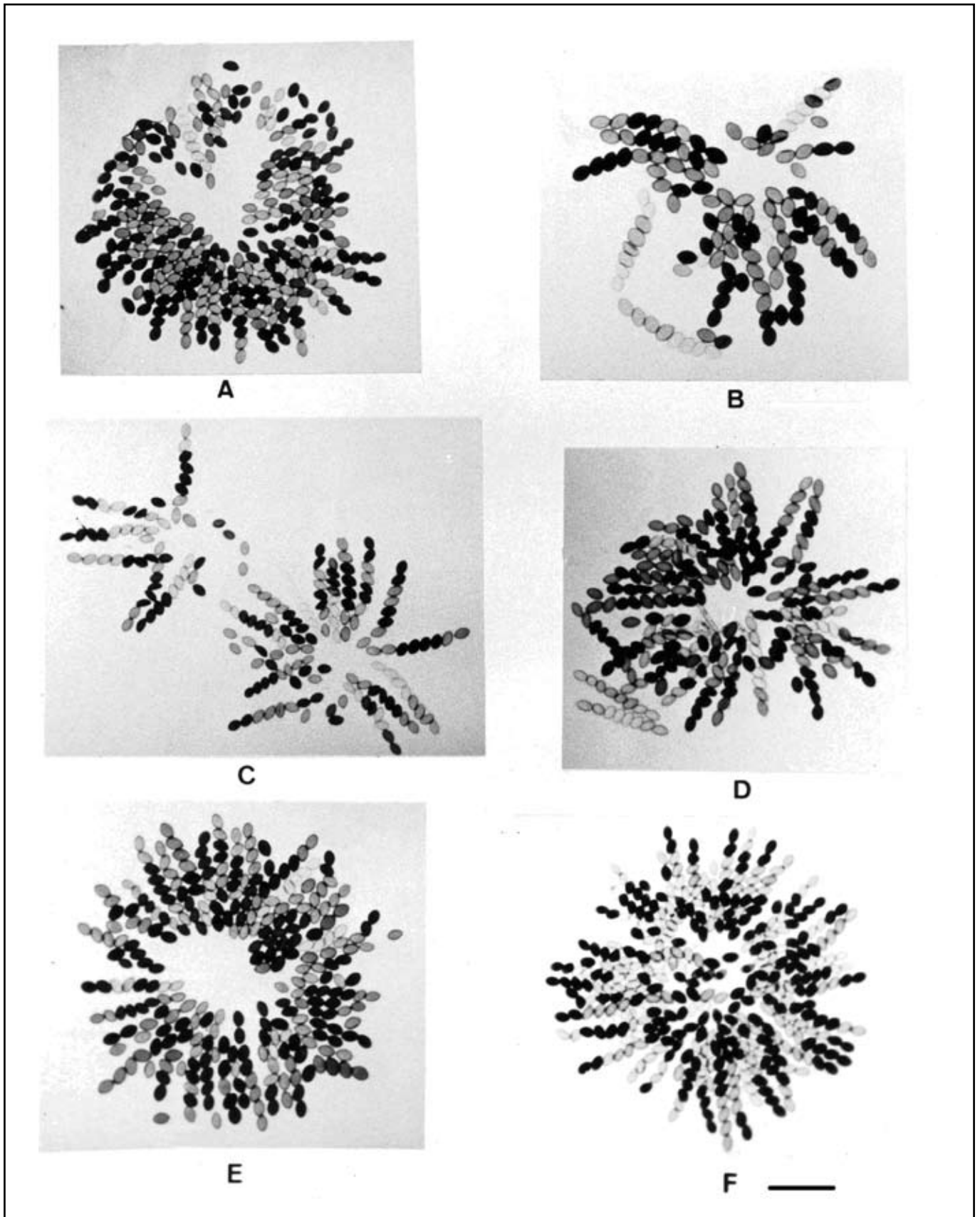


Figura 3. Fotomicrografias de rosetas de ascos híbridos resultantes do cruzamento de uma linhagem selvagem (ascósporos escuros) com uma linhagem mutante (ascósporos claros) de *Sordaria fimicola*. Escala = 100 μm . L. Mori phot.

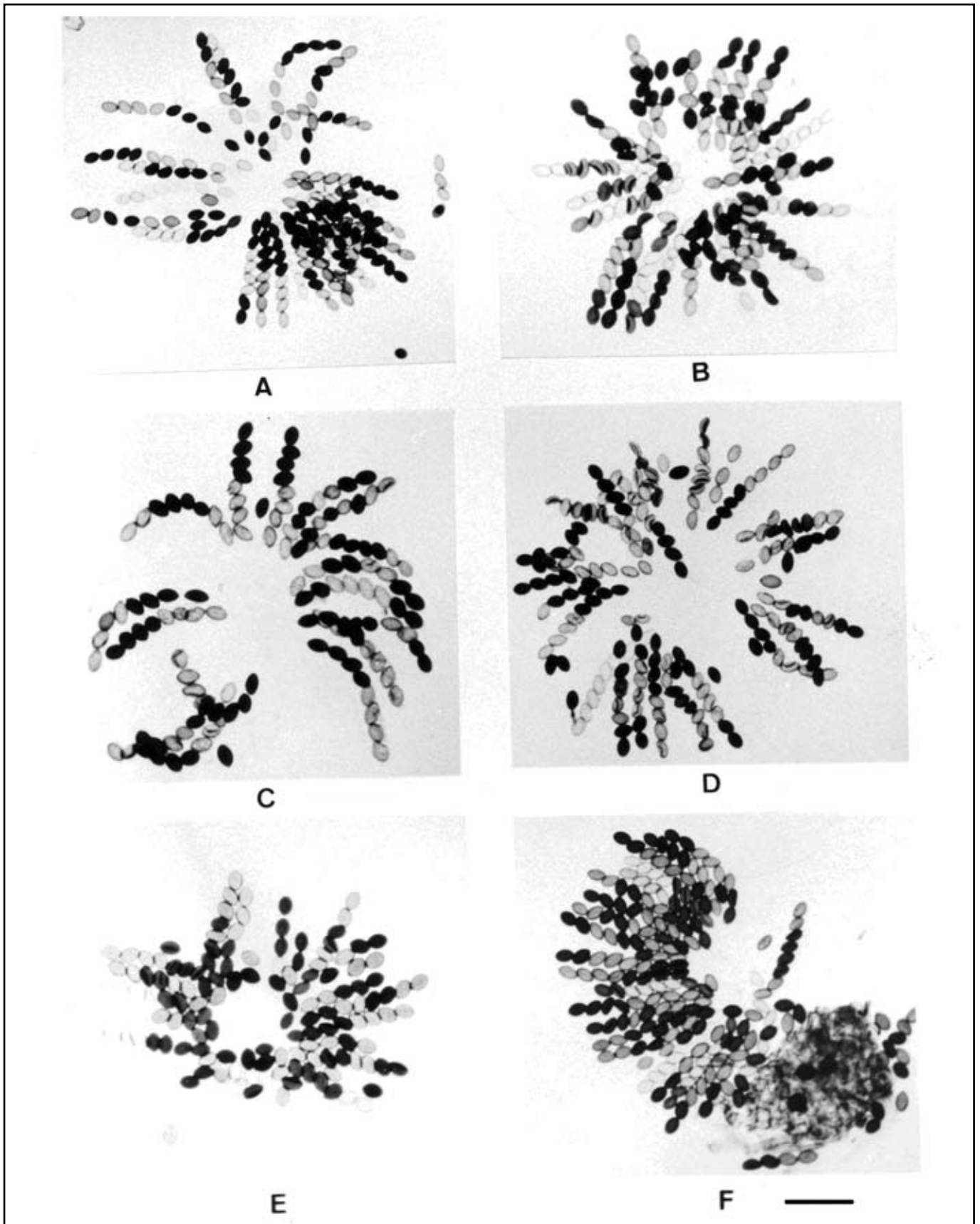


Figura 4. Fotomicrografias de rosetas de ascos híbridos resultantes do cruzamento de uma linhagem selvagem (ascósporos escuros) com uma linhagem mutante (ascósporos claros) de *Sordaria fimicola*. Escala = 100 μ m. L. Mori phot.

Atividades complementares e sugestões para o professor

- A. Caso a escola disponha de laboratório, estereomicroscópios e microscópios de transmissão, o professor pode optar por fazer o experimento de cruzamento entre as linhagens selvagem e mutante de *Sordaria fimicola* para obter peritécios contendo ascos híbridos e preparar as lâminas.

Material

- Lâminas, lamínulas, estereomicroscópio, microscópio de transmissão, água, estilete ou alfinete, três placas de Petri.
- Linhagens de *Sordaria fimicola* selvagem (**m+**) e mutante (**m**). A linhagem mutante mais adequada para esse experimento é a “**tan**”. Estas linhagens podem ser adquiridas da empresa “*Carolina World Class Support for Science & Math*” na seguinte página eletrônica <http://carolina.com/product/living+organisms/fung/sordaria+genetics+class+biokit%26reg>.
- Meios de Cultura (modificado de Azevedo, 1973):

1) Meio para crescimento

Ágar-ágar	8,0 g
Dextrose (ou glucose)	1,0 g
Extrato de levedura	0,5 g
Infusão de fubá*	500 ml

2) Meio para cruzamento

Ágar-ágar	8,0 g
Dextrose (ou glucose)	3,5 g
Extrato de levedura	0,5 g
Fosfato de potássio	0,05 g
Sacarose	5,0 g
Infusão de fubá*	500 ml

*15 g de fubá em 500 ml de água. Agitar bem e filtrar em filtro de papel para café; usar o líquido filtrado para preparar o meio de cultura. Os meios de cultura devem ser esterilizados em autoclave a 1,0 atmosfera, 120 °C, durante 20 min e despejados em placas de Petri.

Método (modificado de Azevedo, 1973)

1. Com o auxílio de uma espátula retirar da linhagem selvagem **m+** (que é mantida em tubo de ensaio ou tubo de plástico para centrifuga [Falcon®]) alguns peritécios contendo ascos e colocar em uma placa de Petri contendo meio de cultura para crescimento. Em outra placa contendo meio de crescimento, fazer o mesmo procedimento com a linhagem mutante **m**. Incubar a 37 °C por seis dias, ou à temperatura ambiente por cerca de dez dias. Caso o crescimento seja feito à temperatura ambiente, será necessário monitorar o crescimento do fungo sob estereomicroscópio (Figura 5).
2. Retirar um pequeno pedaço (cerca de 0,5 cm²) de ágar com o fungo da linhagem selvagem **m+**, que está em crescimento, e colocar sobre o meio de cultura de cruzamento em nova placa de Petri. Repetir o processo com a linhagem mutante **m**, colocando o pedaço de ágar na mesma placa onde foi colocada a linhagem selvagem **m+**, de tal forma que os dois pedaços fiquem distanciados de 2-3 cm. Incubar a placa a 37°C por cerca de seis dias, ou à temperatura ambiente por cerca de 10 dias (Figura 5).

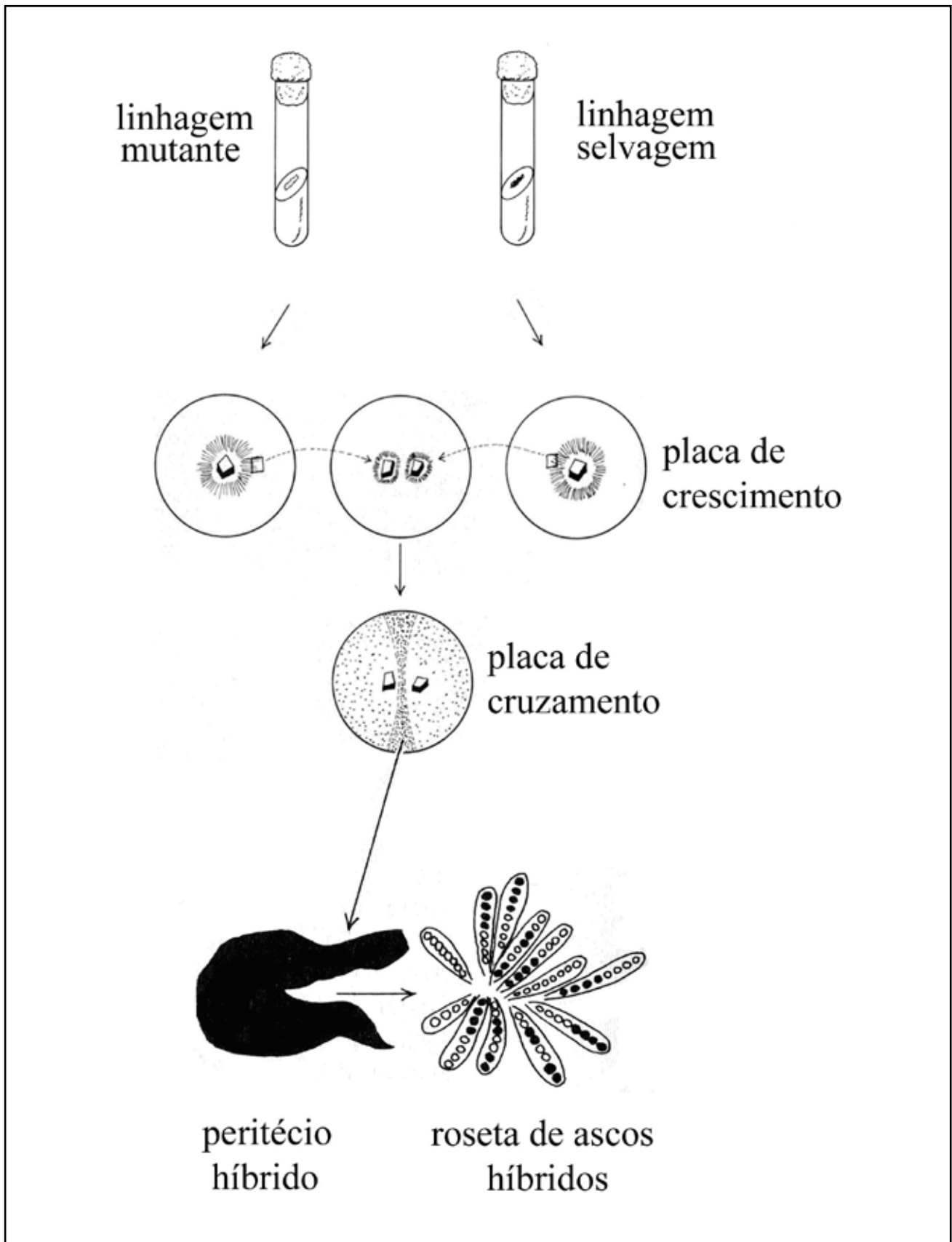


Figura 5. Cruzamento de linhagem mutante (m) e selvagem (m^+) de *Sordaria fimicola*. Pedacos de ágar das duas linhagens parentais são retiradas dos tubos de ensaio e colocados para crescer em placas de Petri distintas durante 4-5 dias a 25 °C. Em seguida, pedacos de ágar das duas placas de crescimento contendo hifas são transferidos para uma placa de Petri contendo meio de cultura de cruzamento, onde o crescimento contínuo das hifas permite o encontro e o cruzamento das duas linhagens na linha mediana (modificado de Jones & Rickards, 1992), de onde são retirados os peritécios híbridos contendo as rosetas de ascos.

3. Observar a placa de cruzamento sob estereomicroscópio. Os peritécios, que têm apenas cerca de 1 mm de diâmetro, são corpos de frutificação escuros em formato de pêra. Na região de contacto do crescimento entre as linhagens **m+** e **m**, retirar dois a três peritécios com o auxílio de um estilete e colocá-los sobre uma lâmina contendo uma gota de água. Colocar a lamínula sobre a gota, pressionando-a levemente para romper os peritécios e libertar os ascos, que então se posicionarão em forma de rosetas.

4. Observar os peritécios rompidos com a objetiva de 10x do microscópio de transmissão. Aqueles cujos ascos contêm apenas ascósporos escuros (**m+**) ou apenas ascósporos claros (**m**) (Figura 6) não são híbridos, mas sim produtos de autofecundação, isto é, resultado de cruzamento entre **m+** e **m+**, ou entre **m** e **m**, respectivamente. Nesse caso, desprezar a lâmina e repetir o item 3.

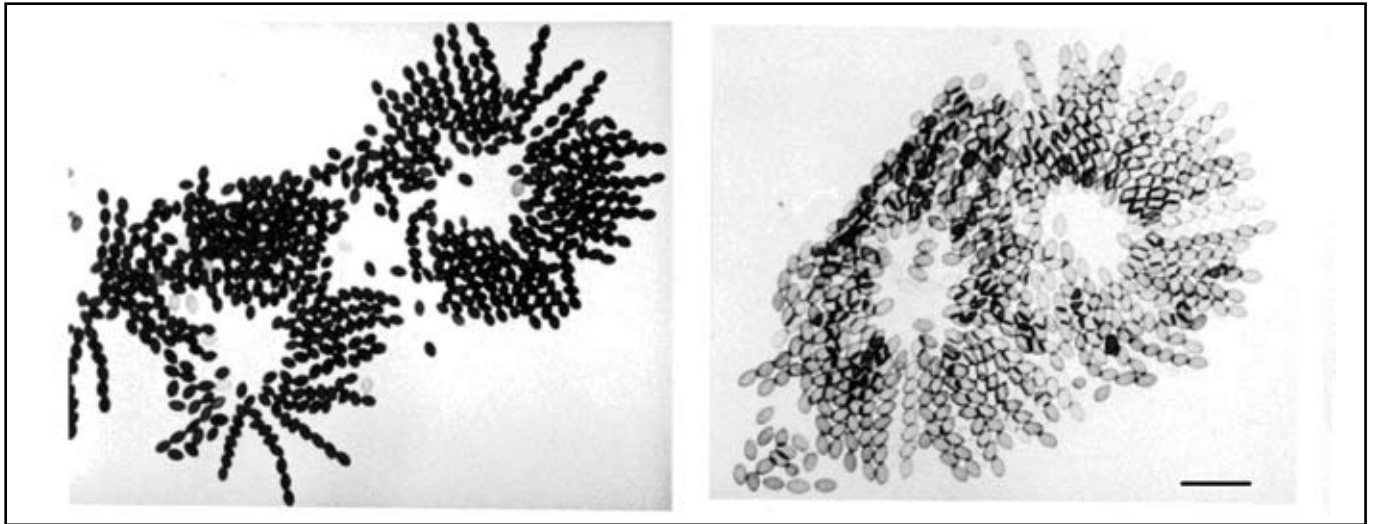


Figura 6. Ascos obtidos a partir da ruptura de peritécios resultantes de autofecundação de linhagens selvagem (esquerda) ou linhagem mutante de *Sordaria fimicola* (direita). L. Mori phot. Escala = 100 μ m.

5. Após a localização de peritécios híbridos, determinados pela análise de seus ascos, prosseguir como foi proposto para a análise das fotomicrografias.

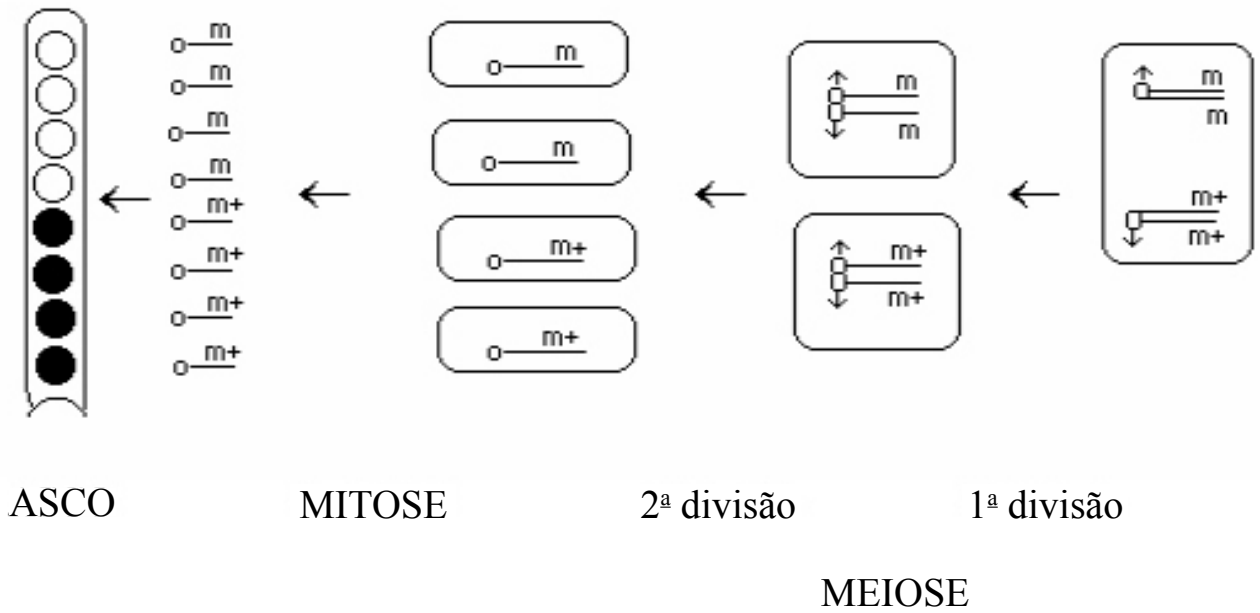
Recomenda-se adicionalmente a realização de alguns exercícios, que consistem na observação dos arranjos de ascósporos em ascos de peritécios híbridos e no levantamento de hipóteses sobre os eventos ocorridos na meiose que teriam dado origem aos respectivos arranjos. Esses exercícios podem ser feitos nas figuras que se seguem, ou ainda substituindo as figuras de meiose por simulações, usando massa de modelar para representar com cores diferentes os cromossomos das linhagens selvagem e mutante na 1^a e 2^a divisões da meiose e na mitose que se sucede, de maneira semelhante às figuras representadas nos exercícios.

B. EXERCÍCIOS

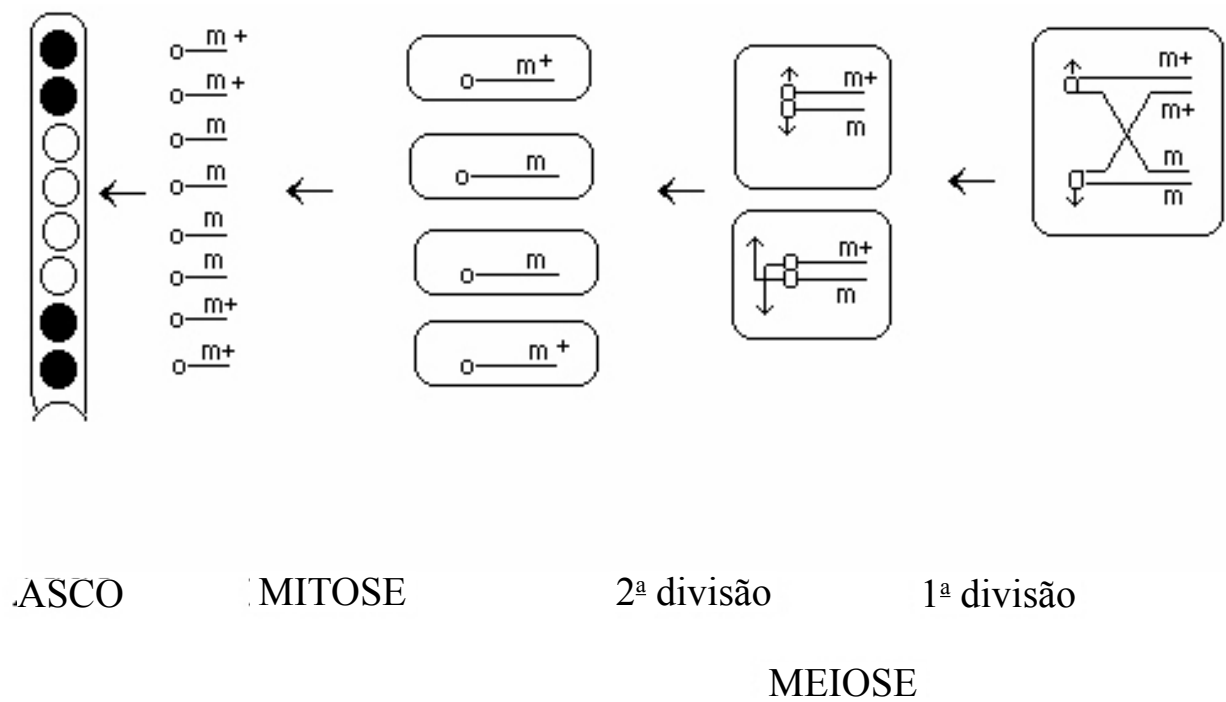
Uma linhagem selvagem de *Sordaria fimicola* que produz ascósporos escuros foi cruzada com uma mutante que produz ascósporos claros.

Interpretar a meiose que resultou na distribuição linear dos ascósporos representados nas páginas seguintes. Resolver os exercícios, da esquerda (asco) para a direita (cromossomos emparelhados), colocando os símbolos dos alelos (**m+** ou **m**) nos cromossomos esquematizados, de modo semelhante aos dois exemplos que se seguem. Representar os quiasmas, sempre que necessário.

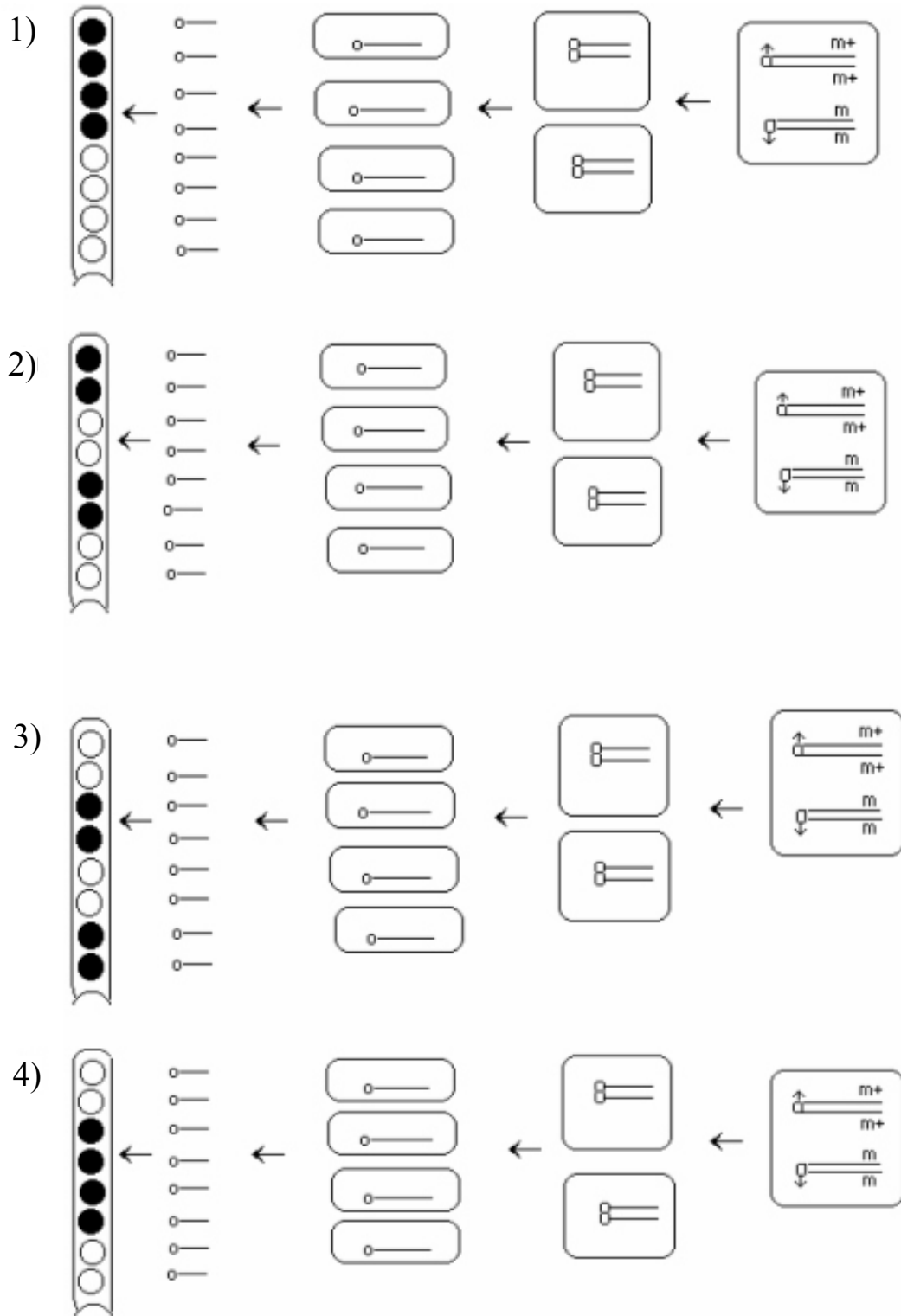
Exemplo 1



Exemplo 2



Exercícios



ASCO

MITOSE

2ª divisão

1ª divisão

MEIOSE