

JUAN AYÁLA OSUNA

CONTRIBUIÇÃO AO
ESTUDO DE MUTANTES DEFICIENTES
NUTRICIONAIS EM *Aspergillus Nidulans* (EIDAM) WINTER.

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para ob-
tenção do Título de Magister
Scientiae.

AGOSTO DE 1967

PIRACICABA - ESTADO DE SÃO PAULO

BRASIL

À memória de minha mãe

Homenagem

Ao meu bondoso pai

Dedico

- Í N D I C E -

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Os ciclos sexual e parasexual em <u>A. nidulans</u> ...	2
2.1.1. O ciclo sexual	2
2.1.2. O ciclo parasexual	2
2.2. Mutantes nutricionais e sensíveis à temperatura.	4
2.2.1. Mutantes nutricionais	4
2.2.2. Mutantes sensíveis à temperatura	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Símbolos e fenótipos dos mutantes usados no presente trabalho	7
3.2. Linhagens usadas	7
3.3. Meios de cultura e soluções usadas	8
3.3.1. Meio mínimo líquido	8
3.3.2. Meio mínimo sólido	9
3.3.3. Meio completo líquido	9
3.3.4. Meio completo sólido	9
3.3.5. Meio mínimo mais 2% de meio completo ...	9
3.3.6. Meio mínimo-galactose	9
3.3.7. Meio de acetato de amônio	9
3.3.8. Solução de aminoácidos-componentes do ácido nucléico	10
3.3.9. Solução de vitaminas	11
3.3.10. Ácido nucléico de leveduras hidrolizada.	11
3.3.11. Suplementos adicionados ao meio mínimo .	11
3.3.12. Meios completos enriquecidos.....	12
3.3.13. Solução salina 0,15 M	12
3.3.14. Solução de Tween	12
3.4. Técnicas gerais de semeadura e incubação	13
3.4.1. Irradiação da linhagem <u>bi3</u> e obtenção dos mutantes	13
3.4.2. Isolamento dos mutantes	13

3.4.3.	Técnicas de caracterização dos mutantes	15
3.4.4.	Técnicas de detecção de mutantes sensíveis à temperatura	15
3.4.5.	Técnicas de mapeamento	15
3.4.6.	Obtenção e isolamento de diplóides heterozigotos	16
3.4.7.	Purificação dos diplóides	16
3.4.8.	Técnica de segregação somática induzida com P-fluorofenilalanina	16
4.	RESULTADOS OBTIDOS	18
4.1.	Irradiação da linhagem <u>bi3</u>	18
4.2.	Isolamento de mutantes auxotróficos	20
4.3.	Caracterização dos mutantes obtidos	20
4.4.	Isolamento e caracterização dos mutantes sensíveis à temperatura	23
4.5.	Localização de alguns mutantes deficientes nutricionais isolados	24
5.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	26
5.1.	Curva de sobrevivência da linhagem <u>bi3</u>	26
5.2.	Frequência dos mutantes isolados	26
5.3.	Caracterização dos mutantes obtidos	26
5.4.	Mutantes sensíveis à temperatura	30
5.5.	Considerações e aplicações do presente trabalho..	30
6.	RESUMO E CONCLUSÕES	33
7.	SUMMARY	35
8.	BIBLIOGRAFIA CITADA	36
	AGRADECIMENTOS	39

1 - INTRODUÇÃO

Mutantes deficientes nutricionais de Aspergillus nidulans (Eidam) Winter, são de fundamental importância para estudos genéticos nesse fungo, tendo sido isolados de diversas maneiras, por diversos autores. Para revisão, veja PONTECORVO e col., (1953), PONTECORVO (1963) e BARRATT e col., (1965). Além disso, esse organismo é material promissor para tais tipos de pesquisa por várias razões, principalmente o fato de apresentar um ciclo sexual ligado a um outro ciclo, o parasexual (PONTECORVO e ROPER, 1952) onde diplóides relativamente estáveis podem ser obtidos. A posterior haploidização desses diplóides faz com que o mapeamento dos gens através de análise mitótica fique facilitado no fungo filamentoso A. nidulans.

O presente trabalho teve como finalidade, oferecer uma contribuição ao estudo de mutantes deficientes nutricionais, também chamados auxotróficos, isto é, mutantes que podem crescer em um meio de composição complexa, denominado de meio completo, mas que não podem crescer em um meio de composição definida chamado de meio mínimo, a não ser que um requerimento específico seja adicionado a esse meio. Como os estudos feitos até o presente momento foram realizados principalmente utilizando-se o meio completo, descrito por PONTECORVO e col., (1953) pensamos utilizar meios completos mais enriquecidos, onde talvez, a frequência e tipos de mutantes auxotróficos obtidos fôssem diferentes dos descritos até agora na literatura. Além disso, procuramos caracterizar os mutantes obtidos com relação as suas deficiências nutricionais e mapear alguns deles mitoticamente.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

Dividiremos a revisão da literatura em duas partes principais. Na primeira resumiremos os ciclos sexual e parasexual de A. nidulans, caracterizando principalmente, este último por constituir parte fundamental, no presente trabalho. Na segunda faremos a revisão bibliográfica dos trabalhos publicados com relação a mutantes nutricionais e mutantes sensíveis à temperatura, principalmente no fungo filamentoso A. nidulans.

2.1. Os ciclos sexual e parasexual em A. nidulans

2.1.1. O ciclo sexual

O A. nidulans, apresenta um micélio constituído por células multinucleadas. A partir dessas células emergem conidióforos que terminam por uma vesícula globosa também multinucleada; da superfície dessa vesícula saem os esterígnas primários e secundários que por sua vez dão origem a conídios uninucleados em cadeias. Sendo uma espécie homotálica, os cruzamentos podem ser feitos com ajuda de marcadores genéticos apropriados.

O A. nidulans, tem ascos localizados no interior de corpos de frutificação e êsses corpos de frutificação são denominados cleistotécios pelos micologistas ou peritécios pelos geneticistas. Há formação dos corpos de frutificação com cariogamia, formando-se o zigoto que sofre divisão meiótica, produzindo quatro células haplóides, que por sua vez sofrem uma divisão mitótica, resultando desta maneira, em cada asco, oito células chamadas ascosporos. O corpo de frutificação quando maduro tem formato redondo, apresenta coloração escura e contém no seu interior cerca de 10.000 a 1.000.000 de ascos.

2.1.2. O ciclo parasexual

Até, 1952 o ciclo sexual era o único processo conhecido capaz de produzir recombinação em fungos.

Em bactérias já eram conhecidos dois processos de re-

combinação sem fusão sexual: a transformação (GRIFFITH, 1928) e a transdução (ZINDER e LEDERBERG, 1952). A esses processos conhecidos como alternativas do sexo, adicionou-se mais um, descoberto no fungo A. nidulans que foi denominado de ciclo parasexual (PONTECORVO e ROPER, 1952).

Mais tarde, o ciclo parasexual foi evidenciado em outros fungos como: A. niger, (PONTECORVO, ROPER e FORBES, 1953), A. rugulosus (BOAM, 1963), etc. O ciclo parasexual inicia-se com a formação de heterocácion ocorrendo em seguida, a fusão de núcleos geneticamente diferentes dentro das hifas; da fusão desses núcleos haplóides originam-se núcleos diplóides que, por sua vez darão conídios diplóides.

Os conídios são normalmente verdes, uninucleados e haplóides ($n = 8$ cromossomas) e são capazes de germinar em um meio denominado de mínimo contendo apenas sais minerais e um açúcar como fonte de carbono. As linhagens escolhidas para formar o heterocácion devem diferir entre si, e também da linhagem selvagem, em um ou mais requerimentos nutricionais, sendo os gens que determinam esses requerimentos em geral recessivos e de preferência, devem diferir também quanto a coloração dos conídios. A mistura dos conídios dessas duas linhagens leva a heterocarióse, onde a fusão das hifas produz um heterocácion que é capaz de crescer em um meio mínimo, enquanto que as duas linhagens, separadamente, não apresentam essa capacidade.

Desta maneira, os diplóides serão selecionados e apenas cerca de um em cada 10^7 conídios de um heterocácion são diplóides (ROPER, 1952). Esses diplóides isolados são relativamente estáveis, mas podem dar novos tipos de recombinantes graças a raros eventos que ocorrem durante a mitose. São três os processos até agora estudados que podem dar recombinantes a partir de diplóides:

a) Permuta mitótica

Esporadicamente, ocorrem permutas em diplóides no estágio de quatro fios (ROPER e PRITCHARD, 1955). Se houver permuta quando o centrómero se divide e os cromatídeos de cada homólogo vão a polos opostos, podem resultar núcleos que são homozigoto

tos para certas marcas que se encontravam no estado heterozigoto no diplóide original, os núcleos se tornam homozigotos para todos os alelos ligados em associação e distais do ponto de troca. No outro braço do cromossoma ou em outros cromossomas permanecem heterozigotos como no diplóide original. Dessa maneira, a permuta mitótica pode ser usada para determinar a ordem dos gens, num braço de um cromossoma não só com relação a outras marcas, como também, com relação ao centrómero.

É no entanto, necessário que exista no braço do cromossoma a ser analisado, um fator que condicione um caráter visível aos setores formados numa colônia diplóide, para que os setores sejam detectados.

b) Não disjunção mitótica

Raramente, não disjunções para um ou mais cromossomas homólogos, mais ainda heterozigotos para outros cromossomas pode ocorrer, dando recombinantes (PONTECORVO e KAFER, 1958).

c) Haploidização

Haplóides podem originar-se a partir de diplóides através de aneuploidia. A frequência de haploidização varia bastante, tanto quanto a frequência de permutas mitóticas (KAFER, 1961), e se dá pela perda de cromossomas até que o estado haplóide estável seja atingido.

2.2. Mutantes nutricionais e sensíveis à temperatura

2.2.1. Mutantes nutricionais

PONTECORVO, ROPER, HEMMONS, MACDONALD e BUFTON (1953) foram os primeiros autores que fizeram uma revisão sobre o problema da obtenção de mutantes nutricionais ou auxotróficos em A. nidulans, e também isolaram tais mutantes utilizando como agente mutagênico raios X e luz ultra-violeta.

Obtiveram 600 mutantes dos quais só uma mínima fração de 27 foram analisados geneticamente. Esses mutantes foram obtidos por uma adaptação da técnica de LEDERBEG (1952), técnica de enriquecimento retardado e pela técnica de isolamento total, modi

ficando em parte a adaptação original de BEADLE e TATUM (1941) Muitas das linhagens mutantes obtidas diferiam do tipo selvagem em um ou vários caracteres como: cor dos conídios, hábito de crescimento, secreção de um pigmento ou deficiência em uma enzima.

KAFER (1958) utilizando linhagens mutantes obtidas no departamento de genética da Universidade de Glasgow, Escócia, através de cruzamentos múltiplos entre elas, conseguiu localizar novos marcadores, mapeando-os através de recombinação mitótica e assim estabeleceu os grupos de ligação no A. nidulans.

AZEVEDO, NEDER e COSTA (1963) utilizando duas linhagens auxotróficas de A. nidulans, fornecidas pelo Professor J. A. Roper, da Universidade de Sheffield, Inglaterra, determinaram curvas de sobrevivência dessas linhagens à luz ultra-violeta. Da linhagem denominada J.A.R. 21 obtiveram-se seis mutantes sendo dois deficientes para cisteína, um para guanina, dois deficientes para ácido p-aminobenzóico, é um mutante morfológico com conídios brancos.

PONTECORVO (1963), apresenta uma lista de mutantes no A. nidulans, contendo todos os mutantes nutricionais obtidos até essa época.

BARRAT, JOHNSON e OGATA (1965), reuniram mais de 170 linhagens selvagens e mutantes de A. nidulans descrevendo-as e mantendo-as em estoque e que são aproveitadas para o ensino e pesquisa genética.

2.2.2. Mutantes sensíveis à temperatura

Mutantes sensíveis à temperatura são aqueles que podem apresentar crescimento em uma determinada temperatura mas, deixam de crescer em outra temperatura, podendo nesse caso serem os efeitos da mutação, reparáveis por uma substância específica adicionada ao meio mínimo, ou então, não reparáveis, inclusive por meio completo. Revisão de literatura sobre mutantes sensíveis à temperatura em microrganismos pode ser encontrada em AZEVEDO (1966). Faremos aqui, apenas, revisão dos mutantes temperatura sensíveis, em A. nidulans.

NEDER (1965), utilizando a linhagem bi 1 meth 1 irra -

diada com luz ultra-violeta a 1% de sobrevivência, mostrou que mutantes temperatura sensíveis induzidos em A. nidulans, aparecem em frequência comparável a dos mutantes auxotróficos, ou seja, apenas 0,6% das linhagens analisadas cresceram a 25°C, mas não a 37°C.

ROPER (1966), partindo das observações de STRIGINE e MOPURGO (1961) de que linhagens de A. nidulans mesmo que não contenham o mutante bi tem requerimento em biotina, e assinalando que esse requerimento, geralmente pode ser ignorado pelo fato de que materiais do laboratório presumivelmente apresentam biotina como contaminante, relata que a 42°C essas linhagens não apresentam nenhum crescimento e que esse fato tem sido notado, particularmente, para diplóides.

FORBES e SINHA (1966), irradiando com luz ultra-violeta isolaram uma quantidade considerável de mutantes sensíveis à temperatura em A. nidulans, que pesquisados em meio completo a 37°C não cresceram, enquanto que a 25°C mostraram crescimento vigoroso e com maior chance de viabilidade. Dez desses mutantes foram transferidos a grupos de linhagens por haplodização previamente cruzados, com o "Master Strain E." (M.S.E.) e posteriormente, localizados nos cromossomas de A. nidulans.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

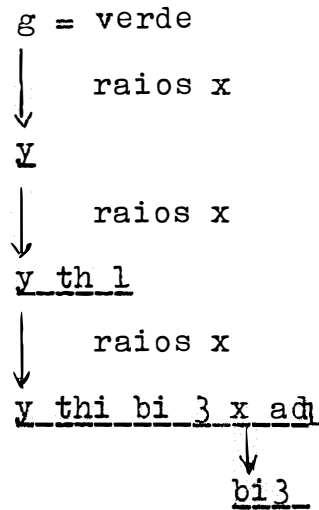
3.1. Símbolo e fenótipos dos mutantes usados no presente trabalho

<u>SÍMBOLO</u>	<u>FENÓTIPO</u>
<u>NUTRICIONAIS</u>	
<u>ad 20</u>	requerimento para adenina
<u>bi 3</u>	requerimento para biotina
<u>ribo 2</u>	requerimento para riboflavi- na
<u>nic 8</u>	requerimento para ácido nico- tínico
<u>piro 4</u>	requerimento para piridoxina
<u>s 3</u>	requerimento para tiosulfato de sódio
<u>MORFOLÓGICOS</u>	
<u>w</u>	conídios brancos
<u>y</u>	conídios amarelos
<u>OUTROS</u>	
<u>su 1 ad 20</u>	supressor de adenina
<u>gal 1</u>	incapaz de crescer em meio com galactose como fonte de carbono
<u>fac 303</u>	incapaz de crescer em meio com acetato como fonte de carbono

3.2. Linhagens usadas

A linhagem A.nidulans utilizada para obtenção dos mutantes foi proporcionada pelo Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em Piracicaba, sendo constituída de conídios verdes e deficientes para a síntese de biotina (bi 3), proveniente dos estoques da Universidade de Sheffield, Inglaterra. O pedigree desse mutante es-

tá descrito no presente esquema:



Linhagem M.S.E. - descrita por FORBES (1963) é uma linhagem com gens marcadores nos oito cromossomas, sendo assim constituída:

<u>CROMOSSOMA Nº</u>	<u>GEN</u>
I	<u>su 1 ad 20, y, ad 20</u>
II	<u>w</u>
III	<u>gal 1</u>
IV	<u>pyro 4</u>
V	<u>fac 303</u>
VI	<u>s 3</u>
VII	<u>nic 8</u>
VIII	<u>ribo 2</u>

3.3. Meios de cultura e soluções usadas

3.3.1. Meio mínimo líquido (PONTECORVO e col., 1953)

Nitrato de sódio	6,0 gramas
Cloreto de potássio	0,52 gramas
Sulfato de magnésio + 7H ₂ O...	0,52 gramas
Fosfato dihidrogenado de potássio	1,52 gramas
Sulfato de ferro	traços
Sulfato de zinco	traços
Glicose	10,00 gramas

Água de torneira completando 1 litro. O pH foi ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico.

3.3.2. Meio mínimo sólido (PONTECORVO e col., 1953)

Foi preparado da mesma forma que o meio mínimo líquido mais adição de gás oxid número 3 (1,5%).

3.3.3. Meio completo líquido (PONTECORVO e col., 1953)

Foi preparado 1 litro de meio mínimo líquido a seguir adicionou-se:

Peptona (oxid)	2	gramas
Extrato de leveduras	0,5	gramas
Caseína hidrolizada	1,5	gramas
Ácido nucléico de leveduras hidrolizado	2,5	ml
Solução de vitaminas	1	ml

Completou-se até 1 litro com água de torneira, o pH foi ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico, e o meio foi finalmente filtrado e autoclavado a uma atmosfera de temperatura 120°C durante 10 minutos e guardados em um lugar fresco e escuro.

3.3.4. Meio completo sólido (PONTECORVO e col., 1953)

Foi preparado da mesma forma que o meio completo líquido, com a adição no final, de agar oxid número 3 (1,5%).

3.3.5. Meio mínimo + 2% de meio completo

Foi preparado adicionando-se a 98 ml de meio mínimo líquido, 2 ml de meio completo líquido.

3.3.6. Meio mínimo-Galactose (ROBERTS, 1959)

Preparado da mesma forma que o meio mínimo, substituindo a glicose por galactose (pH=5,0).

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

Acetato de amônio	12	gramas
Cloreto de sódio	2	gramas

Sulfato de magnésio + 7H ₂ O	1/2 gramas
Fosfato de dihidrogenado de potássio	3 gramas
Sulfato de ferro	traços
Sulfato de Zinco	traços

Água de torneira foi adicionada até completar 1 litro. O pH foi ajustado para 6,1 com hidróxido de amônio. No caso, foi utilizado apenas meio sólido adicionando-se agar oxoid número 3 (1,5%).

O meio foi autoclavado a uma atmosfera por dez minutos e guardado a temperatura ambiente em lugar fresco e escuro.

3.3.8. Solução de aminoácidos-componentes do ácido nucléico

Arginina	50	μ	g/ml
Alanina	50	μ	g/ml
Adenina	50	μ	g/ml
Asparagina	50	μ	g/ml
Ácido Aspártico	50	μ	g/ml
Ácido glutâmico	50	μ	g/ml
Citosina	50	μ	g/ml
Citrulina	50	μ	g/ml
Cisteína	50	μ	g/ml
Fenilalanina	50	μ	g/ml
Guanina	50	μ	g/ml
Hipoxantina	50	μ	g/ml
Histidina	50	μ	g/ml
Leucina	50	μ	g/ml
Lisina	50	μ	g/ml
Metionina	50	μ	g/ml
Ornitina	50	μ	g/ml
Prolina	50	μ	g/ml
Serina	50	μ	g/ml
Timina	50	μ	g/ml
Tirosina	50	μ	g/ml
Triptófano	50	μ	g/ml
Treonina	50	μ	g/ml
Valina	50	μ	g/ml

A solução em água destilada foi esterilizada em vapor fluente e mantida no refrigerador.

3.3.9. Solução de vitaminas

Ácido p-aminobenzóico	10 mg
Piridoxina	50 mg
Aneurina	50 mg
Ácido nicotínico	100 mg
Riboflavina	100 mg
Biotina	0,2 mg
Água destilada	100 ml

A solução foi esterilizada em vapor fluente por 15 minutos repetindo-se a operação durante 3 dias, após os quais a solução foi guardada em frasco escuro, no refrigerador.

3.3.10. Ácido nucléico de leveduras hidrolizado

2 gramas de ácido nucléico de leveduras (Oxoid), foram colocadas em 15 ml de solução normal de ácido clorídrico e 2 gramas do mesmo ácido nucléico de leveduras (Oxoid), foram colocados em 15 ml de solução normal de hidróxido de sódio. Ambas soluções foram aquecidas a 100°C por 20 minutos, misturados o pH ajustado a 6,0 e a solução resultante foi filtrada a quente. O volume foi ajustado para 40 ml e a preparação foi guardada no refrigerador sobre clorofórmio.

3.3.11. Suplementos adicionados ao meio mínimo

<u>Substância</u>	<u>Concentração</u>
Aneurina	0,1 μ g/ml
Biotina	0,02 μ g/ml
Ácido nicotínico	0,05 μ g/ml
Piridoxina	0,05 μ g/ml
Riboflavina	0,05 μ g/ml

Aminoácidos

Metionina	50 μ g/ml
Fenilalanina	50 μ g/ml
Triptófano	50 μ g/ml

Purinas

Adenina 70 u g/ml

Outros

Caseína hidrolizada 1500 u g/ml

Tiosulfato de sódio 200 u g/ml

Ácido nucléico de leveduras 500 u g/ml

Solução de vitaminas 1 ml da solução de
estoque por
litro de meio
(ver itens
3.3.9).

3.3.12. Meios completos enriquecidos

Foram preparados da mesma forma que o meio completo só lido adicionando-se para cada litro de meio:

Sêro de galinha 10 ml

Ovo de galinha 10 ml

Solução de aminoácidos-
componentes dos ácidos

nucléicos 2,5 ml

constituindo desta maneira quatro meios enriquecidos:

Meio completo + 10 ml de ôvo

Meio completo + 10 ml de sêro

Meio completo + 10 ml de ôvo e sêro

Meio completo + 2,5 ml solução de aminoácidos-componen-
tes dos ácidos nucléicos

3.3.13. Solução salina 0,15 M

Foi dissolvido cloreto de sódio em água destilada para dar uma solução 0,89% e em seguida, a solução foi autoclavada.

3.3.14. Solução de Tween

Foi dissolvido Tween 80 em água destilada para dar uma concentração final de 0,1% (v/v) e a solução foi autoclavada e conservada no refrigerador.

3.4. Técnicas Gerais de Semeadura e Incubação

Conídios foram transferidos por meio da alça de platina flambada para uma solução esterilizada de Tween.

As cadeias de conídios foram desagregadas por agitação, com um agitador mecânico e com pipeta Pasteur.

A densidade de conídios foi determinada pelo hemocitômetro. As diluições foram feitas, quando requeridas, pipetando-se volumes necessários e conhecidos das suspensões em 9 ml de salina, em cada placa sempre foi semeada 0,1 ml da suspensão.

Em cada placa de petri utilizou-se um papel filtro esterilizado colocado, na tampa, a fim de absorver o excesso de umidade. Um espalhador de vidro, esterilizado em álcool e flambado, foi usado para espalhar a suspensão sobre a superfície do meio de cultura.

A temperatura de incubação usada foi sempre a de 37°C exceto em alguns casos, onde a temperatura de 25°C foi utilizada.

3.4.1. Irradiação da linhagem bi 3 e obtenção dos mutantes

Foi feita uma suspensão de conídios em Tween determinando-se o número de conídios pelo hemocitômetro. 9 ml de suspensão foram colocados em uma placa de petri irradiando-se com fonte de luz ultra-violeta a 2.537 Å a uma distância de 20 cm da fonte, tomando-se precauções para evitar-se a fotorreactivação. Os tempos utilizados para obtenção da curva de sobrevivência foram de 1, 2, 3, 4 e 5 minutos.

Com agitação moderada no decorrer da irradiação, amostras foram removidas nos tempos requeridos e semeados em 3 placas de petri com meio completo, para cada tempo de irradiação, diluindo-se de tal modo que 50 a 100 conídios viáveis fôssem semeados por placa. 1 ml não irradiado da mesma suspensão foi usado como controle.

3.4.2. Isolamento dos mutantes

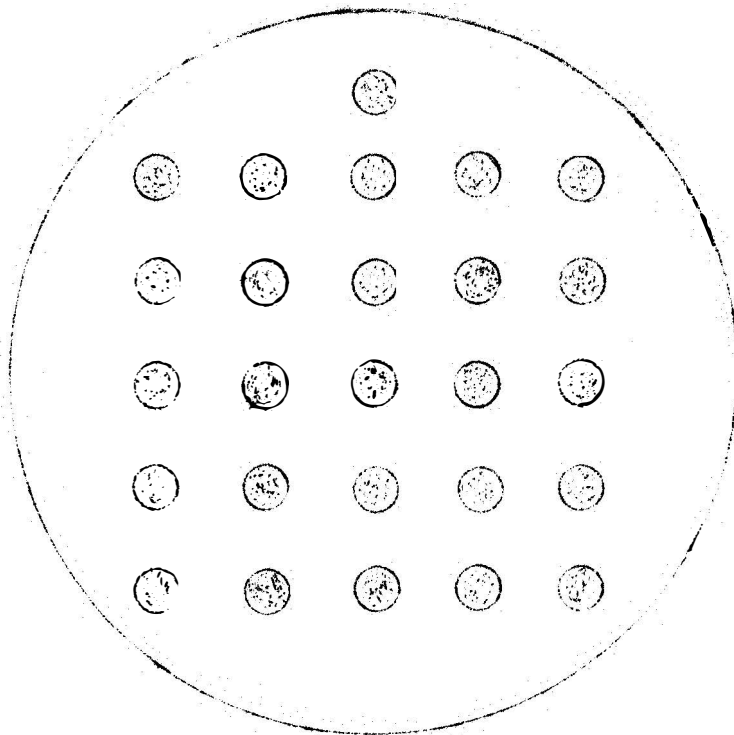
O método de isolamento utilizado no presente trabalho

foi o isolamento total a que se refere PONTECORVO e col., (1953).

Conídios irradiados (5% de sobrevivência) foram semeados em meios completos enriquecidos e após crescimentos das colônias elas foram passadas a placas com 20 ml de meio mínimo mais 0,02 μ g/ml de biotina. Colocaram-se 26 colônias por placa na disposição de 5x5+1 (Figura 1).

FIGURA 1

DISPOSIÇÃO 5x5+1 DAS COLÔNIAS EM PLACAS COM MEIO MÍNIMO MAIS BIOTINA



Após 48 horas de incubação a 37°C foi observada a presença ou ausência de crescimento, e colônias que não se desenvolveram foram passadas em pequenos blocos de ágar para meios completos enriquecidos e testados para comprovar sua deficiência nutricional.

3.4.3. Técnica de caracterização dos mutantes

Uma vez, obtidos os mutantes nutricionais ou auxotrófi-
cos pela técnica de isolamento total, procedeu-se a sua caracte-
rização. A fim, de determinar-se a substância requerida pelo
mutante utilizou-se a técnica de auxonografia de PONTECORVO (1949)
que consiste em semear 20 ml de meio mínimo, 1 ml de suspensão
de conídios em tween 80 com uma densidade de 10^7 conídios por
ml. Incuba-se por 24 horas a 37°C preparando-se duas placas pa-
ra cada mutante. Após, esse tempo, adiciona-se em uma das placas
solução de vitaminas, caseína hidrolizada e solução de aminoáci-
dos-componentes dos ácidos nucleicos. Se o mutante cresce por e-
xemplo ao redor da solução de vitaminas, na outra placa que esta-
va conservada na geladeira ensaia-se o crescimento em vitaminas
separadamente.

3.4.4. Técnicas de detenção de mutantes sensíveis à tempera- ra

No presente trabalho empregou-se uma técnica especial
para o isolamento de mutantes sensíveis à temperatura; consistia
em deixar as placas de petri contendo meio completo enriquecido e
meado com uma suspensão incubadas a 37°C por 48 horas e após, as
colônias germinadas foram marcadas no verso com um lápis dermató-
gráfico. As colônias que cresceram foram isoladas e reensaidas a
 25°C e 37°C .

3.4.5. Técnicas de mapeamento

Heterocariose

Heterocárgions foram conseguidos utilizando-se o método
descrito por PONTECORVO e col., (1953) que consiste em tomar tu-
bos com 2 ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo lí-
quido e colocar conídios das duas linhagens a serem cruzadas em
quantidades aproximadamente iguais, agitando-se e incubando-se por
cêrca de 72 horas a 37°C .

Forma-se uma película na superfície de meio de cultu-
ra; a película foi retirada com alça de platina previamente este-
rilizada, e desagregada em quatro pedaços e colocados em placas de

meio mínimo sólido, de maneira que, cada pedaço fique equidistante um do outro.

3.4.6. Obtenção e isolamento de diplóides heterozigotos

Esta técnica idealizada por ROPER (1952) em A. nidulans consiste na fusão de núcleos haplóides dando origem a núcleos diplóides heterozigotos.

O heterocácion desenvolvido após cerca de 72 horas ou mais de incubação a 37°C forma regiões tipicamente heterocarióticas, que observadas em uma lupa entomológica mostra a aparência de uma mistura de conídios brancos e verdes.

Posteriormente, por meio da alça de platina, previamente flambada conídios foram transferidos a partir de regiões heterocarióticas para solução de tween 80, e com ajuda da pipeta de Pasteur, esta solução foi homogenizada colocando-se cerca de 10^7 conídios por ml. 0,1 ml dessa suspensão de conídios foi colocada em cada placa com meio mínimo, as placas foram incubadas por 72 horas a 37°C. As colônias que mostraram crescimento foram consideradas diplóides heterozigotos, após ter sido feita medição de seus conídios em microscópio em gota de lisol diluído 1:10 (PONTECORVO, TARR GLOOR e FORBES, 1954).

3.4.7. Purificação dos diplóides

Os diplóides obtidos foram purificados em meio mínimo semeando-se uma suspensão de conídios com diluições apropriadas, de modo que, cada placa foi semeada com 20 a 30 conídios diplóides viáveis.

3.4.8. Técnica de segregação somática induzida com P-fluorofenilalanina (pFA)

MOPURGO (1961) descreveu um método para produzir haplodização em linhagens diplóides heterozigotas de A. nidulans, técnica esta baseada no fato de que P-fluorofenilalanina (pFA) inibe o crescimento de linhagens diplóides e permite o normal desenvolvimento de linhagens haplóides.

O método descrito por MOPURGO, consiste no seguinte :

conídios da linhagem diplóide de A. nidulans, em 9 ml de meio mínimo mais 1 ml de P-fluorofenilalanina em uma concentração de 0,04 Mm, são incubados por 12 horas a 37°C e semeados com diversas diluições em meio completo.

O tratamento, com (pFA) produz uma letalidade de cerca de 70% dos conídios. As colônias tratadas em meio completo dão origem a dois tipos de colônias: a) colônias que crescem normalmente; b) colônias geralmente pequenas de coloração esbranquiçada.

Colônias pertencentes ao grupo b) foram isoladas para um novo meio completo incubando-se por picada sete a oito colônias por placa; depois de 48 horas de incubação aparecem setores vigorosos haplóides, a partir dessas colônias.

Os setores isolados foram analisados para os requerimentos nutricionais o que permite a localização dos novos mutantes obtidos com relação aos oito cromossomas do A. nidulans (PONTECORVO e KAFER, 1958).

4 - RESULTADOS OBTIDOS

4.1. Irradiação da linhagem bi 3

Os dados referentes à sobrevivência de conídios da linhagem bi3 de A. nidulans submetidos a ação da luz ultra-violeta estão apresentados na tabela I e figura 2.

TABELA I

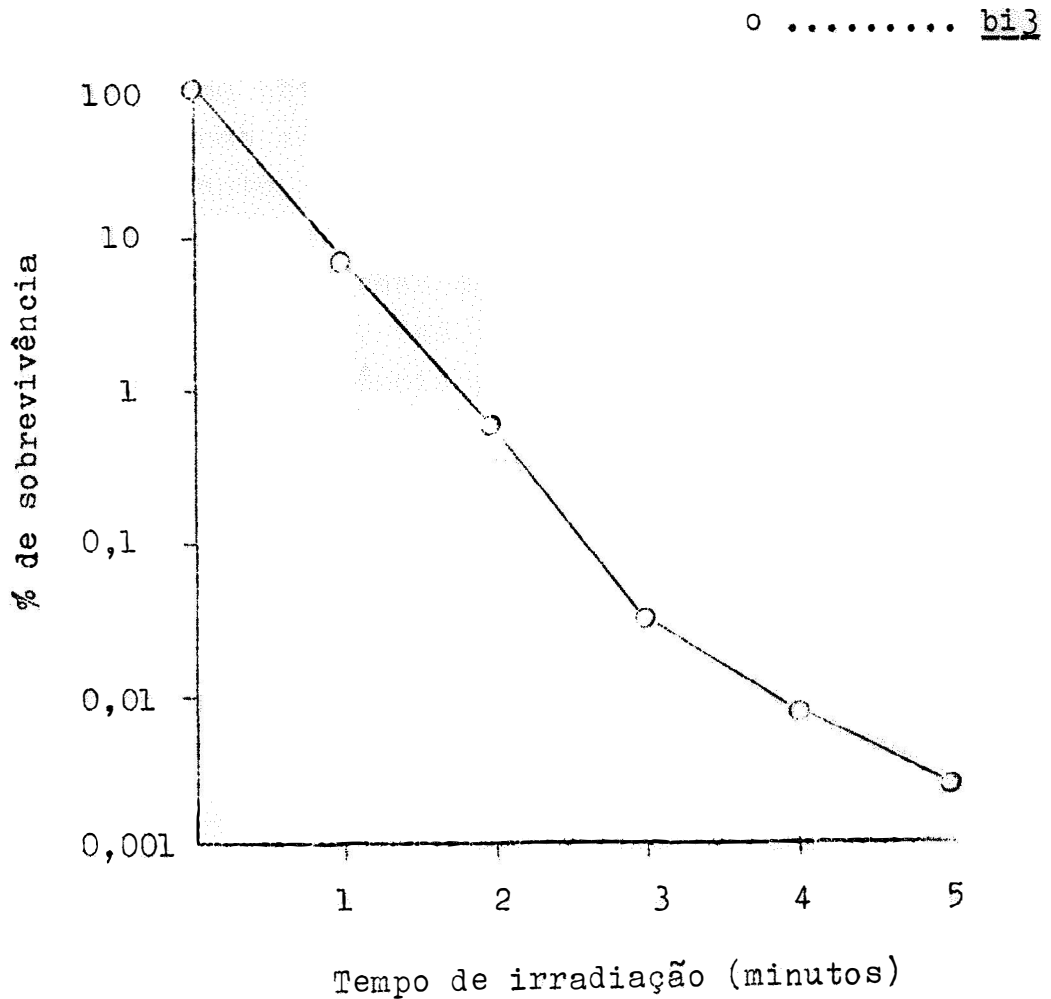
PORCENTAGEM DE SOBREVIVENTES DA LINHAGEM bi3 APÓS IRRADIAÇÃO
COM LUZ ULTRA-VIOLETA
(média de 2 experimentos)

TEMPO (minutos)	LINHAGEM <u>bi3</u> nº de sobreviventes (conídios/ml)	% sobreviventes
0	$7,76 \times 10^5$	100,00
1	$7,10 \times 10^4$	9,10
2	$6,80 \times 10^3$	0,86
3	$3,80 \times 10^2$	0,05
4	$7,70 \times 10$	0,009
5	$2,80 \times 10$	0,004

FIGURA 2

CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DA LINHAGEM bi3 IRRADIADAS COM LUZ ULTRA_VIOLETA

(média de 2 experimentos)



Quantidades de irradiação que davam porcentagens de sobrevivência de cerca de 5% foram usadas para induzir mutações na linhagem bi3. Cerca de 10% das colônias depois de irradiadas, apresentavam aparência anormal, conidiação reduzida, etc. Essas colônias, provavelmente eram possíveis mutantes morfológicos ou apresentavam aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais (aneuplóides, deficiências, translocações) como já foi verificado por KAFER, (1963). Essas colônias não foram isoladas uma vez que estávamos interessados em isolar e estudar apenas mutantes auxotróficos.

4.2. Isolamento de Mutantes Auxotróficos

O passo que se seguiu a irradiação, foi o isolamento de mutantes nutricionais. Segundo os processos já descritos na pág. 6 (Material e Métodos) colônias que cresceram nas placas com meio completo suplementado foram transferidas para meio mínimo mais biotina (26 colônias por placa). De dois experimentos feitos 3.020 colônias foram obtidas em placas com meio completo suplementado, em 49 placas usadas, o que dá uma média de 61 colônias por placa. No entanto, como certas placas apresentavam um número excessivo de colônias, para evitar mistura de conídios de duas colônias próximas, apenas colônias bem individualizadas foram empregadas. Portanto, das 3.020 colônias, apenas 2.054 foram ensaiadas por transferência para meio mínimo mais biotina.

Os resultados, dos dois experimentos, encontram-se na Tabela II.

TABELA II

MUTANTES OBTIDOS POR ISOLAMENTO TOTAL NA LINHAGEM bi3 APÓS IRRADIAÇÃO COM LUZ ULTRA-VIOLETA (5% DE SOBREVIVÊNCIA)

taxa de sobrevivência	isolados	nº total de mutantes	%
5 %	780	4	0,5
5 %	1.274	9	0,7
total	2.054	12	0,6

(valores de 2 experimentos realizados)

4.3. Caracterização dos Mutantes Obtidos

Uma vez isolados os possíveis mutantes auxotróficos, eles foram caracterizados para suas deficiências nutricionais, através da técnica de auxonografia, descrita por (PONTECORVO (1949) ver pág. 15).

Os resultados dos auxonogramas iniciais, visando reparar

os mutantes em relação as suas deficiências (aminoácidos, vitaminas e componentes dos ácidos nucléicos) estão na Tabela III.

TABELA III

AUXONOGRAMA INICIAL

Mu- tante nº	Sol.de Aminoác. comp. dos Ác.Nuc. e Caseína Hidrol.	Solução de Vita- minas	Ácidos Nucléicos de Leveduras Hi- drolizado	Meio comple- to.
5	-	+	-	+
6	+	-	-	+
7	+	-	-	+
7b	-	+	-	+
10	+	-	-	+
24	+	-	-	+
27	+	-	-	+
28	+	-	-	+
29	+	-	-	+
40	-	+	-	+
48	+	-	-	+
51	+	-	-	+

+ = crescimento

- = ausência de crescimento

Analisando-se a Tabela III, verificou-se que alguns mu-
tantes deveriam requerer vitaminas, uma vez que apresentavam cres-
cimento em solução de vitaminas, outros deveriam requerer aminoá-
cidos, já que cresciam ao redor de caseína hidrolizada ou solução
de aminoácidos e nenhum dos mutantes isolados requeriam purina ou
pirimidina, já que não cresciam em ácidos nucléicos de leveduras.

O passo seguinte foi então o de caracterizar êsses mu-
tantes para seus requerimentos nutricionais específicos. Ainda
pela técnica de PONTECCORVO (1949) êsses mutantes foram caracteri-
zados individualmente e os resultados obtidos estão na Tabela IV.

TABELA IV

AUXONOGRAMA FINAL

<u>Mutante número</u>	<u>Requerimento</u>
5	Piridoxina
6	Triptófano
7	Metionina
7b	Riboflavina
10	Fenilalanina
24	Metionina
27	Metionina
28	Metionina
29	Triptófano
40	Aneurina
48	Ácido Aspártico
51	Asparagina

A análise da Tabela IV mostra que 3 linhagens requeriam vitaminas (25%) e as outras 9 requeriam aminoácidos (75%). Desses últimos 9 mutantes, uma alta incidência de mutantes para metionina foi encontrada. Isso poderia ocorrer devido a um clone, isto é, mutação prévia à irradiação com luz ultra-violeta. Para se saber se essas mutações proviêram de um mesmo evento ou não, foram feitos cruzamentos entre os mutantes para metionina encontrados.

Os resultados dêsse cruzamento, encontram-se na Tabela V:

TABELA V

CRUZAMENTO ENTRE LINHAGENS MUTANTES PARA METIONINA

<u>Cruzamento</u>	<u>Formação ou não de Heterocácion</u>
28 x 27	+
27 x 24	+
24 x 28	+
27 x 7	+
24 x 7	+

+ = Formação de heterocácion

Houve formação de heterocácion, com setores vigorosos a partir das películas colocadas em placas de petri, com meio mínimo mais biotina. Dessa maneira, concluiu-se que os ~~os~~ ~~mutantes~~ ~~se~~ complementam, e como consequência provém de eventos independentes.

4.4. Isolamento e Caracterização de Mutantes Sensíveis à Temperatura

Em placas que apresentaram apenas poucas colônias germinando após irradiação com luz ultra-violeta, procurou-se obter mutantes sensíveis à temperatura.

Essas placas que estavam previamente incubadas a 37° C por cêrca de 48 horas, foram transferidas para temperatura de 25° C, marcando-se no fundo da placa as colônias que já haviam germinado. Após 72 horas de incubação a 25°C, as colônias que começaram agora a germinar foram ensaiadas para verificar se eram sensíveis à temperatura ou não (crescimento retardado, contaminações etc...).

Foram obtidos dessa forma, 3 possíveis mutantes conforme indica a Tabela VI.

TABELA VI

MUTANTES SENSÍVEIS À TEMPERATURA ANALISADOS EM MEIO COMPLETO a 25°C e 37°C

<u>Nº do Mutante</u>	<u>Temperatura</u>	
	25°C	37°C
T s1	+	±
T s2	±	-
T s3	+	-

+ = crescimento

± = crescimento menor

- = ausência de crescimento

4.5. Localização de alguns mutantes deficientes nutricionais isolados

Para localização de alguns dos mutantes obtidos, empregamos a linhagem M.S.E. (FORBES, 1963). Cruzamentos entre os mutantes, com a linhagem M.S.E. deu um heterocárrion.

Dos heterocárrions, foram isolados diplóides. Esses diplóides colocados em solução pFP, como descrito na pág. 16 e depois transferidos a meio completo, produziram setores haplóides que foram então ensaiados para seus requerimentos nutricionais.

Os seguintes cruzamentos foram realizados:

1	bi3 piro 5 x M.S.E.
2	bi3 met 7 x M.S.E.
3	bi3 ribo 7b x M.S.E.
4	bi3 fenil10 x M.S.E.

Diplóides desses 4 cruzamentos isolados e seus setores haplóides analisados, deram como resultado a locação dos cinco mutantes envolvidos como está indicado na Tabela VII.

TABELA VII

LOCAÇÃO DE 4 MUTANTES DEFICIENTES NUTRICIONAIS

<u>Linhagem Mutante nº</u>	<u>Mutante Envolvido</u>	<u>Localização</u>
10	Fenilalanina	Cromossoma I
7	Metionina	Cromossoma II
5	Piridoxina	Cromossoma IV
7b	Riboflavina	Cromossoma VIII

5 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. Curva de Sobrevivência da Linhagem bi3

A Tabela I e Figura 1, indicam a sobrevivência da linhagem bi3 de A. nidulans submetida a ação da luz ultra-violeta. A curva se assemelha àquela descrita por AZEVEDO e col., (1963) com as linhagens J.A.R.21 e J.A.R.1, a primeira de conídios verdes deficientes para a síntese de biotina e a segunda incapaz de sintetizar biotina e resistente à acriflavina. O tempo de exposição a luz ultra-violeta que dava porcentagem de sobrevivência ao redor de 5%, isto é, 1 a 2 minutos, foi utilizado para induzir mutação em A. nidulans. Essa taxa de 5% está descrita por vários autores, (PONTECORVO e col., 1953; KAUFER 1958; ROBERTS 1959; AZEVEDO e col., 1963) como ideal para causar mutação em conídios de A. nidulans.

5.2. Frequência dos mutantes isolados

Observando a Tabela II, verifica-se que 12 mutantes auxotróficos foram isolados, de um total de 2.054 colônias ensaiadas. Isso dá uma frequência de 0,6% mutantes auxotróficos, o que concorda com os dados encontrados na literatura. Por exemplo, PONTECORVO e col., (1953) acharam as frequências de 0,6% de auxotróficos induzidos em 6.422 colônias ensaiadas.

Os resultados indicam portanto, que os meios completos utilizados por nós, no presente trabalho não foram superiores ao meio completo clássico, utilizado por outros autores, uma vez que a frequência de mutantes obtida foi similar a outras descritas na literatura.

5.3. Caracterização dos mutantes obtidos

Do exame simultâneo dos mutantes deficientes nutricionais que obtivemos no presente trabalho e que estão relacionados nas Tabelas III e IV obtidas por meio das técnicas descritas no Capítulo 3 (Material e Métodos) foram identificados adicionando-se ao meio de cultura caseína hidrololizada, ácido nucléico de levedu -

ras, solução de vitaminas e uma solução de aminoácidos componentes do ácido nucléico.

Todos os mutantes obtidos requeriam um só elemento nutricional e todos eles apresentavam conídios verdes e crescimento normal, similares aos obtidos por outros autores como: PONTECORVO e col., (1953) KAFER (1958) AZEVEDO e col., (1963) ROBERTS (1967) .

Após irradiação com luz ultra-violeta foram obtidos doze mutantes deficientes nutricionais, de um total de 2.054 colônias isoladas pela técnica de isolamento total PONTECORVO e col., (1953). Os mutantes obtidos até o presente pelos autores anteriormente mencionados e também isolados são os seguintes:

Mutante piridoxina - êsse mutante descrito por KAFER (1958) e que se encontra dentro o grupo de linhagem IV R que foi isolado com prévia irradiação com luz ultra-violeta aplicando a técnica de "Starvation" (esgotamento, fome).

PONTECORVO e col., (1953) conseguiram obter 8 mutantes deficientes para a síntese de piridoxina; desses mutantes, um foi obtido pela técnica de isolamento total e sete pela técnica de "Starvation" (esgotamento, fome). Na presente pesquisa aplicando-se a técnica de isolamento total logrou-se obter o mutante piridoxina 5. Feita a análise mitótica conseguiu-se localizar êsse mutante no cromossoma IV de A. nidulans.

Mutante metionina - êsse mutante foi descrito por KAFER (1958) localizado dentro do grupo de linhagem IV L isolado pela técnica de "Starvation" (esgotamento) com prévia irradiação de luz ultra-violeta. Outro mutante, meth 2 descrito por PONTECORVO e col., (1963) dentro o grupo de linhagem III, obtida com prévia irradiação de luz ultra-violeta.

PONTECORVO e col., (1953) isolaram 3 mutantes deficientes para a síntese de metionina; AZEVEDO e col., (1963) partindo da linhagem JAR 21 obtiveram 1 mutante deficiente para a síntese de metionina.

Na presente pesquisa isolaram-se 4 mutantes deficientes para a síntese de metionina (7, 24, 27 e 28) partindo da linhagem

bi₃, dos quais o mutante metionina 7 foi localizado mitòticamente no cromossoma IV.

Mutante riboflavina - êsse mutante descrito por KAFER (1958) localizado no grupo de linhagem VIII R isolada pela técnica de "Starvation" (esgotamento) prévia irradiação de luz ultra-violeta. Outros mutantes riboflavina foram descritos por PONTECORVO e KAFER (1958) dentro o grupo de linhagem II com o número de ribo 1; isolado prévia irradiação com luz ultra-violeta. ROBERTS (não publicado) descreve ribo 6; dentro o grupo de linhagem II R; isolada após irradiação com luz ultra-violeta.

PONTECORVO e col., (1953) isolaram dois mutantes deficientes para a síntese de riboflavina; um mutante obtido pela técnica de isolamento total e um pela técnica de "Starvation" (esgotamento).

O mutante originado da linhagem bi₃ no presente trabalho ribo 7b que foi obtido através de irradiação com luz ultra-violeta é isolada pela técnica de isolamento total mostrou-se deficiente para a síntese de riboflavina; analisado mitòticamente foi localizado no cromossoma VIII de A. nidulans.

Mutante fenilalanina - êsse mutante foi descrito por KAFER (1958) localizado no grupo de linhagem III que foi obtido através de irradiação com luz ultra-violeta aplicando a técnica do "Starvation" (esgotamento) foram descritos 4 mutantes fenilalanina (1, 2, 3 e 4).

PONTECORVO e col., (1953) conseguiram isolar uma linhagem mutante deficiente para a síntese de fenilalanina aplicando a técnica de "Starvation".

O mutante originado da linhagem bi₃ que recebeu o número de 10 mostrou-se deficiente para a síntese de fenilalanina de conídios verdes e crescimento normal; analisado mitòticamente logrou-se localizar no I cromossoma de A. nidulans.

Mutante aneurina - êsse mutante descrito por PONTECORVO e KAFER (1958) localizado no grupo de linhagem II que foi obtido através de irradiação de luz ultra-violeta aplicando a mesma técnica

ca descrita anteriormente, "Starvation".

PONTECORVO e col., (1953), utilizando ambas técnicas aplicadas anteriormente conseguiram obter 5 mutantes deficientes para a síntese de aneurina.

Um mutante descrito no presente trabalho que recebeu o número 40, tinha conídios verdes e era deficiente para a síntese de aneurina.

O mutante triptófano - êsse mutante foi descrito por ROBERTS (1967) e estabeleceu 5 diferentes grupos de mutantes que sintetizavam triptófanos para o seu crescimento: os grupos de linhagens são os seguintes:

<u>Locus</u>	<u>Nº de Mutantes</u>	<u>Grupo de Linhagens</u>
<u>tryp A</u>	32	II
<u>tryp B</u>	30	I
<u>tryp C</u>	3	VIII
	56	
<u>tryp D</u>	19	II
<u>Grupo E</u>	14	VI

A análise desses mutantes foi feita para um controle das atividades enzimáticas em A. nidulans.

O grupo (tryp C) que é complexo determina a formação de uma enzima multidimensional agregada, análoga ao locus de tryp 1 de neuróspora.

Os mutantes obtidos originados da linhagem bi 3 que receberam os números 6 e 29 mostraram-se deficientes para a síntese de triptófano de conídios verdes e crescimento normal.

Mutantes asparagina e ácido aspártico - referência especial deve ser feita aos mutantes que mostraram deficiência para as sínteses de asparagina e ácido aspártico, PONTECORVO e col., (1953) utilizando as técnicas do "Starvation" (esgotamento) e isolamento total, após irradiação com luz ultra-violeta não conseguiram obter mutação com deficiência para êsses dois aminoáci-

dos, entre 6.422 colônias ensaiadas. AZEVEDO e col., (1963) trabalhando com as linhagens J.A.R.21 e J.A.R.1, deficientes para a síntese de biotina, tampouco lograram obter mutantes nutricionais para asparagina e ácido aspártico.

Os dois mutantes originados da linhagem bi3 que receberam os números de 51 e 48, mostraram-se deficientes para as sínteses de asparagina e ácido aspártico, ambos de conídios verdes de crescimento normal.

5.4. Mutantes sensíveis à temperatura

Três mutantes sensíveis à temperatura de 37°C e que podiam crescer a 25°C foram isolados. A técnica de isolamento desses mutantes mostrou, portanto, ser de utilidade uma vez que eles podem ser isolados diretamente, sem necessidade de transferência adicional, NEDER (1966) mostrou que mutantes sensíveis à temperatura induzidos por luz ultra-violeta em A. nidulans; aparecem em frequência comparável a dos mutantes deficientes nutricionais, ou seja, apenas 0,6% das linhagens analisadas, cresciam a 25°C mas não a 37°C.

No nosso caso esses mutantes apresentavam as mesmas características que os mutantes obtidos por NEDER e também FORBES e SINHA, (1956). Estes últimos mostraram que os mutantes sensíveis à temperatura apresentavam mais chance de viabilidade e conidiação abundante a 25°C que a 37°C.

5.5. Considerações e aplicações do presente trabalho

Já havíamos indicado que todo desenvolvimento da moderna genética em fungos, está baseado no estudo das mutações. Quanto mais mutantes forem descritos e mapeados em A. nidulans, mais completo será o seu mapa genético, que por sinal, já é um dos mais bem mapeados em relação a todos os seres vivos estudados.

Além do uso de A. nidulans para estudos genéticos propriamente ditos, esse fungo tem servido de modelo para estudos em outros fungos de aplicações industriais, como o Penicillium, Aspergillus niger, etc.

É de fazer notar que até recentemente, só dois meios existiam para melhorar o desempenho de fungos de valor industrial: mutação e controle de ambiente, ambas técnicas de grande uso. Desde que a maior parte dos fungos imperfeitos de valor industrial, não tendo, ciclo sexual não tinha sido possível até agora o uso de recombinação para o melhoramento com base no valor potencial da recombinação e estabelecer um programa combinado de recombinação e mutação. Atualmente, é possível reunir em uma linhagem o maior número possível de gens compatíveis que se deseja, graças ao ciclo parasexual. Vários autores estudaram e continuam pesquisando diplóides heterozigotos de Penicillium e outros fungos de valor industrial com relação a produção de antibióticos ou outras importantes substâncias produzidas por esses microrganismos. SERMONTI em 1956, por exemplo, mostra que uma linhagem diplóide sintetizada a partir de duas linhagens haplóides não produtoras de Penicillium deram produção desse antibiótico em quantidades comparáveis a do tipo selvagem produtora da droga.

SERMONTI em 1959 acentua que a fase diplóide em fungos, apesar de ser relativamente estável não deixa de ser uma fase de transição, e todo processo que permita a manutenção dos diplóides heterozigotos em estado estável apresenta importância. Este autor refere-se a provável utilidade dos diplóides heterozigotos quando as mutações sucessivas não desejáveis estão presentes em linhagens haplóides. Nesse caso, o mascaramento de alelos indesejáveis no estado heterozigoto, pode chegar ao chamado vigor híbrido ou heterose, não só em A. nidulans, mas também, em outros fungos de valor industrial.

Assim vários pesquisadores indicaram que o ciclo parasexual tem sem dúvida implicações no melhoramento de fungos imperfeitos como Aspergillus, Penicillium e outros fungos de valor industrial, essas combinações de gens desejáveis não é mais impossível e os estudos genéticos poderiam, certamente, auxiliar na elucidação de passos biosintéticos.

IKEDA e col., (1957) mostraram a superioridade das linhagens diplóides, triplóides e tetraplóides no fungo A. orizae na produção de protease, igualmente ODA e IGUCHI, (1963) cruzando duas linhagens de A. orizae e A. sojae, uma delas de produção de

protease e a outra de esporulação abundante lograram reunir em uma só linhagem com tôdas as características desejáveis.

No que se refere a fungos imperfeitos fitopatógenos merecem ser considerados no presente trabalho. Muitas espécies onde o ciclo parasexual tem sido observado em espécies fitopatogênicas BUXTON (1962) demonstrou contrôle genético de patogenicidade em fusarium e mudança do hospedeiro.

Outra implicação dêsse ciclo e todos êsses mecanismos de recombinação vem a originar importantes questões em relação ao relevante problema de evolução dos próprios sistemas genéticos, assim como vários autores sugeriram uma modificação na classificação dos microrganismos tendo por base o agrupamento de gens com funções bioquímicas relatados como no caso de Echerichia coli e Salmonella, ainda é muito cedo para qualquer tentativa, nesse sentido tem que ser feitos muitos trabalhos a fim, de que se possa pensar no assunto.

O uso de tôdas essas técnicas praticadas no melhoramento de plantas pelos geneticistas, despertou grande interêsse nos microbiologistas interessados no melhoramento de linhagens de microrganismos de valor econômico e industrial; isso foi impossível até a pouco tempo, em virtude da ausência dêsse ciclo parasexual em fungos perfeitos e outros como Penicillium e Arpegillus; na indústria; com a descoberta dos diplóides em A. nidulans por ROPER (1952) o problema foi solucionado.

6 - RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como finalidade obter alguns mutantes nutricionais em Aspergillus nidulans (Eidam) Winter.

1. - A linhagem mutante bi3 de A. nidulans de conídios verdes foi utilizada para obtenção dos mutantes deficientes nutricionais, após irradiação com luz ultra-violeta; e utilizando meios completos enriquecidos.

2. - Foi determinada uma curva de sobrevivência da linhagem bi3; com relação a luz ultra-violeta, concluindo-se que a curva obtida assemelha-se as descritas por outros autores, o tempo de irradiação que produzia 5% de sobreviventes foi usado para induzir mutações.

3. - De um total de 2.054 colônias isoladas de diversos meios de cultura enriquecidos a placas de meio mínimo mais biotina (26 colônias por placa), aplicando a técnica de isolamento total foram isolados 12 mutantes deficientes nutricionais com uma frequência de 0,6% de mutantes, similar frequência obtida por ROBERTS (1959). Conclui-se que a utilização de meios completos enriquecidos na presente pesquisa não alteraram a frequência de mutantes.

4. - Os mutantes isolados foram caracterizados para suas deficiências nutricionais; através da técnica de auxonografia e foram as seguintes: piridoxina 5; triptófano 6; metionina 7; riboflavina 7b; fenilalanina 10; metionina 24; metionina 27; metionina 28; triptófano 29; aneurina 40; ácido aspártico 48 ; asparagina 51.

5. - Foram isolados diretamente, sem necessidade de transferência, três mutantes sensíveis à temperatura de 37°C e que podiam crescer a 25°C. Esses mutantes mostraram crescimento vigoroso e maior chance de viabilidade a 25°C e crescimento reduzido a 37°C.

6. - Através de análise mitótica e empregando a linhagem M.S.E., procurou-se localizar alguns gens obtendo-se os seguin

tes resultados:

<u>fenilalanina</u>	10	no cromossoma I
<u>metionina</u>	7	no cromossoma IV
<u>piridoxina</u>	5	no cromossoma IV
<u>riboflavina</u>	7b	no cromossoma VIII

7 .- SUMMARY

The purpose of this study was to obtain some nutritionally deficient mutants of Aspergillus nidulans (Eidam) Winter. For this purpose the survival curve of line bi3, which has green conidia was determined for exposure to ultra-violet light when grown on enriched media. This line was then irradiated for 1-2 minutes, which was the exposure time necessary, for 5 % survival.

From a total of 2.054 colonies studied, 12 mutants were isolated using minimum media with biotin (The method of total isolation) Thus the frequency of nutritional mutants was 0,6 %.

These mutants were characterized by the method of auxonography and found to be: Pyridoxin 5, Tryptophan 6, Methionine 7, Riboflavin 7b, Phenylalanine 10, Methionine 24, Methionine 28, Tryptophan 29, Aneurin 40, Aspartic acid 48 and Asparagine 51.

Three temperature sensitive mutants were isolated directly without the necessity of transferring them to other media. These mutants grew vigorously with high viability at 25°C, but had reduced growth at 37°C.

The following mutants were localized using mitotic analysis:

<u>Phenylalanine</u>	10	chromosome	I
<u>Methionine</u>	7	chromosome	IV
<u>Pyridoxin</u>	5	chromosome	IV
<u>Riboflavin</u>	7b	chromosome	VIII

8 - BIBLIOGRAFIA CITADA

- AZEVEDO, J.L., R.N.NEDER & S.O.P. DA COSTA - 1963 - Novos mutantes obtidos pela luz ultra-violeta em linhagens de Aspergillus nidulans (Eidam) Winter. An. Fac. Med. Univ. Paraná 6:1-2 Curitiba, Jan-Jul.
- AZEVEDO, J.L. de - 1966 - Estudos sobre recessivos letais em Aspergillus nidulans (Eidam) Winter. Livre docente tese - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Brasil, 121 pp. mimeogr.
- APIRION, D. - 1962 - A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in micro-organisms. Nature, Lond., 195: 959-961.
- BOAM, T.B. - 1963 - Preliminary studies on the genetics of Aspergillus rugulosus. Aspergillus News letter., 4:19.
- BARRATT, R.W., G.B. JOHNSON & W.N.OGATA - 1965 - Wild type and mutant stocks of A. nidulans - Genetics, 52:233-246.
- BEADLE, G.W. & E.L. TATUM - 1941 - Genetic control of biochemical reactions in Neurospora - Proc. Natl. Acad. Sci. Wash. 27: 499-506.
- BUXTON, E.W. - 1962 - Parasexual recombination in the banana wilt fusarium. Trans. Brit Mycol. Sec., 45: 274-279.
- FORBES, E. - 1963 - A strain with all chromosomes marked for use in haploidization Aspergillus nidulans. Aspergillus News Letter , 4:15.
- FORBES, E. & U.K. SINHA - 1966 - Location of some temperature sensitive mutants in Aspergillus nidulans. Aspergillus News Letter , 7:17.
- GRIFFITH, F. - 1928 - The significance of pneumococcal types. J. Hyg. Camb., 27: 113.
- IKEDA, Y., K. NAKAMURA, K. UCHIDA & C. ISHITANE - 1957 - Two at -

- KAFER, E. - 1961 - The process of spontaneous recombination in vegetative nuclei of Aspergillus nidulans. Genetics 46: 1581-1609.
- KAFER, E. - 1963 - An 8-chromosome map of Aspergillus nidulans. Advances in Genetics, 9: 105-145.
- KAFER, E. - 1963 - Radiations effects and mitotic recombination in diploids of Aspergillus nidulans. Genetics, 48: 27-45.
- LEDERBERG, L. & LEDERBERG, E.M. - 1952 - Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bact., 63: 399.
- MOPURGO, G. - 1961 - Somatic segregation induced by p-fluorfenilalanina (pFA) Aspergillus News Letter, 2: 10.
- NEDER, R.N. - 1965 - Temperature sensitive mutants in Aspergillus nidulans. Aspergillus News Letter, 6: 6-7.
- ODA, K. & N. IGUCHI - 1963 - Genetics and biochemical studies on the formation of protease in Aspergillus sojae. Agr. Biol. Chem., 27: 758-766.
- PONTECORVO, G. - 1949 - Auxonographic techniques in biochemical genetics. J. Gen. Microbiol., 3: 122-126.
- PONTECORVO, G. - 1963 - Glasgow list. of located, or partially located, mutants of Aspergillus nidulans. Aspergillus News Letter, 4: 12-14.
- PONTECORVO, G. & E. KAFER - 1958 - Genetic analysis based on mitotic recombination. Advances in Genetics, 9: 71-104.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER - 1952 - Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in Aspergillus nidulans. Proc. J. Microbiol., 6: VII.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER & E. FORBES - 1953 - Genetic recombination without sexual reproduction us Aspergillus niger. J. Gen. Microbiol., 8: 198-210.

- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONS., K.D.MAC-DONALD & A.W. J.BUFTON - 1953 - The genetic of Aspergillus nidulans. Advances in Genetics., 5: 142-238.
- PONTECORVO, G., E. TARR-GLOOR & FORBES - 1954 - Analysis of mitotic recombination in Aspergillus nidulans. J.Genetics., 52: 226-237.
- ROBERTS, G.F. - 1959 - A replica plating technique for isolation of nutritionally exantig mutants of a filamentous fungus (Aspergillus nidulans). J.Gen. Microbiol., 20: 540-548.
- ROBERTS, G.F. - 1967 - Complementation analysis of the tryptophano pathway in Aspergillus nidulans. Genetics, , 55: 233-239.
- ROPER, J.A. - 1952 - Production of heterozigous diploids in filamentous fungi. Experientia, 8: 14-15.
- ROPER, J.A. - 1966 - Culture temperature and biotin requeriment in Aspergillus. Aspergillus News Letter., 7: 22.
- ROPER, J.A. & R.H. FRITCHARD - 1955 - Recovery of complementary products of mitotic crossing-over. Nature. Lond., 175: 639.
- SERMONTI, G. - 1956 - Complementary genes which effect Penicillin yields. J.Gen. Microbid., 15: 599-608.
- SERMONTI, G. - 1959 - Genetics of Penicillin production. Ann. N.Y. Acad. Scil, 81: 950-966.
- STRIGINI, F, & G. MOPURGO - 1961 - Biotin requeriment by wild type Aspergillus nidulans and Neurospora crassa. Aspergillus News Letter., 2: 9.
- ZINDER, N.D. & J. LEDERBERG - 1952 - Genetic exchange in Salmonella. J.Bact., 64: 679.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO, Docente Livre da Cadeira n. 19 da E.S.A. "Luiz de Queiroz" e chefe do setor Genética de microrganismos do Instituto de Genética. Conselheiro principal do trabalho, sem cuja orientação, ensinamentos e estímulo constantes, este trabalho não poderia ter sido executado.

Ao Prof. F.G. Brieger, ex-Diretor do Instituto de Genética, pelas facilidades oferecidas na prorrogação da Bolsa de Estudos.

Aos Drs. A. Blumenschein, J.T. do A. Gurgel e E. Pa - terniani pelas críticas e sugestões construtivas durante o Curso Pós-Graduado.

Queremos agradecer também à Comissão de Bolsas de Estudos da Reitoria da Universidade de São Paulo, pela Bolsa recebida durante o transcorrer do Curso.

À Faculdade de Agronomia da Universidade de São Francisco Xavier de Sucre (Bolívia), pela oportunidade de aperfeiçoamento concedida.

Ao colega I.R. Baracho pelas críticas do texto.

À Srta. Profa. C. Gonçalves pelo manuscrito e os trabalhos de datilografia do texto.

Finalmente, queremos consignar nossos agradecimentos aos Funcionários da Cadeira e Instituto de Genética que auxiliaram na impressão desta tese.