

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE ALGUMAS LINHAGENS DE
Aspergillus nidulans (Eidam) Winter

JOSÉ PAES DE BARROS

Orientador: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

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

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Março, 1977

para Ana e Júnior

AGRADECIMENTOS

Agradeço particularmente:

- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, por seus ensinamentos, pelo entusiasmo e clareza com que me orientou neste trabalho;

- À Profa. Anna Rachel Machado Paes de Barros, minha mulher, pela sua carinhosa colaboração na revisão desta dissertação e pela extrema paciência com que soube me conduzir;

- Ao Magnífico Reitor da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Prof. Dr. Benedito José Barreto Fonseca, pelo valioso apoio recebido e pelas condições oferecidas para o desenvolvimento desta pesquisa;

- Ao Dr. João Salvador Furtado, pela orientação nas técnicas citológicas;

- Ao Prof. Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho, pela cuidadosa análise estatística;

- À Dra. Dixier M. Medina, por suas sugestões e sua disposição de sempre cooperar.

- Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela contribuição para minha formação científica;

- Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pelo convívio e constante estímulo;

- Aos técnicos do Laboratório de Citologia e Genética da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, onde foi realizada parte desta pesquisa; e em especial, a Eduardo Marchiori Escobar, pela constante colaboração;

- Aos técnicos do Laboratório de Genética de Microrganismos, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelos serviços prestados;

- À CAPES, que contribuiu para a realização desta dissertação;

- E, finalmente, a todos que compartilharam comigo esta alegria.

3.1.1.3.9. Solução de <u>p</u> -fluorfenilalanina (pFA)	20
3.1.1.3.10. Suplementos adicionados ao meio completo	21
3.1.1.4. Placas de análise	21
3.1.2. Métodos	22
3.1.2.1. Esterilização e temperatura usadas	22
3.1.2.2. Obtenção dos variantes deteriorados e melhorados	22
3.1.2.3. Técnicas de análise	22
3.1.2.3.1. Obtenção de heterocários	22
3.1.2.3.2. Análise mitótica	23
3.1.2.3.3. Análise meiótica	24
3.2. Análise citológica	26
3.2.1. Material	26
3.2.1.1. Linhagens utilizadas	26
3.2.1.2. Membranas de diálise	26
3.2.1.3. Tampão-fosfato	27
3.2.1.4. Solução estoque de Giemsa	27
3.2.1.5. Solução de Helly	27
3.2.1.6. Formalina neutra	28
3.2.1.7. Albumina 5%	28
3.2.1.8. Fotografias	28
3.2.2. Métodos	29
3.2.2.1. Cultivo do fungo	29

3.2.2.1.1. Técnica da membrana de diálise com ligeira modificação	29
3.2.2.1.2. Técnica do cultivo em lâmina .	29
3.2.2.2. Técnicas de coloração	30
3.2.2.2.1. Técnica HCl-Giemsa (FURTADO) , com algumas modificações	30
3.2.2.2.2. Técnica HCl-Giemsa (ROBINOW e CATEN) com algumas modificações	31
3.2.2.2.2.1. Para conídios	31
3.2.2.2.2.2. Para hifas e conídios	33
3.2.2.3. Medidas	34
4. RESULTADOS	36
4.1. Análise genética	36
4.1.1. Isolamento da linhagem amarela <u>proA1, pabaA6, y</u> ..	36
4.1.2. Análise mitótica	36
4.1.3. Análise meiótica	38
4.1.4. Isolamento da linhagem deteriorada V46	40
4.1.5. Análise mitótica	41
4.1.6. Análise meiótica	43
4.1.6.1. Mapeamento do determinante de deterioração	44
4.2. Análise citológica	46
4.2.1. Preparo de lâminas	46
4.2.2. Medidas obtidas	47
4.2.3. Número de núcleos nas diferentes linhagens	49
4.2.4. Histogramas e polígonos de frequência	50

4.2.5. Relação núcleo-citoplasma	50
5. DISCUSSÃO	54
5.1. Análise citológica	54
5.1.1. Justificativa do método e do material usados	54
5.1.2. Verificação das hipóteses genéticas	57
5.1.3. O volume modal	59
5.1.4. Número de núcleos	61
5.1.5. Relação núcleo-citoplasma	62
5.2. Análise genética	62
5.2.1. Linhagem <u>proA1, pabaA6, y</u>	62
5.2.2. Variante V46	65
6. RESUMO E CONCLUSÕES	67
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS	69
8. LITERATURA CITADA	71
APÊNDICE	78

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela nº</u>	<u>página</u>
1. Tipos e números de setores obtidos a partir do diplóide de <u>proA1</u> , <u>pabaA6</u> , <u>y</u> // MSE, inoculado em meio completo com <u>pFA</u> , na concentração de 75 µg/ml	38
2. Resultado da segregação meiótica do diplóide <u>proA1</u> , <u>pabaA6</u> , <u>y</u> // MSE	39
3. Análise mitótica da linhagem V46 // MSE	42
4. V46 x MSE : segregação meiótica	43
5. Análise dos segregantes meióticos quanto aos requisitos nutricionais prolina e ácido <u>p</u> -aminobenzóico e quanto à morfologia	45
6. Médias dos diâmetros dos núcleos e das células das diferentes linhagens	48
7. Valores dos volumes modais dos núcleos e das células das diferentes linhagens	48
8. Frequência do número de núcleos nas diferentes linhagens	50
A-1. Análise de variância das médias dos diâmetros dos núcleos das diferentes linhagens	79
A-2. Comparação das médias dos diâmetros dos núcleos das diferentes linhagens pelo teste de Tukey	79

Tabela nº

página

A-3. Análise de variância das médias dos diâmetros das células das diferentes linhagens	80
A-4. Comparação das médias dos diâmetros das células das diferentes linhagens pelo teste de Tukey	80
A-5. Variabilidade do diâmetro nuclear nas diferentes linhagens	81

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura nº</u>	<u>página</u>
1. Marcadores genéticos da linhagem <u>A</u>	16
2. Marcadores genéticos da linhagem MSE	17
3. Linhagem duplicada <u>A</u> de <i>A.nidulans</i> com setor melhora- do	37
4. Linhagem melhorada amarela <u>proA1, pabaA6, y</u> , isolada e purificada a partir da linhagem <u>A</u>	37
5. Setores ocorrendo na linhagem diplóide <u>proA1, pabaA6, y</u> // MSE, desenvolvida em meio completo adicionado de 75 µg/ml de <u>pFA</u>	39
6. Segregantes meióticos do cruzamento entre <u>proA1, pabaA6, y</u> x MSE	40
7. Linhagem deteriorada V46, isolada e purificada a par- tir da linhagem <u>A</u>	41
8. Segregantes meióticos de cruzamento entre V46 x MSE.	44
9. Mapa genético indicando as posições relativas dos mar- cadores <u>proA1, pabaA6</u> , e do determinante de deteriora- ção <u>v46</u>	46
10. Conídios da linhagem diplóide <u>biA1</u> // MSE, corados se- gundo a técnica <u>HCl-Giemsa</u>	47

Figura nº

página

11.	Histogramas e polígonos de freqüência representativos das freqüências dos diâmetros dos núcleos de quatro linhagens de <i>A. nidulans</i>	51
12.	Histograma e polígono de freqüência representativos das freqüências dos diâmetros dos núcleos da linhagem diplóide	52
13.	Polígonos de freqüência das diferentes linhagens de <i>A. nidulans</i>	52
14.	Relação núcleo-citoplasma das diferentes linhagens de <i>A. nidulans</i>	53
15.	Constituição cromossômica do diplóide obtido pelo cruzamento <u>proA1, pabaA6, y</u> // MSE, considerando apenas dois grupos de ligação	64

1. INTRODUÇÃO

Casos de instabilidade durante a divisão mitótica já foram descritos em vários organismos, como o milho, a drosófila, o fumo, as bactérias e os fungos.

De todos eles, os fungos constituem o melhor material para se estudar a instabilidade, pois os setores que surgem podem facilmente ser isolados e analisados. Dentre os fungos, o *Aspergillus nidulans* merece especial atenção, porque, aliados a um ciclo vital rápido, dois tipos de recombinação estão envolvidos: o ciclo sexual e o parassexual.

Linhagens do fungo filamentosso *A. nidulans*, que apresentam duplicação cromossômica, são instáveis mitoticamente, produzindo setores melhorados e deteriorados.

NGA e ROPER (1968) explicaram a origem dos setores melhorados em linhagens com duplicação cromossômica como sendo devida a deleções do segmento em duplicata. Por outro lado, os setores deteriorados decorreriam de novas duplicações no segmento em duplicata.

Os setores melhorados foram estudados geneticamente por *NGA e ROPER (1968)*, enquanto que os deteriorados, por *NGA e ROPER (1968)*, *AZEVEDO e ROPER (1970)*, *AZEVEDO (1971)*, *ROSATO (1973)* e *MENEZES (1974)*. Nenhuma análise citológica, entretanto, foi efetuada até o presente momento para o estudo dos referidos setores.

O presente trabalho foi conduzido no sentido de se padronizar uma técnica citológica adequada a condições de *A. nidulans* e, ao mesmo tempo, de aplicá-la nas linhagens não-balanceadas, assim como nos setores que surgem a partir delas, visando com isso ensaiar as hipóteses genéticas anteriormente estabelecidas. Finalmente, procedeu-se à análise genética dos setores, tendo-se por objetivo corroborar as conclusões citológicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Genética

2.1.1. Introdução

O fenômeno da instabilidade é, aparentemente, de ocorrência geral entre os seres vivos, sendo que, em alguns, ele tem sido mais estudado do que em outros. Para efeito de clareza, a revisão desses estudos será dividida em duas partes: referências gerais e específicas. As primeiras se referem a casos de instabilidade descritos em diferentes espécies, e as segundas, exclusivamente a casos descritos em *A. nidulans*.

2.1.2. Referências gerais

Um dos trabalhos pioneiros sobre instabilidade somática foi realizado por *DEMEREK (1937)*, em *Drosophila*, mostrando que o aumento da taxa de mutação era devido à presença de genes mutadores.

McCLINTOCK (1951, 1953, 1955, 1956), observando o fenômeno em milho, aventou a hipótese de existência de "elementos controladores" do genoma, que, se presentes, desencadeariam o processo da instabilidade. Uma característica desses elementos é que eles, por si, não dão fenótipo próprio, mas atuam em outro gene, desencadeando o processo. Uma outra característica seria a sua capacidade de transposição de um para outro local do cromossomo, ou mesmo para outro cromossomo.

GREEN (1967) descreveu a instabilidade do locus "white" (w^C) de *Drosophila melanogaster*, que apresenta mutação para diferentes estados alélicos, desde o selvagem até o branco. Em 1969, o mesmo autor estudou quatro tipos de transposições independentes e espontâneas de um segmento do gene "white" (cromossomo X) para o cromossomo III. Análises genéticas indicaram transposição de um elemento controlador. Assim, a reversão do mutante w^C para o tipo selvagem w^+ corresponderia à liberação do elemento controlador, dando estabilidade à linhagem em relação ao locus mencionado, enquanto que a transposição desse elemento originaria instabilidade.

Portanto, em milho e em drosófila, parecem existir elementos controladores da instabilidade que são passíveis de transposição.

Também em microrganismos, têm sido observados vários casos de instabilidade. Assim, *SMITH-KEARY (1958)* verificou que em *Salmonella typhimurium* algumas linhagens leu apresentavam alta taxa de reversão. *DAWSON e SMITH-KEARY (1963)* verificaram que a causa da instabilidade estava ligada ao locus supressor da leucina (suleu^A). A origem da instabilidade foi relacionada à ligação de um elemento ao sítio suleu^A, sendo que sua diminuição ocorreria com a perda desses elementos controladores ou com sua integração,

de uma maneira estável, em outro sítio do genoma bacteriano. Admitiram ainda que esses elementos podiam também sofrer transposição para outros sítios afins, provocando instabilidade nesses novos locus e estabilidade no sítio original. A esses elementos que modificam a expressão fenotípica, aumentam a taxa de mutação e sofrem transposição, denominaram de "epissomos controladores". É evidente a semelhança entre esses "epissomos controladores" e os "elementos reguladores" de *McCLINTOCK*.

2.1.3. Referências específicas

O trabalho pioneiro sobre instabilidade em *A. nidulans* foi o de *ROPER (1952)*, que explicou o aparecimento de recombinantes mitóticos em uma linhagem diplóide através do processo de permuta mitótica.

PONTECORVO et alii (1954) propuseram um outro mecanismo além do da permuta mitótica: a distribuição irregular dos cromossomos na mitose.

KÄFER (1960), estudando linhagens diplóides, explicou o fenômeno da recombinação mitótica através da haploidização, por perdas sucessivas de cromossomos, até as mesmas atingirem o estágio de haplóide normal. A mesma autora, em 1961, estudando um dissômico, verificou que o mesmo produzia setores haplóides vigorosos, o que ela explicou através da não-disjunção mitótica do grupo de ligação adicional, que restabelece a condição normal de haplóide.

BAINBRIDGE e ROPER (1966) verificaram que em certos cruzamentos de linhagens parentais de morfologia normal, eles obtinham apenas 2/3 da progênie com fenótipo normal; o restante exibia um fenótipo que foi cha-

mado de "crinkled". Além disso, examinaram ascósporos de cleistotécios que deram segregação anômala e verificaram que 25% dos mesmos eram inviáveis. A explicação do fenômeno foi dada pelo exame dos pais: enquanto um era normal, o outro tinha uma translocação não-recíproca em que um segmento do grupo de ligação III tinha sido transposto para o grupo de ligação VIII. Foi então sugerido que o variante "crinkled" possuiria o grupo de ligação com a duplicação, pois, além do seu crescimento lento e de sua morfologia distinta, ele era instável, produzindo setores que se aproximavam do normal quanto à morfologia e à taxa de crescimento. Os 2/3 normais seriam aqueles que apresentassem as mesmas combinações dos tipos parentais, enquanto que nos ascósporos inviáveis faltaria o segmento do grupo de ligação III. No segmento em duplicata havia o gene s12, responsável pelo requisito para tiosulfato. O variante "crinkled" era selvagem em relação ao tiosulfato, mas os setores produzidos por ele eram de dois tipos: s12⁺ e s12⁻. Logicamente, o variante em questão deveria ser heterozigoto para o locus s12. Foi sugerido, então, que os setores surgiram devido a perdas de partes variáveis do segmento em duplicata.

NGA e ROPER (1968), utilizando linhagens duplicadas com marcadores genéticos mais favoráveis, contribuíram para melhor compreensão do fenômeno. Assim, a linhagem estudada por eles apresentava uma translocação de um segmento do grupo de ligação I para o grupo de ligação II. Como existia, no segmento translocado, a marca para cor de confídios, além de duas marcas nutricionais, era fácil acompanhar os eventuais processos. Verificaram eles que essa linhagem, como a "crinkled" de *BAINBRIDGE e ROPER*, apresentava morfologia alterada, taxa de crescimento reduzida e instabilidade mitótica, produzindo setores melhorados e deteriorados. Para explicar o

aparecimento dos setores melhorados, sugeriram que isso se devia a perdas, em tamanhos variados, do segmento em duplicata e que a perda, muitas vezes, era intersticial. Com relação aos setores deteriorados, foram analisados apenas dois, cuja origem proposta seria a de duplicações em tandem, sabidamente responsável, em muitas espécies, pela instabilidade mitótica. Os autores consideraram que tanto a perda quanto o aparente ganho de material cromossômico deveriam ser processos intracromossômicos, formulando então duas hipóteses para explicar o aparecimento das duas classes de setores: ou haveria permuta desigual entre cromatídeos irmãos ou permuta em uma alça intracromossômica; um ou outro fenômeno produziria tanto deleção quanto duplicação em tandem.

NGA e ROPER (1969) mostraram ainda que as linhagens haplóides de *A. nidulans*, que apresentam um segmento cromossômico em duplicata, são instáveis mitoticamente. Através do uso de linhagens haplóides e diplóides, com e sem translocações e com genomas balanceados e não-balanceados, os autores evidenciaram que é o não-balanceamento cromossômico o responsável pela instabilidade e que as deleções cromossômicas são restritas quase que exclusivamente aos segmentos que a provocam. Ao fenômeno da instabilidade chamaram de "não-conformidade mitótica".

Com relação às linhagens deterioradas, as maiores contribuições são provenientes dos trabalhos de *AZEVEDO e ROPER (1970)*, *AZEVEDO (1970, 1971)* e *MENEZES (1974)*. Esses autores verificaram que a produção de setores deteriorados era característica das linhagens duplicadas, não sendo detectada a partir de linhagens normais. Isso indicava que a duplicação tinhava uma ação positiva na produção de setores deteriorados, desconhecendo-se,

entretanto, sua forma de ação. A origem da deterioração e o grau de instabilidade foram propostos por *AZEVEDO (1971)*, numa seqüência de eventos: linhagem duplicada → variante deteriorada com duplicação em tandem → perda ou transposição produzindo maior estabilidade. Entretanto, esses tipos mais estáveis, independentemente de suas origens, ainda são mais instáveis que a linhagem parental duplicada. Isso deveria ser resultante, ainda segundo *AZEVEDO (1971)*, de uma interação entre a mutação v e a duplicação, pois v sozinho não confere estabilidade. A contínua instabilidade foi atribuída a uma interdependência entre segmentos de cromossomos não homólogos, na replicação. Se cromossomos não homólogos, não são inteiramente autônomos na replicação, uma mutação em um cromossomo poderia levar a uma outra mutação em uma região suscetível, em outro cromossomo. Isso facilitaria, de certa forma, as propostas transposições. Foi verificado ainda que todos os grupos de ligação estão envolvidos com as mutações que determinam o caráter deteriorado, havendo indicações de que há regiões de suscetibilidade particular a estas mutações, principalmente as regiões próximas ao centrômero.

2.2. Citologia

OLIVE (1953), depois de fazer uma ampla revisão sobre a estrutura e comportamento dos núcleos dos fungos, apresentou as seguintes conclusões:

a. Na maioria dos fungos o núcleo é essencialmente o mesmo em estrutura e é similar ao núcleo dos organismos superiores. Ele contém um único nucléolo, fios de cromatina, cariolinfa e membrana nuclear;

b. As divisões mitóticas que ocorrem na fase vegetativa dos

fungos são essencialmente as mesmas que ocorrem nos organismos superiores , embora os detalhes sejam freqüentemente obscurecidos pelo pequeno tamanho dos núcleos, além de o fuso ter uma origem aparentemente intranuclear.

BAKERSPIGEL (1959), realizando estudos sobre núcleos vegetativos interfásicos e em divisão, em *Neurospora crassa*, usando as técnicas de HCl-Giemsa, Feulgen, Azur A-SO₂ e hematoxilina férrica, verificou que os conídios que não estavam em germinação se coravam bem, tanto com a técnica HCl-Giemsa quanto com a de Feulgen, e que seus núcleos exibiam grânulos de cromatina, sendo um deles mais intensamente corado; não sendo observada, além disso, a membrana nuclear. Afirmou ainda que a divisão nuclear deste fungo diferia da mitose clássica.

ELLIOTT (1960) usou a técnica da orceína acética e, apesar de ter descrito tão bem fenômenos citológicos que ocorrem nos ascos de *A. nidulans*, não fez referências aos núcleos hifais.

SOMERS et alii (1960), usando a técnica da orceína acética em *Neurospora crassa*, verificaram que os conídios maduros apresentam uma série de um a oito núcleos e que esses núcleos interfásicos aparecem como pequenos corpos extremamente condensados, com uma ausência total de estrutura, medindo 1 micrão de diâmetro. Núcleos com morfologia similar puderam ser observados em hifas desenvolvidas por vários dias. Se as hifas examinadas eram de uma cultura de várias semanas, os núcleos exibiam fenômenos degenerativos, tais como a desintegração. Os mesmos pesquisadores usaram também, em várias ocasiões, a técnica de Feulgen, chegando à conclusão, quanto à divisão nuclear somática, que esta era similar à clássica mitose.

WARD e CIURYSEK (1962), usando a técnica HCl-Giemsa, fizeram estudos sobre mitose somática de *Neurospora crassa* e verificaram que os núcleos, em hifas mais velhas, são pequenos e esféricos. Ainda observaram que, devido ao típico crescimento periférico de uma colônia de fungo, a proporção núcleo interfásico:núcleo em divisão tende a ser elevada e aumenta com a idade da colônia e que, já em culturas jovens, constituídas de hifas de crescimento ativo, os núcleos interdivisionais são geralmente maiores, assumindo uma variedade de formas, que sugerem crescimento na época da fixação. Além disso, eles mediram núcleos interfásicos num micélio velho, encontrando 1 micron de diâmetro. Os núcleos em divisão eram maiores, com diâmetro de 3 micra nas metáfases. Em configurações esféricas, as dimensões maiores excediam 5 micra. Admitiram ainda que a divisão dos núcleos segue o processo mitótico convencional.

AIST e WILSON (1965) consideraram que a grande controvérsia concernente à cariologia dos fungos decorria do fato de não existirem placas metafásicas na divisão nuclear desses organismos. Ao realizarem estudos em *Ceratocystis fagacearum* concluíram que a divisão nuclear deste fungo ocorre por um processo de divisão diferente do mitótico. Além de preconizarem os métodos HCl-Giemsa e Feulgen, inclusive para *A. nidulans*, sugeriram também a técnica de cultivo em lâmina, pois esta última evitaria as distorções que ocorrem com o método da membrana de diálise.

WEIJER et alii (1965), usando as técnicas de Feulgen e cristal violeta em *Neurospora crassa*, acabaram por dividir os núcleos vegetativos em três ciclos cariocinéticos: juvenil, maturação I e maturação II. Segundo eles, durante esses ciclos, os núcleos exibem formas variadas: em

anel, crescente, filiforme e esférica. Preconizaram ainda a técnica do cristal violeta.

ROBINOW e BAKERSPIGEL (1965), fazendo uma revisão sobre núcleos somáticos e formas de mitose em fungos, afirmaram que as evidências citológicas eram insuficientes para admitir que as afirmações iniciais de *OLIVE (1953)* estavam corretas. Além disso, consideraram que as mitoses em fungos são de diversos tipos, com peculiaridades que as afastam da mitose conhecida.

WEIJER e WEISBERG (1966) realizaram estudos citológicos em uma linhagem haplóide selvagem de *A. nidulans*, usando o método de Feulgen juntamente com a enzima DNase, para ensaiar a especificidade do método. Verificaram que os conídios se apresentavam globosos, uninucleados, com 3 a 3,5 micra de diâmetro. Conídios binucleados, medindo de 4 a 5 micra de diâmetro, foram encontrados, mas não freqüentemente. Observaram ainda que os núcleos dos conídios uninucleados são geralmente irregulares, mas, às vezes, se apresentam esféricos, medindo de 0,5 a 0,7 micra de diâmetro. Ocasionalmente um corpo extracromossômico de 0,2 micra de diâmetro pôde ser observado.

Os autores dividiram a cariologia do núcleo somático em dois ciclos, à semelhança do que *WEIJER et alii (1965)* fizeram para *Neurospora crassa*: ciclo juvenil e ciclo de maturação. No ciclo juvenil, que daria origem às hifas multinucleadas e indiferenciadas, os núcleos se apresentam bastante irregulares, com forma filamentosa, em crescente, em ferradura e anelado. Após 14 horas, o comportamento do núcleo se modifica e a forma fica mais constante e esférica. A transição entre os dois ciclos ocorreria

após 14 horas. No ciclo de maturação, que corresponderia ao desenvolvimento de estruturas vegetativas específicas, tais como o esterigma e os conídios, os núcleos apresentam, com frequência, a forma filamentosa.

NAMBOODIRI e LOWRY (1967), com a técnica HCl-Giemsa, reexaminaram a divisão nuclear vegetativa em *N. crassa*, utilizando um mutante que produz bandas de crescimento definido. Concluíram que existem, pelo menos em *Neurospora*, dois tipos de núcleos, o esférico e o alongado, que seguem caminhos diferentes na divisão e que não são apenas configurações diferentes de núcleos dentro de um mesmo ciclo mitótico.

AIST e WILSON (1967) estudaram novamente o núcleo vegetativo de *Ceratocystis fagacearum*, usando as técnicas de HCl-Giemsa, Feulgen e Hematoxilina férrica. Consideraram que as três técnicas davam resultados similares, apesar de os núcleos corados pela HCl-Giemsa terem sido os escolhidos para as fotografias, devido ao seu superior contraste. Além disso, descreveram o núcleo interfásico como sendo morfológicamente similar ao de plantas superiores.

ROBINOW e CATEN (1969), ao estudarem o *A. nidulans*, usaram várias técnicas: HCl-Giemsa, Feulgen, orceína com e sem hidrólise, além de observações diretas com microscópio de fase e microscopia eletrônica.

Em hifas vivas, no microscópio de fase, eles verificaram que os núcleos atingem seu maior tamanho um pouco antes da divisão e que os núcleos recentemente constituídos são pequenos. Observaram também que o núcleo não exibe membrana visível, além de conter um grande nucléolo.

Nas preparações fixadas e coradas, foi observado, na perife-

ria do núcleo, um grânulo bem definido que se duplica, quando se inicia a divisão nuclear. O grânulo não parece ser cromatínico e não pôde ser reconhecido em preparações pela orceína ou HCl-Giemsa.

Os mesmos autores optaram pelo método da orceína, pois, segundo eles, o do HCl-Giemsa trazia uma desvantagem, a coloração intensa da constelação mitótica, que tornaria difícil a individualização dos cromossomos, defeito esse que seria ampliado nas fotografias. Além disso, afirmaram que a técnica da orceína dava mais detalhes estruturais que a do HCl-Giemsa.

FINLEY (1970) usou o HCl-Giemsa para estudar os núcleos de *Ceratobasidium flavescens* e de *Pellicularia koleroga*, preconizando a técnica da membrana de diálise no lugar da do cultivo em lâmina. E justifica: "é difícil manter as hifas sobre a lamínula, pois elas são lavadas durante a fixação e a coloração". Quanto à divisão nuclear, concluiu que ela é mitótica nas duas espécies.

FULLER (1976), descrevendo o núcleo interfásico dos fungos em geral e baseando-se em microscopia eletrônica, acabou por concordar com as descrições iniciais de *OLIVE (1953)*, afirmando que o conhecimento acurado dos núcleos dos fungos só será possível com a microscopia óptica associada à eletrônica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análise Genética

3.1.1. Material

3.1.1.1. Símbolos e fenótipos dos mutantes usados

Os símbolos foram designados de acordo com as sugestões de *CLUTTERBUCK (1970 b)*.

Símbolos

Fenótipos

adE20

requisito para adenina.

biA1

requisito para biotina.

facA303

incapaz de crescer em meio contendo acetato como única fonte de carbono

galA1

incapaz de crescer em meio contendo galactose como única fonte de carbono

<u>nicB8</u>	requisito para ácido nicotínico.
<u>pabaA6</u>	requisito para ácido <u>p</u> -aminobenzóico.
<u>proA1</u>	requisito para prolina
<u>pyroA4</u>	requisito para piridoxina
<u>riboB2</u>	requisito para riboflavina
<u>sB3</u>	requisito para tiosulfato
<u>suAladE20</u>	supressor do mutante <u>adE20</u> .
<u>yA2</u>	conídios amarelos
<u>wA3</u>	conídios brancos (epistático para <u>y</u>)
<u>methG1</u>	requisito para metionina.

3.1.1.2. Linhagens utilizadas

a. Linhagem A (*NGA e ROPER, 1968*), que apresenta conídios verdes e uma duplicação do grupo de ligação I, translocada para o grupo de ligação II (Figura 1).

b. Linhagem proA1, pabaA6, y (conídios amarelos, não-duplicada).

c. Linhagem MSE (Master Strain E de *McCULLY e FORBES, 1965*), que apresenta marcadores genéticos em todos os grupos de ligação (Figura 2).

d. Linhagem V46 (proA1, pabaA6 deteriorada).

A linhagem A e a MSE foram obtidas da coleção existente no setor de Genética de Microorganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" de Piracicaba. Os variantes V46 e

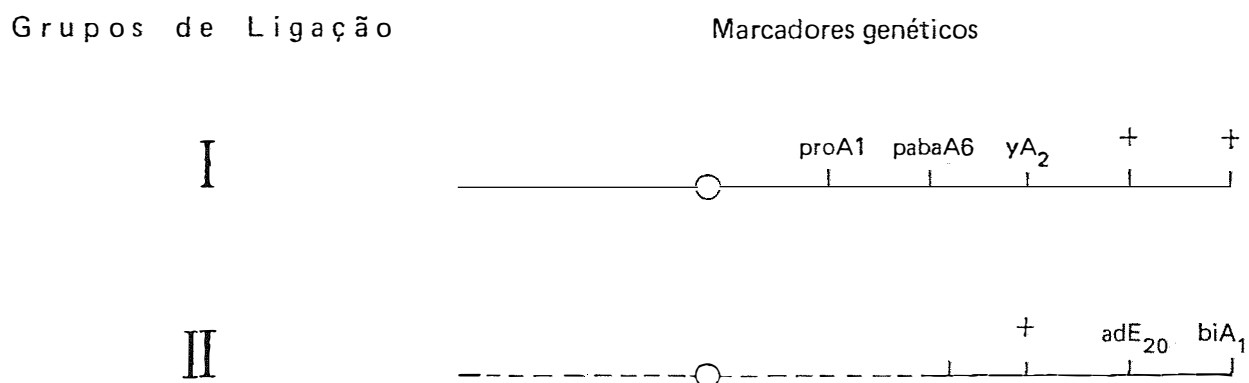


Figura 1. Marcadores genéticos da linhagem A

Observações:

1. Os centrômeros estão designados por 0. Os fenótipos determinados pelos genes podem ser encontrados no item 3.1.1.1..
2. _____ grupo de ligação I.
 ----- grupo de ligação II.
3. As distâncias não estão em escala no mapa.

proA1, pabaA6, y foram obtidos por nós a partir da linhagem A.

3.1.1.3. Meios de Cultura e Soluções Usadas

3.1.1.3.1. Meio Mínimo (*PONTECORVO et alii, 1953*)

NaNO ₃	6,0 gramas
KH ₂ PO ₄	1,5 gramas
KCl	0,5 gramas
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,5 gramas
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Glicose	10,0 gramas
Agar	15,0 gramas
Água destilada	1 litro
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1 N.	

3.1.1.3.2. Meio Completo (*PONTECORVO et alii, 1953*)

Adicionou-se ao meio mínimo:

peptona	2,0 gramas
caseína hidrolisada	1,5 gramas
extrato de leveduras	0,5 gramas
solução de vitaminas	1,0 mililitro
ácido nucleico de leveduras	2,5 mililitro
O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1N.	

3.1.1.3.3. Solução de vitaminas

Biotina	0,2 mg
Ácido <u>p</u> -aminobenzóico	10,0 mg
Aneurina ou Tiamina	50,0 mg
Piridoxina	50,0 mg
Ácido nicótínico	100,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Água destilada	100,0 ml

A solução foi esterilizada em vapor fluente durante três dias consecutivos e guardada em frasco escuro, no refrigerador, sob cloro-fórmio.

3.1.1.3.4. Solução salina

Preparou-se uma solução de cloreto de sódio 0,89%, dissolvendo-se o sal em água destilada. 9,0 ml da solução foram colocados em frascos e autoclavou-se.

3.1.1.3.5. Solução de tween

Adicionou-se tween 80 à água destilada, numa concentração de 0,1% (V/V). Foram colocados 2,5 ml da solução em tubos de ensaio, autoclavou-se e conservou-se em refrigerador.

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

Acetato de amônio	12,0 gramas
KH_2PO_4	3,0 gramas
NaCl	2,0 gramas
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 gramas
FeSO_4	traços
ZnSO_4	traços
Ágar	15,0 gramas
Água destilada	1 litro

3.1.1.3.7. Meio mínimo mais galactose

Foi preparado da mesma forma que o meio mínimo, substituindo-se apenas a glicose por igual quantidade de galactose como fonte de carbono.

Ajustou-se o pH para 6,0 com NaOH 4% ou HCl 1 N.

3.1.1.3.8. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

Adicionou-se ao meio mínimo comum 2% de meio completo, distribuiu-se em tubos com 2,5 ml e conservou-se em refrigerador.

3.1.1.3.9. Solução de p-fluorfenilalanina (pFA)

Preparou-se uma solução de p-fluorfenilalanina a 1%, dissolvendo-se o mesmo em água destilada. Esterilizou-se a solução em banho-ma-

ria durante 15 minutos e conservou-se em refrigerador a 4^oC.

3.1.1.3.10. Suplementos adicionados ao meio completo

Solução estoque (100 ml de H ₂ O)	Quantidade adicionada à 200 ml de meio de cultura		Concent. final no meio de cultura
Ácido nicotínico	0,1 g	1 ml	5 µg/ml
Ácido p-aminobenzóico	140 mg	1 ml	7 µg/ml
Adenina	1,4 g	1 ml	70 µg/ml
Biotina	4 mg	1 ml	0,2µg/ml
Piridoxina	20 mg	1 ml	1 µg/ml
Prolina	1 g	1 ml	50 µg/ml
Riboflavina	0,1 g	1 ml	5 µg/ml
Tiosulfato de sódio	1,0 g	1 ml	50 µg/ml

3.1.1.4. Placas de análise

Para a determinação dos requisitos nutricionais das colônias analisadas, foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo cada uma aproximadamente 20 ml dos seguintes meios: meio completo, meio mínimo, meio mínimo mais todos os requisitos envolvidos no cruzamento e meio mínimo mais todos os requisitos, exceto o que estava sob análise. Foram utilizadas, ainda, placas com meio galactose e com meio acetato mais todos os requisitos.

3.1.2. Métodos

3.1.2.1. Esterilização e temperatura usadas

A esterilização dos meios e soluções foi sempre realizada em autoclave, por 15 minutos, à pressão de 1 atmosfera e à temperatura de 120^o C. Em todos os experimentos, a temperatura de incubação foi de 37^o C.

3.1.2.2. Obtenção dos variantes deteriorados e melhorados

Esses variantes foram obtidos como setores da linhagem A,inc culada no centro de uma placa contendo meio completo. Após 7 dias de incubação, setores foram escolhidos, isolados e purificados.

3.1.2.3. Técnicas de análise

3.1.2.3.1. Obtenção de heterocários

Utilizou-se o mesmo método descrito por *PONTECORVO et alii* (1963). Conídios de ambas as linhagens, que requerem diferentes fatores de crescimento, foram colocados em 2,5 ml de meio mínimo líquido, suplementado com 2% de meio completo líquido, o que permitiu apenas pequena germinação dos conídios. Após 3-4 dias de incubação, formou-se uma película na superfície do meio, a qual, transferida para uma placa contendo meio mínimo, deu origem a setores heterocarióticos que continham núcleos geneticamente diferentes na mesma hifa, o que permitiu o crescimento.

O mesmo procedimento foi realizado com as linhagens MSE e proA1, pabaA6, y.

3.1.2.3.2. Análise mitótica

Esta análise foi realizada através do ciclo parassexual, segundo o método descrito por *ROPER (1952)*.

Após ter-se obtido o heterocário, este foi transferido para meio mínimo, onde houve formação de setores heterocarióticos. A maioria dos conídios formados eram haplóides, os quais não conseguem se desenvolver em meio mínimo. Entretanto, houve formação de conídios diplóides heterozigotos em porcentagem muito baixa, devido à fusão rara de núcleos haplóides, que são capazes de crescer em meio mínimo. Semeando uma suspensão de cerca de 10^7 conídios por ml em meio mínimo, foram obtidas colônias diplóides heterozigotas.

Os diplóides assim obtidos foram induzidos à haploidização pelo método da p-fluorfenilalanina (pFA) (*MORPURGO, 1961; LHOAS, 1961*), que tem a propriedade de inibir o crescimento de setores diplóides, mas que permite o crescimento de setores haplóides que surgem como segregantes. Segundo *KÄFER (1961)*, a haploidização ocorre espontaneamente, através da aneuploidia, com perda sucessiva de cromossomos. A técnica consiste em se adicionar ao meio completo, quantidades variáveis da solução de pFA, dependendo do cruzamento envolvido. No presente trabalho, adicionou-se a 200 ml de meio de cultura, 1,5 ml da solução a 1% de pFA, o que corresponde a 75µg da droga por ml de meio de cultura.

Os conídios diplóides foram inoculados em 4 pontos das placas e, após 8-9 dias de incubação, surgiram setores haplóides. Esses foram purificados em meio completo e, a seguir, transferidos um a um para uma pla

ca com meio completo, de modo a perfazerem 26 colônias, na formação 5 x 5 + + 1 (AZEVEDO, 1966). Essa placa serviu como placa mestra, sendo replicada através de um replicador de níquel-cromo para as placas de análise.

Após 24, 48 e 72 horas de incubação, foram efetuadas as leituras.

3.1.2.3.3. Análise meiótica

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

A análise exige a ocorrência de cleistotécios híbridos contendo ascósporos segregantes, resultantes da meiose de zigotos formados pela cariogamia de núcleos geneticamente diferentes.

Para se obter os cleistotécios, incubou-se a placa de meio mínimo contendo pedaços de heterocário, vedada com fita celulósica, por 9-10 dias, em incubador. Após esse período, os maiores cleistotécios foram isolados (BARACHO et alii, 1970) e rolados em meio mínimo sólido para se retirar os confídios ocasionalmente aderentes, bem como as células de Hülle. A seguir, os cleistotécios foram transferidos com um fio de platina para tubos de ensaio contendo 2,5 ml da solução de tween e foram esmagados contra as paredes dos mesmos. Com as mesmas pipetas utilizadas para o esmagamento dos cleistotécios, as paredes dos tubos foram lavadas, suspendendo-se os ascósporos na solução. Semeou-se 0,1 ml de cada suspensão de ascósporos em placas contendo meio completo, e as soluções restantes foram conservadas em

refrigerador, a 4^oC. As placas foram incubadas em estufa por 2-3 dias, e foi verificado se os cleistotécios eram híbridos. Os não-híbridos foram descartados.

Ascósporos dos cleistotécios híbridos foram semeados em 4-5 placas contendo meio completo. Após 3-4 dias, as colônias segregantes foram contadas.

Preparou-se uma placa mestra com colônias brancas, outra com amarelas e verdes, e duas com deterioradas. Após 3 dias de incubação, as placas mestras foram replicadas para as placas de análise.

Após 24, 48 e 72 horas de incubação, foram feitas as leituras das placas de análise, anotando-se as colônias que cresceram e as que não cresceram.

Através do número de colônias recombinantes calculou-se o valor de ligação entre os locus envolvidos, aplicando-se a seguinte fórmula:

$$C = \frac{R}{T} \times 100$$

onde:

C = valor de ligação;

R = número de colônias recombinantes;

T = número total de colônias analisadas.

O desvio padrão(s) foi calculado, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{p(1-p)}{N}}$$

onde:

p = frequência de recombinantes

N = número total de ascósporos

3.2. Análise Citológica

3.2.1. Material

3.2.1.1. Linhagens utilizadas

- a. Linhagem biA1, meth G1 (haplóide);
- b. Linhagem proA1, pabaA6, y (amarela);
- c. Linhagem A (duplicada);
- d. Linhagem V46 (deteriorada);
- e. Linhagem biA1//MSE (diplóide), resultante do cruzamento entre a biA1 e a MSE.

A linhagem haplóide e a diplóide foram também obtidas da coleção existente no setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" de Piracicaba.

3.2.1.2. Membranas de diálise

Depois de terem sido recortadas em dimensões de 18 mm x 18 mm, as membranas de diálise foram colocadas em uma placa de Petri com cerca de 5 ml de água destilada e a seguir autoclavadas.

3.2.1.3. Tampão-fosfato (*FURTADO, 1968*)

Quando se usava o sal $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 3,73 g deste eram dissolvidas em 1000 ml de água destilada, e 2,4 g de KH_2PO_4 em mais 1000 ml.

A seguir 7 partes da primeira solução eram misturadas a 3 partes da segunda.

Quando o sal era $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, dissolviam-se 2,8 g de Na_2HPO_4 em 1000 ml de água destilada, e 2,4 g de KH_2PO_4 em mais 1000 ml.

Logo após, 7 partes da primeira solução eram misturadas a 3 partes da segunda.

Ao se verificar o pH no pHmetro, os resultados oscilaram em torno de 6,8 a 7,2, que são os valores ideais para a técnica HCl-Giemsa.

Quando não se encontrava em uso, o tampão era guardado em refrigerador.

3.2.1.4. Solução estoque de Giemsa (*FURTADO, 1968*)

Giemsa	3,8 g
metanol	250 ml
glicerina	250 ml

Misturou-se e guardou-se em frasco de boca esmerilhada.

3.2.1.5. Solução de Helly (*ROBINOW e CATEN, 1969*)

Solução a: 3 g de dicromato de potássio e 5 g de cloreto mercúrico foram

dissolvidas em 100 ml de água destilada.

Solução b: formalina neutra

Imediatamente antes do uso, 10 ml da solução a foram misturados a 0,6 ml da solução b.

3.2.1.6. Formalina neutra (GALIGHER e KOZLOFF, 1971)

Colocou-se, em um frasco de 300 ml contendo formalina, uma quantidade de carbonato de cálcio suficiente para formar uma camada de 5 cm. A mistura foi agitada todos os dias, durante 10 dias, quando então se encontrava pronta para uso.

3.2.1.7. Albumina 5% (ROBINOW e CATEN, 1969)

Em uma proveta de 100 ml foram colocados 5 ml de clara de ovo e completou-se até 100 com água destilada. Agitou-se e filtrou-se. Conservou-se em placa de Petri esterilizada, no refrigerador.

3.2.1.8. Fotografias

As lâminas preparadas foram analisadas ao microscópio, selecionando-se as melhores para as fotografias. Estas foram tiradas com o fotomicroscópio Zeiss, com objetiva de 100 vezes e ocular de 8. Utilizou-se filtro verde e filtro amarelo. Para as fotos a cores, o filme utilizado foi Kodak Ektachrome-X asa 64 e para as fotos em preto e branco, o Kodak Tri-X Pan asa 400.

3.2.2. Métodos

3.2.2.1. Cultivo do fungo

3.2.2.1.1. Técnica da membrana de diálise (ROANE, 1952), com ligeira modificação

Com uma pinça, colocou-se uma membrana de diálise sobre uma superfície de meio completo. A seguir, foram feitos 4 inóculos a aproximadamente 1 cm de distância de cada lado da membrana, e incubou-se por 3 dias. Após esse período, o micélio se desenvolveu sobre a membrana.

3.2.2.1.2. Técnica do cultivo em lâmina (AIST e WILSON, 1967) modificada

Para se autoclavar o material a ser usado nesta técnica, colocou-se, dentro de uma placa de Petri, uma folha de papel de filtro, uma lâmina, uma pequena espátula e lamínulas embrulhadas. Em placas de Petri de 1 cm de altura foi colocado meio completo de modo a formar uma fina camada. Colocou-se uma porção quadrangular desse meio sobre a lâmina previamente autoclavada, com o auxílio da espátula. Procedeu-se a dois inóculos nos bordos opostos do meio completo. A seguir, cobriu-se com a lamínula e incubou-se durante 3 dias na placa de Petri revestida de papel umedecido. Após esse período, o micélio desenvolveu-se sobre a lamínula.

3.2.2.2. Técnicas de coloração (com os tempos adaptados ao *A. nidulans*)

3.2.2.2.1. Técnica HCl-Giemsa (FURTADO, 1968), com algumas modificações

Após o cultivo em membrana de diálise, procedeu-se à seguinte coloração:

A. Fixação

A membrana sobre a qual se desenvolveu o micélio foi colocada numa mistura fixadora composta de 6 partes de etanol absoluto, 1 parte de ácido acético glacial e 1 parte de ácido láctico, durante 20 minutos.

B. Hidratação

Em seguida, o material foi passado por uma série de banhos em álcool 95%, álcool 90%, álcool 70%, álcool 50% e álcool 30%, durante 5 minutos cada um. O último banho foi feito em água destilada, por 10 minutos.

C. Hidrólise

Foi feita em HCl 1 N, durante 7 minutos a frio e, subsequentemente, durante 8 minutos a 63°C.

D. Lavagem

O material foi lavado 5 vezes em água destilada, durante 5 minutos cada vez.

E. Tamponamento

A seguir, lavou-se rapidamente em tampão e, em seguida deixou-se em tampão limpo, durante 30 minutos no mínimo.

F. Coloração

Na hora do uso, 10 ml de tampão foram misturados com 1 ml da solução estoque de Giemsa. Deixou-se o material nessa mistura durante o tempo necessário à coloração, que foi de 10 minutos.

G. Montagem

Colocou-se o material fixado e corado numa lâmina com uma gota de tampão, cobriu-se com a lamínula e pressionou-se com papel de filtro para se remover o excesso.

3.2.2.2.2. Técnica HCl-Giemsa (ROBINOW e CATEN, 1969) com algumas modificações

3.2.2.2.2.1. Para conídios

A. Albuminização da lamínula

Colocou-se uma gota de albumina a 5% sobre uma lamínula. Com uma outra lamínula, com uma inclinação de 45^o, distribuiu-se a albumina de modo a formar uma fina película, à semelhança dos esfregaços de sangue. Deixou-se secar por alguns segundos.

B. Coleta de conídios

A lamínula foi colocada diretamente sobre a colônia de fungo, fazendo-se uma leve pressão. Os conídios, então, aderiram à albumina.

C. Fixação

A lamínula, com a porção albuminizada para cima, foi colocada em uma placa de Petri que continha a solução de Helly fixadora. Deixou-se por 15 minutos.

D. Lavagem

Lavou-se em água destilada, até se remover o excesso de fixador. Quando não se queria prosseguir, a lamínula era guardada em álcool a 70%, no refrigerador.

E. Hidrólise

Foi feita em HCl 1 N a 60°C, durante 15 minutos.

F. Lavagem

Lavou-se duas vezes em água de torneira e uma vez em água destilada.

G. Coloração

Na hora do uso, 10 ml de tampão foram misturados a 18 gotas de solução estoque de Giemsa. Deixou-se o material nessa mistura durante uma hora.

H. Montagem

Montou-se com tampão, fazendo-se uma leve pressão para remover o excesso.

I. Diferenciação

Caso os confídios ficassem muito escuros, procedia-se da seguinte maneira:

2 placas de Petri eram colocadas próximas ao microscópio. Em seguida, colocava-se o tampão em uma das placas, e em outra, 30 ml de água destilada. Para acidular esta última, 2 alças de platina cheias de ácido acético glacial foram suficientes. Para se remover o corante, colocava-se a lâmina por 5 segundos na placa de Petri, com água acidulada. Fazia-se o tamponamento, colocando-se rapidamente a lâmina na placa com tampão, e montava-se em tampão novo. Repetia-se a operação, caso necessário.

3.2.2.2.2. Para hifas e conídios

Após o cultivo em membrana de diálise, procedeu-se à seguinte coloração:

A. *Fixação*

Foi feita na solução fixadora de Helly por 15 minutos.

B. *Lavagem*

Lavou-se várias vezes em álcool a 70%.

C. *Hidrólise*

Foi feita durante 15 minutos a 60°C.

D. *Lavagem*

Lavou-se 2 vezes em água de torneira e uma vez em água destilada.

E. *Coloração*

Na hora do uso, 10 ml de tampão foram misturados a 18 gotas de solução estoque de Giemsa e deixou-se o material por uma hora nessa mistura.

F. Montagem

Montou-se com tampão, fazendo-se pressão para remover o excesso.

As lâminas preparadas em todas as técnicas foram examinadas no mesmo dia. Quando isso não podia ser feito, elas foram guardadas em câmara úmida, no refrigerador.

3.2.2.3. Medidas

As medidas foram obtidas usando-se a objetiva de cem vezes e a ocular de oito. O negativo foi ampliado quatro vezes. Sob uma lupa, com uma régua comum, com frações de mm, foram medidos os diâmetros de cinquenta células e de seus respectivos núcleos. Foram feitas medições de dois diâmetros perpendiculares entre si, calculando-se em seguida o diâmetro médio de cada medida. Procedeu-se à análise estatística das médias dos diâmetros dos núcleos e das células das diferentes linhagens. A partir dos mesmos calculou-se o diâmetro modal, segundo *SPIEGEL (1970)*. A partir desse diâmetro calculou-se diretamente o volume modal.

Os histogramas e polígonos de frequência foram feitos colocando-se, no eixo horizontal, os diâmetros dos núcleos e, no vertical, a frequência deles. Os histogramas foram reduzidos a 1/4 do tamanho original e os polígonos de frequência das diferentes linhagens (Figura 13), a 2/3.

Os gráficos da relação núcleo-citoplasma foram feitos colocando-se na abcissa os valores dos diâmetros dos núcleos. Como, para cada medida do núcleo, várias foram as medidas das células, foram colocadas, na

ordenada, as médias dessas medidas.

Em ambos os casos, utilizou-se das medidas obtidas nas fotografias, correspondendo cada milímetro a 0,3125 micra.

4. RESULTADOS

4.1. Análise genética

4.1.1. Isolamento da linhagem amarela proA1, pabaA6, y

A partir da linhagem duplicada A (Figura 3), isolou-se a linhagem melhorada amarela proA1, pabaA6, y (Figura 4).

4.1.2. Análise mitótica

Após ter-se obtido o diplóide, procedeu-se à haploidização, pelo método do pFA. O resultado é mostrado na Tabela 1, onde se observam setores brancos e amarelos.

Os setores brancos e amarelos foram analisados quanto à sua ploidia, usando-se uma ocular micrométrica.

O diplóide, inoculado em 5 placas, em meio sem pFA, não produziu setores evidentes.

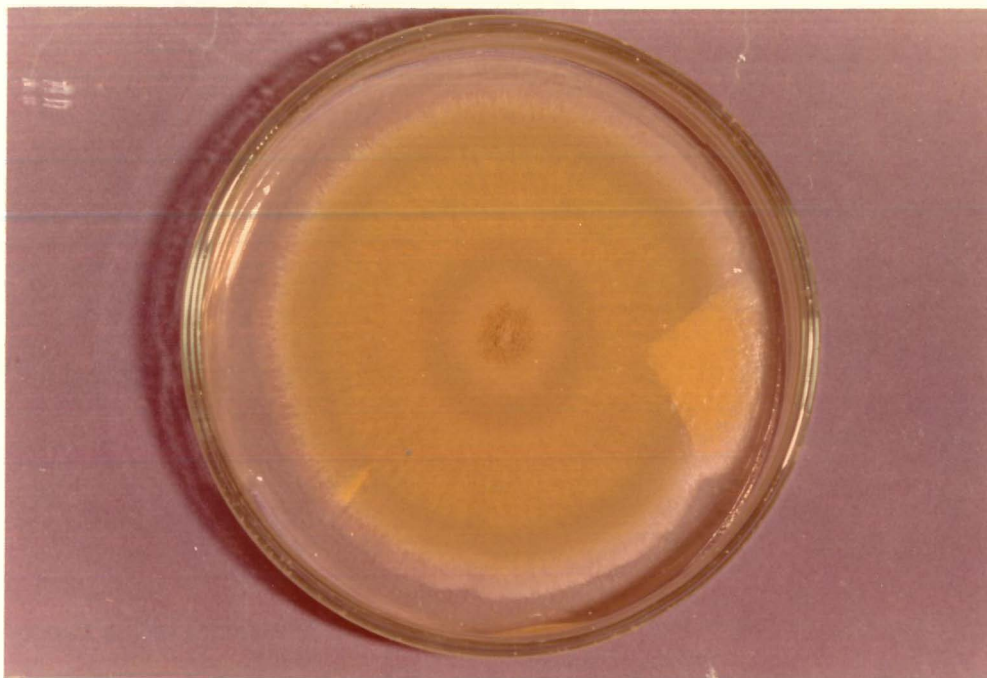


Figura 3. Linhagem duplicada A de *A.nidulans* com setor melhorado.

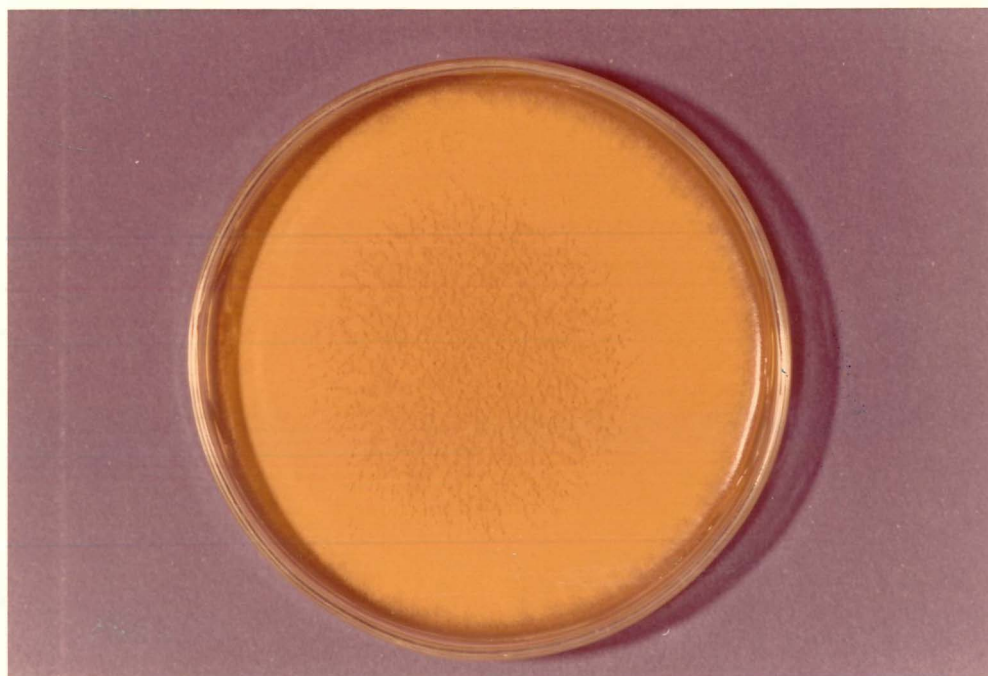


Figura 4. Linhagem melhorada amarela proA1, pabaA6, y, isolada e purificada a partir da linhagem A.

Tabela 1. Tipos e números de setores obtidos a partir do diplóide proA1, pabaA6, y // MSE, inoculado em meio completo com pFA, na concentração de 75 µg/ml.

Placas	Setores	
	brancos	amarelos
I	1	0
II	2	1
III	1	0
IV	2	2
V	1	1
Total V	7	4

A Figura 5 mostra uma das placas do diplóide proA1, pabaA6, y // MSE em meio com pFA, exibindo **setores**.

4.1.3. Análise meiótica

O resultado da análise meiótica (Tabela 2) mostra que os segregantes haplóides que surgiram numa amostra de 258 colônias são brancos e amarelos.



Figura 5. Setores ocorrendo na linhagem diplóide proA1, pabaA6, y // MSE, desenvolvida em meio completo adicionado de 75 $\mu\text{g/ml}$ de pFA.

Tabela 2. Resultado da segregação meiótica do diplóide proA1, pabaA6, y // MSE.

C o l ô n i a s	
brancas	amarelas
119	139

$\chi^2 = 1,54$ n.s. para uma segregação 1 branco:1 amarelo.

A Figura 6 mostra uma das placas obtidas.

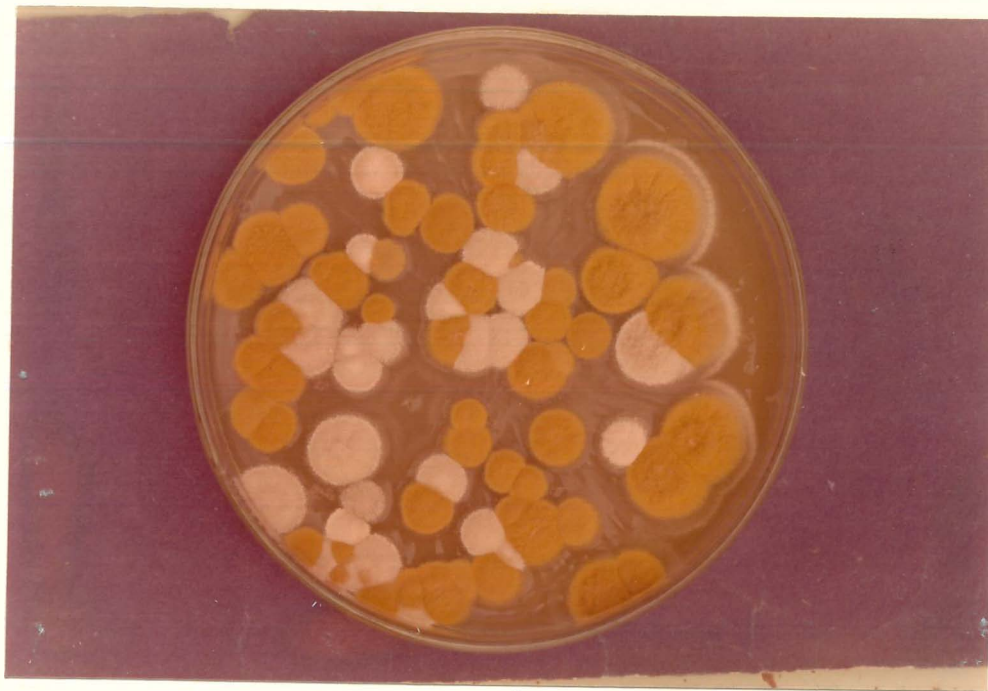


Figura 6. Segregantes meióticos do cruzamento entre proA1, pabaA6, y x MSE.

4.1.4. Isolamento da linhagem deteriorada V46

A Figura 7 mostra o variante deteriorado, obtido a partir da linhagem A.

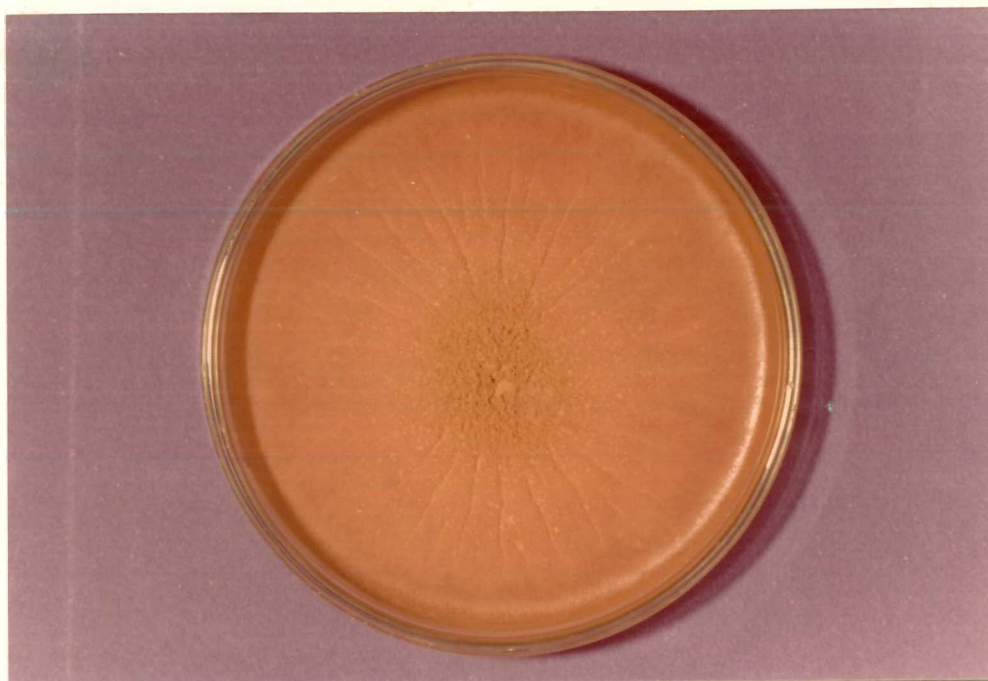


Figura 7. Linhagem deteriorada V46, isolada e purificada a partir da linhagem A.

4.1.5. Análise mitótica

O resultado da análise mitótica é encontrado na Tabela 3.

Tabela 3. Análise mitótica da linhagem V46 // MSE.

V46 // MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		deteriorados	não deteriorados
I	<u>proA1</u> ⁺ , <u>pabaA6</u> ⁺	0	15
	<u>proA1</u> , <u>pabaA6</u>	0	0
II	<u>wA3</u> ⁺	0	5
	<u>wA3</u>	0	10
III	<u>galA1</u> ⁺	0	6
	<u>galA1</u>	0	9
IV	<u>pyroA4</u> ⁺	0	11
	<u>pyroA4</u>	0	4
V	<u>facA303</u> ⁺	0	6
	<u>facA303</u>	0	9
VI	<u>sB3</u> ⁺	0	7
	<u>sB3</u>	0	8
VII	<u>nicB8</u> ⁺	0	6
	<u>nicB8</u>	0	9
VIII	<u>riboB2</u> ⁺	0	5
	<u>riboB2</u>	0	10

Observando-se a Tabela 3, pode-se concluir que o determinante do fenótipo deteriorado (V46) localiza-se no grupo de ligação I, pois to

dos os setores não-deteriorados foram proA1⁺, pabaA6⁺. A análise meiótica confirmará o resultado anterior, mostrando a ligação com os marcadores proA1 e pabaA6.

4.1.6. Análise meiótica

A Tabela 4 mostra o resultado do cruzamento das linhagens V46 x MSE.

Tabela 4. V46 x MSE: segregação meiótica

Genótipo		nº de colônias
normais	branco	162
	amarelo	77
	verde	60
deteriorados		283
Total		582

$\chi^2 = 0,44$ n.s. para segregação 1 normal : 1 deteriorado

A Figura 8 mostra os segregantes meióticos do cruzamento entre V46 x MSE.



Figura 8. Segregantes meióticos do cruzamento entre V46 x MSE.

4.1.6.1. Mapeamento do determinante de deterioração

Os segregantes meióticos, resultantes do cruzamento V46 x MSE, foram analisados quanto aos requisitos nutricionais prolina e ácido p-aminobenzóico. Os resultados dessa análise se encontram na Tabela 5.

A Figura 9 mostra o mapa genético que pode tentativamente ser construído.

Tabela 5. Análise dos segregantes meióticos quanto aos requisitos nutricionais prolina e ácido p-aminobenzóico e quanto à morfologia.

Marcadores genéticos			nº de segregantes
<u>v46</u>	<u>proA1</u>	<u>pabaA6</u>	
+	+	+	56
-	-	-	42
+	-	-	30
-	+	+	46
+	+	-	3
-	-	+	3
+	-	+	0
-	+	-	0
Total			180

$$\text{Valor de C } \underline{\text{proA1-v46}} = \frac{76}{180} \times 100 = 42,2\% \pm 3,6$$

$$\text{Valor de C } \underline{\text{proA1-pabaA6}} = \frac{6}{180} \times 100 = 3,3\% \pm 1,2$$

$$\text{Valor de C } \underline{\text{pabaA6-v46}} = \frac{82}{180} \times 100 = 45,5\% \pm 3,7$$

Grupo de Ligação

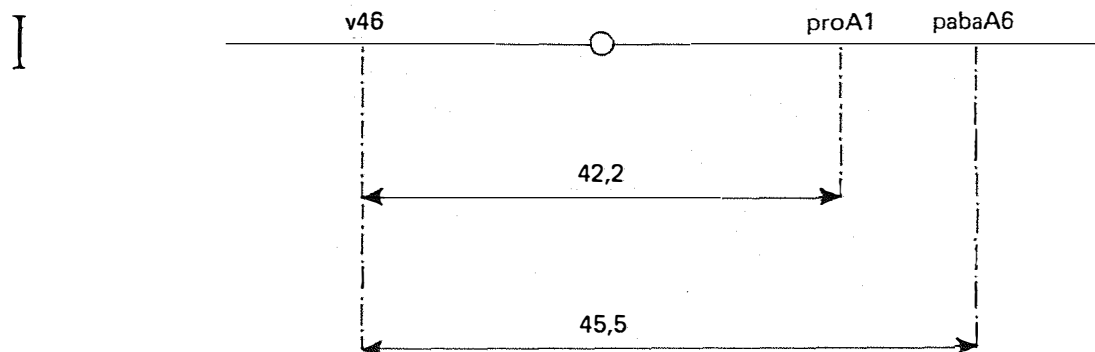


Figura 9. Mapa genético indicando as posições relativas dos marcadores proA1, pabaA6 e do determinante de deterioração v46.

Observações:

1. O centrômero está representado por 0.
2. As distâncias não estão em escala no mapa.

4.2. Análise Citológica

4.2.1. Preparo de lâminas

As lâminas foram preparadas segundo as técnicas descritas nos itens 3.2.2.2.1., 3.2.2.2.2.1. e 3.2.2.2.2.2..

O resultado obtido com a técnica 3.2.2.2.1. encontra-se na Figura 10.

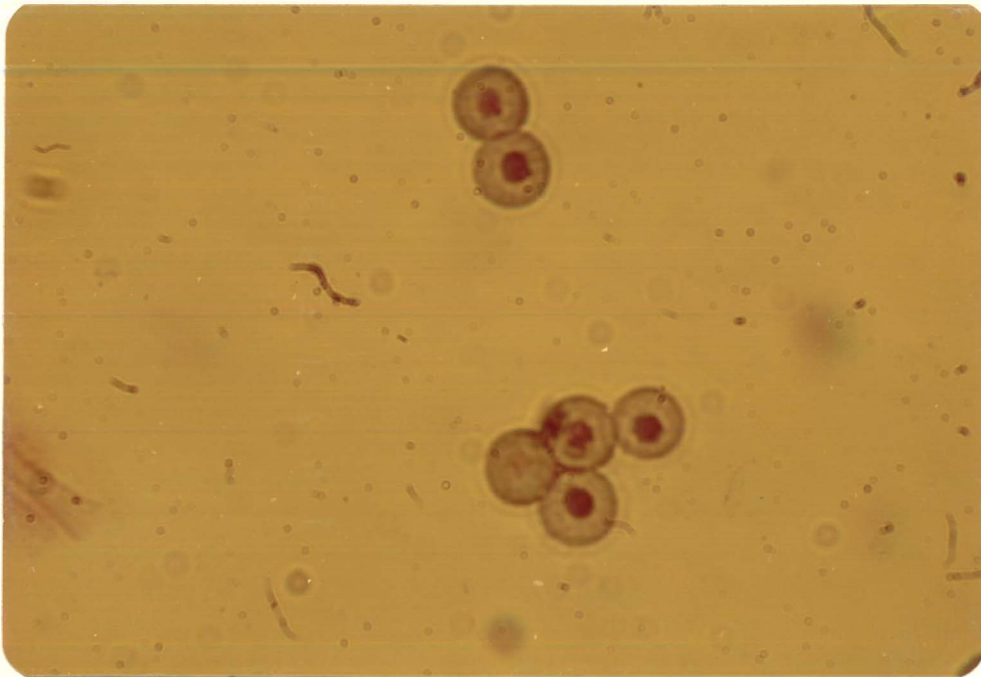


Figura 10. Confídios da linhagem diplóide biA1/MSE, corados segundo a técnica HCl-Giemsa. Filtros verde e amarelo, Ampliação de 3.200 vezes.

4.2.2. Medidas obtidas

As médias aritméticas dos diâmetros dos núcleos e das células das diferentes linhagens estão expressas na Tabela 6.

A partir desses diâmetros, foram achados os volumes modais, que estão indicados na Tabela 7.

Tabela 6. Médias dos diâmetros dos núcleos e das células das diferentes linhagens.

Linhagens	ϕ (\bar{X}) em micra	
	célula	núcleo
Haplóide	2,7031	0,9562
Amarela	2,6375	0,9593
Duplicada	2,9531	1,0718
Deteriorada	2,9687	1,0843
Diplóide	3,2937	1,2187

Tabela 7. Valores dos volumes modais dos núcleos e das células das diferentes linhagens.

Linhagens	Volumes modais em micra	
	célula	núcleo
Haplóide	11,0357	0,4691
Amarela	10,9024	0,4407
Duplicada	13,2141	0,6588
Deteriorada	15,6389	0,6511
Diplóide	19,8506	1,0513

Foi feito o teste F para se verificar se havia diferenças significativas entre as médias dos diferentes tratamentos. Os resultados, que se encontram nas Tabelas A-1 e A-3 do apêndice, apontam significância ao nível de 5% tanto para o núcleo quanto para a célula. Aplicando-se às medidas dos núcleos o teste de Tukey, cujos resultados estão na Tabela A-2 do apêndice, verificou-se significância ao nível de 5% entre os seguintes pares de linhagens: haplóide e duplicada, haplóide e deteriorada, amarela e duplicada, amarela e deteriorada. A diplóide apresentou diferenças significativas em relação a todas as linhagens. Aplicando-se às medidas das células o teste de Tukey, cujos resultados se encontram na Tabela A-4 do apêndice, verificou-se significância ao nível de 5% entre os seguintes pares de linhagens: haplóide e duplicada, haplóide e deteriorada, amarela e duplicada, amarela e deteriorada. A diplóide apresentou diferenças significativas em relação a todas as linhagens.

4.2.3. Número de núcleos nas diferentes linhagens

Nas diferentes linhagens observou-se um número variável de núcleos, o que está representado na Tabela 8.

Tabela 8. Frequência do número de núcleos nas diferentes linhagens.

Linhagens	nº de núcleos			número de confídios analisados
	1	2	3	
Haplóide	99,93	0,07	0,00	5 747
Amarela	99,83	0,17	0,00	6 447
Duplicada	99,73	0,27	0,03	6 243
Deteriorada	99,18	0,82	0,08	5 566
Diplóide	99,83	0,17	0,00	5 086

4.2.4. Histogramas e polígonos de frequência

A partir das medidas dos diâmetros dos núcleos (Tabela A-5, apêndice), foram construídos os histogramas e polígonos de frequência das diferentes linhagens, os quais estão representados nas Figuras 11, 12 e 13.

4.2.5. Relação núcleo-citoplasma

Com as diferentes medidas dos diâmetros dos núcleos e das células (Tabela A-5), estabeleceu-se a relação entre eles, o que pode ser observado na Figura 14.

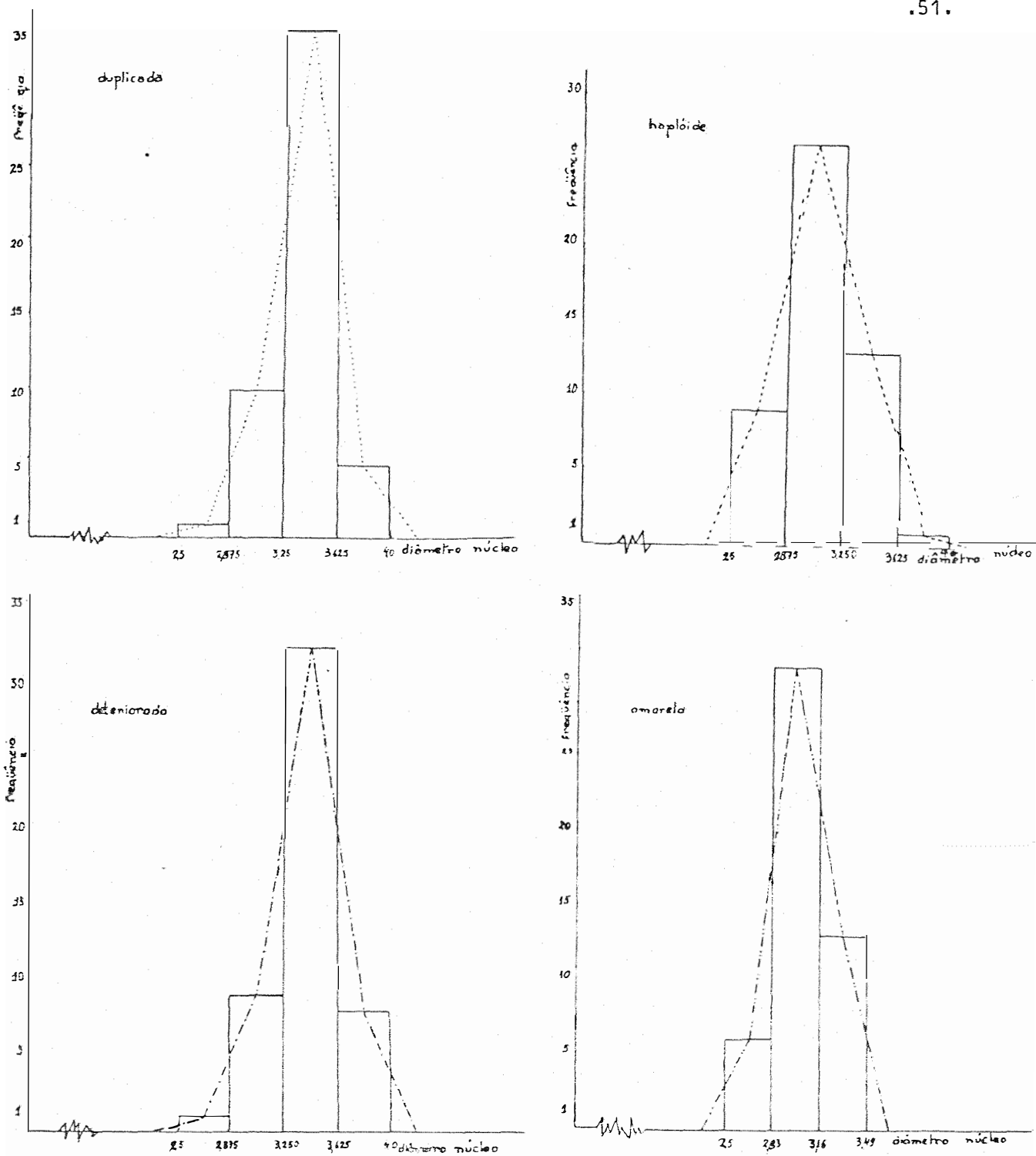


Figura 11. Histogramas e polígonos de frequência representativos das frequências dos diâmetros dos núcleos de quatro linhagens de *A. nidulans*.

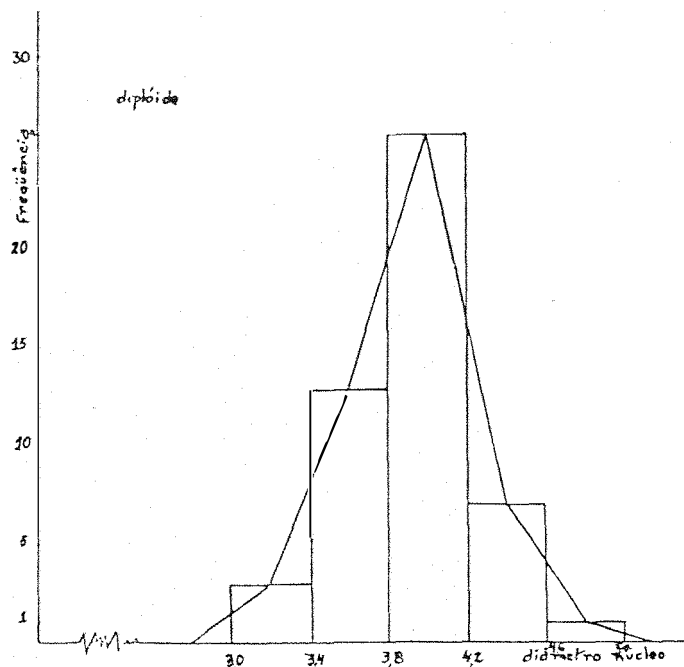


Figura 12. Histograma e polígono de frequência representativos das frequências dos diâmetros dos núcleos da linhagem diplóide.

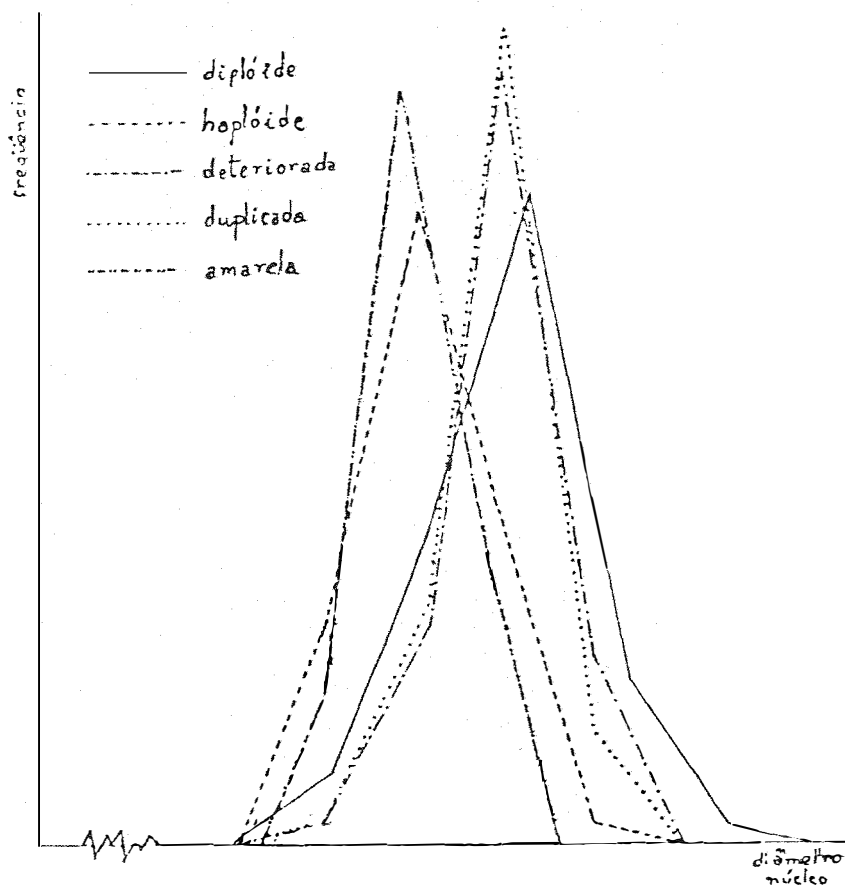


Figura 13. Polígonos de frequência das diferentes linhagens de *A. nidulans*

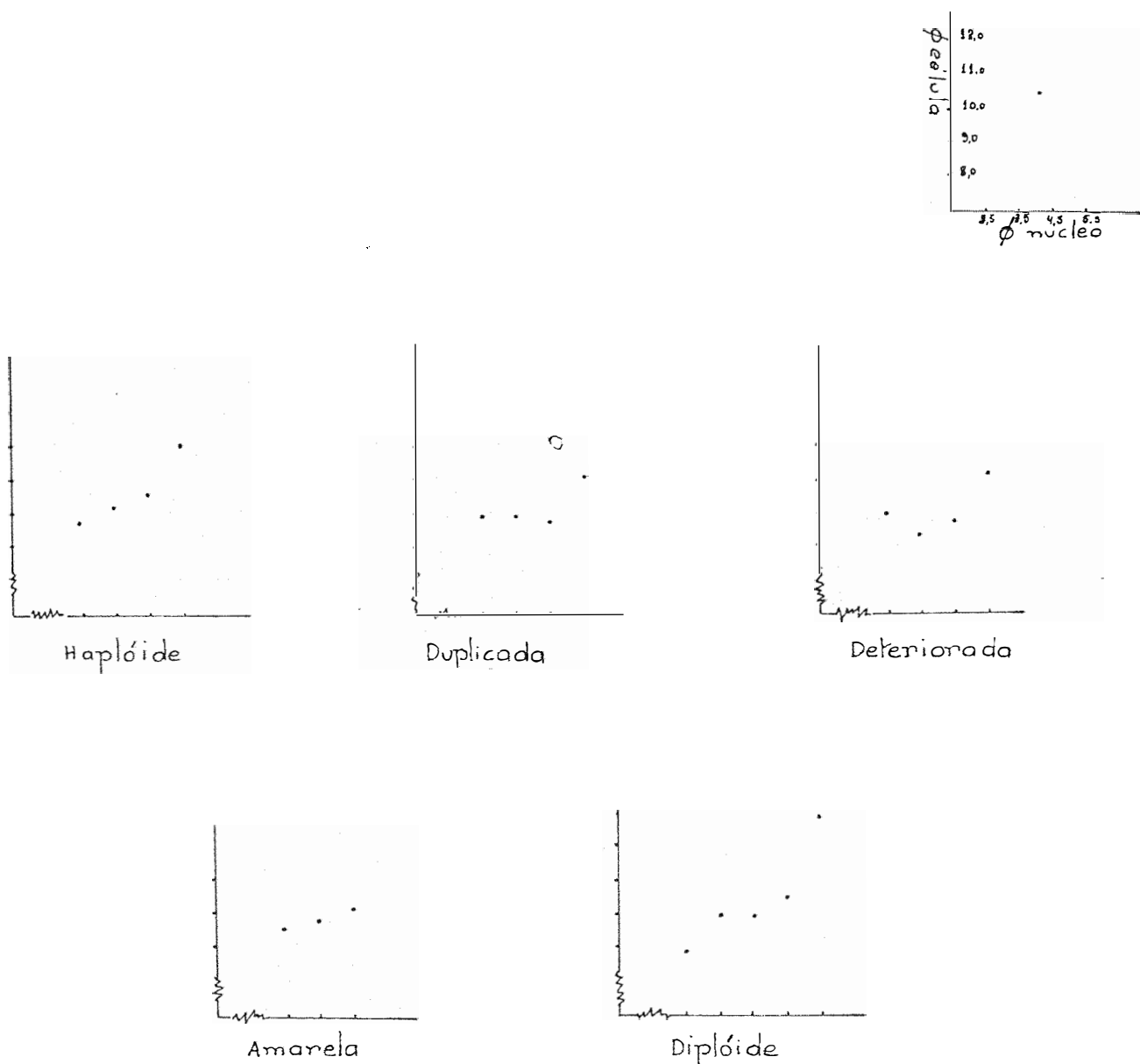


Figura 14. Relação núcleo-citoplasma das diferentes linhagens de *A. nidulans*.

5. DISCUSSÃO

5.1. Análise citológica

5.1.1. Justificativa do método e do material usado

No ciclo juvenil do *A. nidulans*, descrito por WEIJER E WEISBERG (1966), os núcleos somáticos apresentam uma grande irregularidade de forma: filamentososa, em crescente, em ferradura e anelado. Já no ciclo de maturação, descrito pelos mesmos autores, os núcleos são mais esféricos, apesar de apresentarem, com frequência, a forma filamentososa. Esta situação não é exclusiva do *A. nidulans*, pois WEIJER et alii (1965) descreveram uma situação semelhante em *Neurospora crassa*. NAMBOODIRI e LOWRY (1967), em estudos realizados nesse fungo, chegaram a admitir que os núcleos esféricos e alongados, comumente encontrados nele, são, na realidade, tipos diferentes que coexistem, sofrendo divisões independentemente um do outro, embora paralelamente, e não como propuseram DOWDING e WEIJER (1962), segundo os quais esses núcleos seriam configurações diferentes um do outro, durante o ciclo

mitótico. Por outro lado, *CARR e OLIVE (1958)* consideraram que esses núcleos alongados são apenas formas migratórias.

Considerando esse polimorfismo nuclear somático do *A. nidulans*, assim como de outros fungos, e a dificuldade em interpretá-lo, a escolha do material a ser medido recaiu sobre os conídios, pois eles, além de apresentarem núcleos esféricos (*WEIJER e WEISBERG, 1966*), estão no estado interfásico (*HEAGY e ROPER, 1952*).

Uma vez escolhido o material a ser medido, restava verificar qual método de cultivo daria melhores resultados.

Revedo a literatura, verificou-se que *AIST e WILSON (1965)*, em estudos realizados no fungo *Ceratocystis fagacearum*, preconizaram a técnica de cultivo em lâmina, justificando a escolha no fato de a mesma evitar distorções das hifas. Por outro lado, *FINLEY (1970)* considerou que a técnica da membrana de diálise é superior à do cultivo em lâmina, pelo fato de as hifas e os conídios não serem lavados durante a fixação e a coloração.

Em face do exposto, foram ensaiadas as duas técnicas, com as devidas modificações, acabando-se por optar pela da membrana de diálise, pela mesma razão de *FINLEY (1970)*.

Como essa técnica permite a obtenção de hifas e conídios e como seria melhor se obter apenas conídios, pois estes foram o material de escolha, optou-se posteriormente pela que foi descrita por *ROBINOW e CATEN (1969)*, que apresenta essa vantagem. Entretanto ela é demorada (130 minutos aproximadamente), além de ser onerosa, pois exige centrifugador. Visando, pois, à economia de tempo e de material, modificou-se a técnica origi-

nal, reduzindo-se o tempo para 90 minutos aproximadamente e dispensando-se o centrífugador.

Para a coloração, o método de Feulgen e o do HCl-Giemsa têm sido utilizados isoladamente ou conjuntamente, para a carilogia dos fungos, por uma série de autores (BAKERSPIGEL, 1959; AIST e WILSON, 1967; ROBINOW e CATEN, 1969; AIST e WILSON, 1965). Já a técnica da orceína é usada com menor frequência (SOMERS *et alii*, 1960; ROBINOW e CATEN, 1969) assim como a da hematoxilina (BAKERSPIGEL, 1959; McNITT, 1973; ROBINOW, 1963). Com menor frequência ainda encontra-se a do cristal violeta (WEIJER *et alii*, 1965). Especificamente para o *A.nidulans*, AIST e WILSON (1965) utilizaram os métodos do HCl-Giemsa e de Feulgen; WEIJER e WEISBERG (1966), apenas o de Feulgen; enquanto que ROBINOW e CATEN (1969) usaram o HCl-Giemsa, o Feulgen e o da orceína.

Diante do exposto, procurou-se dentre as três técnicas já consagradas pelo uso, a que mais se adequasse a condições de *A.nidulans*. A da orceína, preconizada por ROBINOW e CATEN (1969), não forneceu resultados satisfatórios, devido provavelmente à procedência da orceína utilizada, como muito bem afirma MORRIS (1976), ao analisar mutantes mitóticos de *A.nidulans* com esta técnica.

Quanto aos métodos Feulgen e HCl-Giemsa, resultados mais satisfatórios foram obtidos com o último. A objeção levantada por ROBINOW e CATEN (1969) quanto a seu uso - a coloração intensa dos elementos cromatínicos - não trouxe maiores preocupações, visto que a intenção era corar núcleos de condições, que são interfásicos. Aliás, esse fato constituiu-se até mesmo em uma vantagem, pois a intensa coloração do Giemsa acentua o con

traste nas fotografias, o que já foi mencionado por *AIST e WILSON (1967)*.

O resultado razoavelmente satisfatório obtido com a técnica HCl-Giemsa, que foi descrita no item 3.2.2.2.1., pode ser visto na Figura 10, onde se observa nitidamente o contorno dos núcleos, o que possibilita sua medida. Pode-se verificar, além disso, que os núcleos se apresentam picnóticos e fortemente corados. O grânulo extracromossômico de 0,2 micra, descrito por *WEIJER e WEISBERG (1966)*, não foi observado, provavelmente devido ao fato das colorações serem diferentes.

Por outro lado, nem todas as técnicas HCl-Giemsa forneceram resultados igualmente satisfatórios para conídios. Assim, a que foi descrita no item 3.2.2.2.1. deu bons resultados para os núcleos hifais, mas menos satisfatórios para os dos conídios.

5.1.2. Verificação das hipóteses genéticas

Segundo *NGA e ROPER (1968)*, *AZEVEDO e ROPER (1970)* e *AZEVEDO (1971)*, a duplicação cromossômica é a responsável pela instabilidade mitótica. Ora, a linhagem A, estudada inicialmente por *NGA e ROPER (1968)* e utilizada neste trabalho, na análise citológica, é instável, produzindo setores, o que é mostrado pela Figura 3.

Para se ensaiar então a hipótese de que essa linhagem é portadora de uma duplicação cromossômica, utilizou-se a haplóide como controle. Comparando-se, entretanto, o diâmetro médio dos núcleos da haplóide, obtido no presente trabalho, aos resultados de *WEIJER e WEISBERG (1966)*, verificou-se uma pequena discrepância, que pode ser explicada pelo fato das colora-

ções serem diferentes. Assim, procurou-se inicialmente verificar se o diâmetro dos núcleos da linhagem haplóide diferia do diâmetro dos núcleos da linhagem A. O resultado obtido se encontra na Tabela 6 e mostra que as médias dos núcleos das duas linhagens são diferentes (Tabela A-2).

Esse fato dá evidência de que existe material adicional, na linhagem A e que o mesmo deve ser razoavelmente grande para poder ser detectado pelo método usado. Portanto, se de fato houve a translocação, como afirma a hipótese genética, o segmento translocado deve ser substancialmente grande.

Ainda segundo *NGA e ROPER (1968)*, os setores melhorados surgiram devido a perdas, em tamanhos variados, do segmento adicional. Assim, se de fato houve a perda do material genético, a linhagem proA1, pabaA6, y deverá ter o diâmetro médio de seus núcleos igual ou superior ao da linhagem controle, dependendo do segmento perdido. O exame das Tabelas 6 e A-2 mostra que, de fato, eles são iguais entre si e diferentes do da linhagem A, sugerindo com isso que a amarela deve ter surgido da A por perda de material. Além do mais, pelo exame dos polígonos da frequência observados na Figura 13 e pela relação núcleo-citoplasma observada na Figura 14, as duas linhagens, biA1, methG1 e proA1, pabaA6, y, são semelhantes entre si e diferentes da A.

NGA e ROPER (1968), *NGA e ROPER (1969)*, *AZEVEDO e ROPER (1970)*, *AZEVEDO (1971)*, *ROSATO (1973)* e *MENEZES (1974)* verificaram que a produção de setores deteriorados era característica das linhagens duplicadas. Mais ainda, *NGA e ROPER (1968)* sugeriram que as novas duplicações em tandem que ocorrem no segmento duplicado seriam responsáveis pelo aparecimento desses setores. Sendo assim, é de se esperar que o diâmetro médio dos núcleos

da linhagem deteriorada seja maior que o do controle haplóide e igual ou superior ao da linhagem A, dependendo do tamanho da duplicação em tandem. O exame das Tabelas 6 e A-2 indica que, de fato, o diâmetro dos núcleos do variante V46 é maior que o da linhagem haplóide, não diferindo, porém, do da linhagem A. O exame da Figura 13, por outro lado, mostra o comportamento i dêntico das curvas do variante V46 e da linhagem A, assim como a relação núcleo-citoplasma (Figura 14), corroborando a hipótese de que as duas devem ser duplicadas. Se, porém, os deteriorados, quando comparados à linhagem duplicada que lhes deu origem, apresentam mais material genético decorrente da duplicação em tandem (*NGA e ROPER, 1968*) ou de um outro mecanismo, é um ponto que não pode ser esclarecido pela técnica utilizada. Assim, novas pesquisas deverão ser conduzidas, usando-se técnicas mais refinadas, como as citofotométricas, no sentido de se verificar a validade da hipótese de *NGA e ROPER (1968)*.

Por outro lado, se houve diferenças significativas entre a linhagem haplóide e uma outra portadora, presumivelmente, de um segmento cromossômico translocado, maior razão ainda existe para que o controle difirra da linhagem diplóide, que tem o dobro do genoma. E é o que realmente ocorre, conforme se verifica na Tabela 6 e A-2.

5.1.3. O volume modal

Nas preparações feitas segundo as técnicas descritas nos itens 3.2.2.2.1. e 3.2.2.2.2., pode-se observar o crescimento dos confidios a partir de sua origem, nos esterigmas secundários. Se existe crescimento entre eles, os núcleos observados e medidos devem representar fases

diferentes desse crescimento e não apenas uma variabilidade flutuante casual. Era de se esperar, portanto, que as curvas e os histogramas construídos com os diâmetros não fossem normais, pois as amostras eram de uma população em crescimento. No entanto, o exame das Figuras 11, 12 e 13 mostra uma simetria razoável nos diferentes polígonos de freqüência e histogramas. Uma explicação plausível para esse fato é que os indivíduos analisados se encontrariam numa fase semelhante de desenvolvimento. Realmente, o método utilizado para a coloração dos conídios, que foi descrito no item 3.2.2.2 . 2.1., permite coletar conídios que estão possivelmente numa mesma fase de desenvolvimento, pois, ao se colocar a lamínula sobre a colônia do fungo, apenas os conídios das camadas mais superficiais é que são coletados, o que também explicaria a pequena variação das medidas. Assim, se as populações estão em ativo crescimento, torna-se necessário comparar seus valores modais, se se pretende examiná-las numa mesma fase do período interfásico - (SCHREIBER, 1946, 1950, 1951). Em outras palavras, os valores modais dos volumes dos núcleos das diferentes linhagens representam os volumes dos núcleos que se encontram em fases homólogas de crescimento e, portanto, perfeitamente confrontáveis (Tabela 7). Logo, as diferenças volumétricas observadas decorrerão apenas das variações quantitativas do genoma (SCHREIBER, 1946, 1950, 1951).

Com base no que foi afirmado no parágrafo anterior, pode-se tentativamente estimar o quanto do genoma total é representado pelo material genético adicional da linhagem A. Se o volume nuclear é proporcional ao genoma, pode-se estabelecer a seguinte regra de três: se 0,4691 representa 100%, 0,1897 (a diferença entre os volumes modais da duplicada e da haplóide) deverá ser X, que é igual a 40% aproximadamente, que é um valor

elevado. Considerando-se que o grupo de ligação I é o maior deles (*ELLIOTT, 1960*), poder-se-ia admitir, pelo resultado obtido, que o segmento translocado deve representar uma parcela considerável do cromossomo. Há também a possibilidade de outros fatores estarem interferindo nos resultados, tais como outros componentes macromoleculares do núcleo ou ainda as manipulações citológicas.

Pesquisas deverão ser conduzidas com outras linhagens duplicadas, como por exemplo, com a linhagem em que o grupo de ligação VIII apresenta um segmento adicional translocado do grupo de ligação III, no sentido de se verificar o quanto esse segmento representa do genoma e, conseqüentemente, ensaiar a hipótese proposta neste trabalho.

Ainda quanto aos histogramas (Figuras 11 e 12), pode-se notar maior variabilidade de medidas para a linhagem diplóide, o que pode ser explicado por ser o crescimento interfásico mais evidente, pois o diplóide é a linhagem maior, além de as alterações fazerem-se sentir mais, devido às manipulações citológicas.

5.1.4. Número de núcleos

Apesar de o confídio de *A. nidulans* ser uninucleado (*YUILL, 1950*), as diferentes linhagens exibem, com freqüências variáveis, dois ou três núcleos (Tabela 8). A existência de três núcleos somente nas linhagens duplicadas e deterioradas sugere que a origem da mesma pode estar relacionada ao não-balanceamento. A freqüência maior na deteriorada pode muito bem ser devida à existência de um outro fator, além da duplicação cromossô-

mica, que esteja intervindo na não-conformidade mitótica.

5.1.5. Relação núcleo-citoplasma

Em conídios uninucleados, diferentemente do que ocorre nos multinucleados, a relação núcleo-citoplasma é mantida pelo aumento do citoplasma e, conseqüentemente, do tamanho do conídio (ISHITANI *et alii*, 1956; CLUTTERBUCK, 1969). Isso, de fato, pode ser razoavelmente observado na Figura 14. Pode-se, entretanto, notar que as linhagens não-balanceadas, como a deteriorada e a duplicada, exibem maior irregularidade, refletindo, aparentemente, o não-balanceamento cromossômico das mesmas.

Em relação às células (Tabela 6), notou-se que os diâmetros das mesmas sofrem variações proporcionais aos seus genomas, à semelhança do que acontece com os núcleos, de tal maneira que o volume do conídio do diplóide é o dobro do volume do conídio do haplóide (Tabela 7), fato esse que também está de acordo com as observações pioneiras de HEAGY e ROPER (1952).

5.2. Análise genética

5.2.1. Linhagem proA1, pabaA6, y

Segundo NGA e ROPER (1968), o não-balanceamento da linhagem A decorreria do segmento translocado que ela apresenta. Ainda segundo os mesmos autores, linhagens do tipo da descrita no presente trabalho (proA1, pabaA6, y) seriam originadas da A por perda, em tamanhos variados, do referido segmento.

No intuito de se verificar o mecanismo de origem da linhagem proA1,pabaA6,y, e, conseqüentemente, ensaiar a hipótese de *NGA e ROPER*, foram formuladas duas outras. Para sua verificação, procedeu-se ao cruzamento, confrontando-se os resultados obtidos com os teoricamente esperados. O cruzamento controle foi feito com a linhagem A e seus resultados são encontrados em *AZEVEDO (1971)*.

1a. hipótese: perda parcial do segmento translocado.

Se ocorresse a perda parcial do segmento, isso envolveria, evidentemente, um ou mais marcos genéticos. Admita-se que a linhagem A tenha perdido um segmento que envolvesse o marco genético yA² do segmento translocado (Figura 1). Ao ser formado na análise mitótica, o diplóide, cuja constituição cromossômica está representada na Figura 15, e em seguida haploidizado em meio com pFA, os segregantes haplóides deveriam ser 100% brancos, porque haveria uma seleção contra aqueles ainda portadores de duplicação, pois o pFA inibe o crescimento de setores duplicados (*AZEVEDO, 1971*). Esse não foi, entretanto, o resultado obtido (Tabela 1 e Figura 5).

2a. hipótese: perda total do segmento translocado.

De acordo com a segunda hipótese, todo segmento translocado seria perdido, de modo que os segregantes haplóides, que surgem do diplóide após a haploidização do mesmo, deveriam ser brancos e amarelos numa proporção de 1:1. De fato, foram esses os resultados obtidos (Tabela 1 e Figura 5).

A análise meiótica confirma os resultados da análise mitótica (Tabela 2).

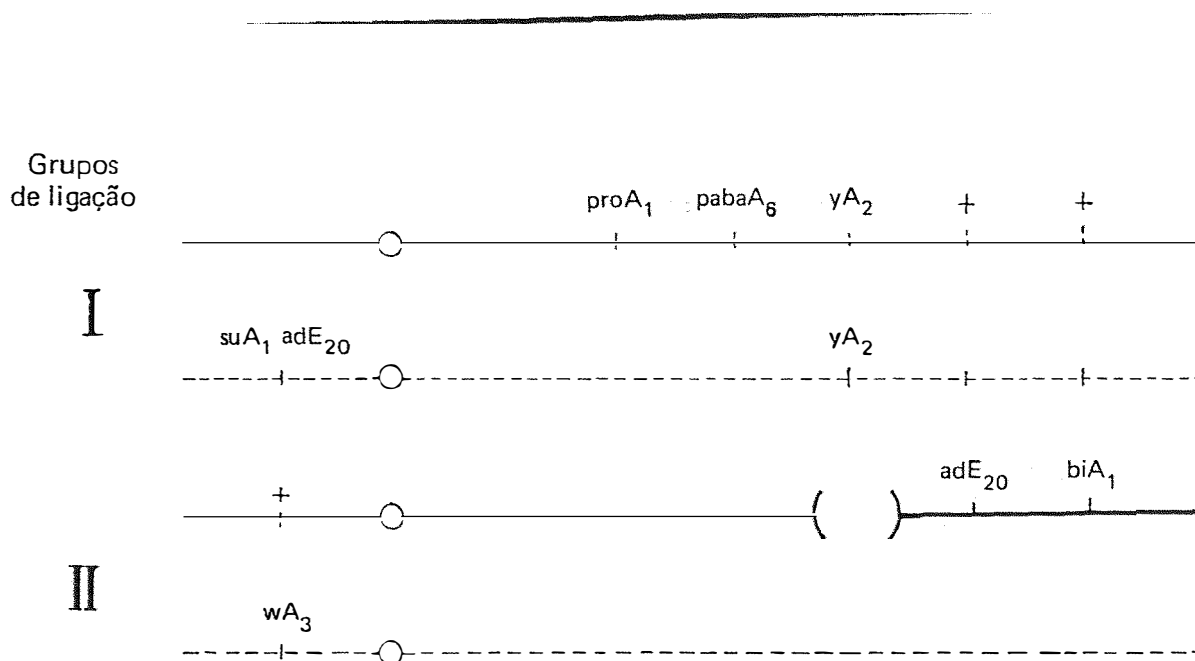


Figura 15. Constituição cromossômica do diplóide obtido pelo cruzamento proA1, pabaA6, y // MSE, considerando apenas dois grupos de ligação.

Observação:

1. Os centrômeros estão representados por 0.
2. — grupo de ligação da linhagem proA1, pabaA6, y.
3. - - - - grupo de ligação da linhagem MSE.
4. As distâncias não estão em escala.

A análise citológica corrobora mais ainda a segunda hipótese, pois:

1. O exame das Tabelas 6 e A-2 mostra que a média dos diâmetros dos núcleos da linhagem proA1, pabaA6, y difere da de A e não difere da linhagem biA1, methG1, dando evidências de que a linhagem A deve ter perdido material.

2. A linhagem proA1, pabaA6, y se comporta como a biA1, methG1 em vários aspectos, tais como nos polígonos de frequência (Figura 13), relação núcleo-citoplasma (Figura 14) e número de conídios (Tabela 8), indicando que ela não deve ter material genético adicional como a linhagem A.

5.2.2. Variante V46

AZEVEDO e ROPER (1970), *AZEVEDO (1971)* e *MENEZES (1974)*, fazendo estudos em deteriorados de *A. nidulans*, acabaram por concluir que os grupos de ligação I e II estão sempre envolvidos na deterioração. *AZEVEDO (1971)* e *MENEZES (1974)* verificaram ainda que a segregação meiótica foi quase sempre de 1:1, comportando-se o caráter deteriorado como monogênico. Procurando-se então verificar se a linhagem deteriorada usada na análise citológica tinha o mesmo comportamento que as estudadas por aqueles autores, procedeu-se à análise genética.

Através da análise mitótica (Tabela 3), verificou-se que o determinante da deterioração está localizado no grupo de ligação I, pois todos os setores normais foram proA1⁺, pabaA6⁺. Através da análise meiótica confirmou-se que o determinante da deterioração está localizado no grupo de ligação I, pois se encontra ligado ao marcador genético proA1 (Tabela 5).

O exame da Tabela 4 mostra que a segregação é de 1 normal: 1

deteriorado, sugerindo ser monogênico o caráter, confirmando-se assim trabalhos anteriores.

Pela Tabela 5 pôde-se calcular os valores de ligação dos marcadores proA1, pabaA6 e v46 (p. 45). Restava saber qual o marcador intermediário. Três são as razões que levam a admitir que o marcador v46 deve estar à esquerda de proA1 e que, portanto, este último é o intermediário (Figura 9):

1. a classe com menor frequência é a da permutação dupla, sugerindo a posição relativa dos genes (*STRICKBERGER, 1968*) (Tabela 5);

2. pode-se notar, pelos resultados obtidos, que a posição do determinante v46 é exatamente a soma da distância entre os marcadores pabaA6, proA1 e v46;

3. admitindo-se que o locus v46 esteja à direita de pabaA6, o referido locus estaria em condição diplóide na linhagem A, devido à translocação que a mesma exhibe. Quando a linhagem A perde o segmento em duplicata, hipótese essa corroborada no presente trabalho, o determinante para deterioração deveria se manifestar, caso ele estivesse à direita de pabaA6, o que não acontece: o fenótipo que surge é sempre normal.

Pesquisas futuras deverão ser conduzidas com o variante V46 e outros, obtidos por outros autores (*AZEVEDO, 1971; ROSATO, 1973; MENEZES, 1974*), no sentido de se confirmar a posição exata do determinante da deterioração, que foi sugerida no presente trabalho.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se analisar, genética e citologicamente, linhagens com duplicação cromossômica, assim como variantes melhorado e deteriorado, que surgem espontaneamente a partir delas.

Dos resultados obtidos, as seguintes conclusões podem ser tiradas:

1. A técnica citológica com melhores resultados para a coloração de núcleos de conídios de *A.nidulans* foi a HCl-Giemsa.

2. Confirmou-se citologicamente que a instabilidade está associada com material genético adicional, pois a linhagem A, com duplicação cromossômica, tem o diâmetro médio de seus núcleos maior que o da linhagem haplóide balanceada.

3. A linhagem duplicada, ao produzir setor melhorado, perde o material genético adicional, pois, além de o diâmetro médio dos núcleos

dos confídios daquele setor ser igual ao da linhagem haplóide, os polígonos de frequência, a relação núcleo-citoplasma e o número de núcleos dos confídios também o são. Além disso, a análise genética do setor melhorado corroborou ainda mais a hipótese da deleção.

4. O setor deteriorado, originado da linhagem A, apresenta material genético adicional, pois, além de seus núcleos terem o mesmo diâmetro, eles apresentam o mesmo polígono de frequência e igual relação núcleo-citoplasma.

5. O determinante da deterioração se comporta como outros já estudados: segrega na proporção de 1 normal:1 deteriorado, localiza-se no grupo de ligação I e situa-se próximo ao centrômero.

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present research was carried out to analyse both cytologically and genetically strains with duplicated chromosomes as well as improved and deteriorated sectors that arise spontaneously from them.

From the obtained results the following conclusions can be drawn:

1. The staining method which presents best results for nuclei of conidia of *A. nidulans* is HCl-Giemsa.

2. The cytological analysis has shown that instability is closely linked with additional genetic material, for the strain A, with duplicated chromosome, has the medium size of their nuclei larger than that of the haploid, the balanced control strain.

3. A duplicated strain producing improved sectors must lose their additional genetic material, for the size of the nuclei of conidia from improved sector is the same as that of the haploid strain, as well as

the histograms, the line graphs, the number of nuclei and the nucleus-cytoplasm relation. Besides, the genetic analysis of the improved sector has corroborated once more the deletion hypothesis.

4. The deteriorated sector, arisen from the strain A, must show additional genetic material, for both of them have the nuclei with the same size in the same way as histograms, the line graphs, and the nucleus-cytoplasm relation are the same.

5. The determinant of deterioration behaved like all others already studied: segregated in the proportion 1 normal: 1 deteriorated, located in the linkage group I and near the centromere.

8. LITERATURA CITADA

AIST, J.R. e C.L. WILSON, 1965. Observations on nuclear division in vegetative hyphae of *Ceratocystis fagacearum*. *Arkansas Academy of Science Proceedings*. Arkansas, 19: 32-36.

AIST, J.R. e C.L. WILSON, 1967. Nuclear behavior in the vegetative hyphae of *Ceratocystis fagacearum*. *American Journal of Botany*, 54: 99-104.

APIRION, D., 1962. A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice-versa in micro-organisms. *Nature*. London, 195: 959-961.

AZEVEDO, J.L., 1966. Estudos sobre recessivos letais em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP (Tese de Livre-Docência).

AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER, 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: successive and transposable genetic changes. *Genetical Research*, Cambridge, 16: 79-93.

- AZEVEDO, J.L., 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: Derivatives form deteriorated variants. *Aspergillus News Letter*, 11: 21.
- AZEVEDO, J.L., 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. England, University of Sheffield. 240 p. (Ph.D.- Thesis).
- BAINBRIDGE, B.W. e J.A. ROPER, 1966. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 42: 417-424.
- BAKERSPIGEL, A., 1959. The structure of the nuclei in the vegetative mycelium of *Neurospora crassa*. *American Journal of Botany*, 46: 180-190.
- BARACHO, I.R.; R. VENCOVSKY e J.L. AZEVEDO, 1970. Correlation between size and hibrid or selfed state of the cleistothecia in *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 54: 109-116.
- CARR, A.J.H. e L.S. OLIVE, 1958. Genetic of *Sordaria fimicola*. II. Cytology. *American Journal of Botany*, 45: 142-150.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1969. Cell volume per nucleus in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. *J. gen. Microbiol.*, 55: 291-299.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1970 b. *Aspergillus* symbols, locus letters and allele numbers. *Aspergillus Newsletter*, 11; 25-33.
- DAWSON, G.W.P. e P.F. SMITH - KEARY, 1963. Episomic control of mutation in *Salmonella typhimurium*. *Heredity*, 18: 1-20.

- DEMEREK, M., 1937. Frequency of spontaneous mutations in certain stocks of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. Princeton, 22: 469-478.
- DOWDING, E.S. e J. WEIJER, 1962. Mitosis in *Neurospora* and *Gelasinospora* I. *Genética*, 32: 339-351.
- ELLIOTT, C.G., 1960. The cytology of *Aspergillus nidulans*. *Genetic Research*. Cambridge, 1: 462-476.
- FINLEY, D.E., 1970. Somatic mitosis in *Ceratobasidium flavescens* and *Pellicularia koleroga*. *Mycologia*, 62: 474-485.
- FULLER, M.S., 1976. Mitosis in fungi. *International Review of Cytology*, 45: 113-151.
- FURTADO, J.S., 1968. Basidial cytology of *Exidia nucleata*. *Mycologia*, 1: 9-15.
- GALIGHER, A.E. e E.N. KOSLOFF, 1971. *Essentials of Practical Microtechnique*. 2a. ed. Philadelphia, Lea & Febizer, 531 p.
- GREEN, M.M. 1967. The genetics of a mutable gene at the white locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, Princeton, 56: 467-482.
- HEAGY, F.C. e J.A. ROPER, 1952. Deoxyribonucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus* conidia. *Nature*. London, 170:713-714.
- ISHITANI, G.; K. UCHIDA e Y. IKEDA, 1956. The relation of DNA content to cell size in *Aspergillus*. *Experimental Cell Research*, 10: 737-740.

- KÄFER, E., 1960. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature*. London, 186 : 619-620.
- KÄFER, E., 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. Princeton, 46: 1581-1609.
- LHOAS, P. 1961. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with p-fluorophenylalanine. *Nature*. London, 190: 744.
- McCLINTOCK, B., 1951. Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 16: 13-47.
- McCLINTOCK, B., 1953. Induction of instability at selected loci in maize. *Genetics*. Princeton, 38: 579-599.
- McCLINTOCK, B., 1955. Intranuclear systems controlling gene action and mutation. *Brookhaven Symposia Biology*, 8: 58-71.
- McCLINTOCK, B., 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 21: 197-216.
- McCULLY, K.S. e E. FORBES, 1965. The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research*. Cambridge, 6: 352-359.
- McNITT, R., 1973. Mitosis in *Phlyctochytrium irregulare*. *Canadian Journal of Botany*, 51: 2065-2074.
- MENEZES, E.M., 1974. Análise genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP , 114 p. (Tese de Mestrado).

- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregations induced by p-fluorophenylalanine. *Aspergillus Newsletter*, 2: 10.
- MORRIS, N.R., 1976. Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genetic Research*. Cambridge, 26: 237-254.
- NAMBOODIRI, A.N. e R.J. LOWRY, 1967. Vegetative nuclear division in *Neurospora*. *American Journal of Botany*, 54: 735-748.
- NGA, B.N. e J.A. ROPER, 1968. Quantitative intra-chromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, Princeton, 58: 193-209.
- NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1969. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*. Cambridge, 14: 63-70.
- OLIVE, L.S., 1953. The structure and behavior of fungus nuclei. *The Botanical Review*, 19: 439-555.
- PONTECORVO, G.; J.A. ROPER; L.M. HEMMONS; K.D. McDONALD e A.W. 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.
- ROANE, C.W., 1952. A method of preparing fungi for cytological studies. *Phytopathology*. Baltimore, 42: 480.

- ROBINOW, C.F., 1963. Observations on cell growth mitosis, and division in the fungus *Basidiobolus ranarum*. *The Journal of Cell Biology*, 17: 123-152.
- ROBINOW, C.F. e A. BAKERSPIGEL, 1965. Somatic nuclei and forms of mitosis in Fungi. In: *The Fungi*. AINSWORTH, G.C. e A.S. SUSSMAN eds. New York, Academic Press, 1, p. 119-142.
- ROBINOW, C.F. e C.E. CATEN, 1969. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science*, 5: 403-431.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8: 14-15.
- ROSATO, Y.B., 1973. Efeitos do etil-metano-sulfonato e acriflavina na instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 74 p. (Tese de Mestrado).
- SCHREIBER, G., 1946. Estudo cariométrico dos poliplóides de *coffea*. *Bragantia*. Campinas, 6: 279-298.
- SCHREIBER, G., 1950. Some basic facts concerning the variability of nuclear size. In: *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 22. Rio de Janeiro, Serviço Gráfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, p. 151-160.
- SCHREIBER, G., 1951. Pesquisas de Citologia quantitativa, X^o: Pesquisas cariométricas nos meristemas de *Allamanda Cathartica* L. Var. *Nobilis*. In: *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 23. Rio de Janeiro, Serviço Gráfico do I.B.G.E.: p. 394-414.

- SMITH-KEARY, D.F., 1958. An unstable mutation in *Salmonella typhimurium*. *Nature*. London, 181: 1672.
- SOMERS, C.E.; R.P. WAGNER e T.C. HSU, 1960. Mitosis in vegetative nuclei of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 45: 801-810.
- SPIEGEL, M.R., 1970. *Estatística*. 2a. ed. Rio de Janeiro, Editora McGraw Hill do Brasil. 580 p.
- STRICKBERGER, M.W., 1968. *Genetics*. Nova York, The Mac-Millan Company, 868 p.
- YUILL, E., 1950. The numbers of nuclei in conidia of *Aspergilli*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 33: 324-331.
- WARD, E.W.B. e K.W. CIURYSEK, 1962. Somatic mitosis in *Neurospora crassa*. *American Journal of Botany*, 49: 393-399.
- WEIJER, J., A. KOOPMANS e D.L. WEIJER, 1965. Karyokinesis of somatic nuclei of *Neurospora crassa*: III. The juvenile and maturation cycles (Feulgen and crystal violet staining). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 7: 140-163.
- WEIJER, J. e S.H. WEISBERG, 1966. Karyokinesis of the somatic nucleus of *Aspergillus nidulans*: I. The juvenile chromosome cycle (Feulgen staining). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 3: 361-373.

APENDICE

Tabela A-1. Análise de variância das médias dos diâmetros dos núcleos das diferentes linhagens.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	4	0,234	0,058	25,73**
Resíduos	20	0,045	0,002	
Total	24	0,279		

** = significância a 1%

Tabela A-2. Comparação das médias dos diâmetros dos núcleos das diferentes linhagens pelo teste de Tukey.

Tratamento	Médias
Haplóide	0,9562 a
Amarela	0,9593 a
Duplicada	1,0718 b
Deteriorada	1,0843 b
Diplóide	1,2187 c

dms a 5% = 0,0904

dms a 1% = 0,1130

Tabela A-3. Análise de variância das médias dos diâmetros das células das diferentes linhagens.

Causas da variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	4	1,348	0,337	103,99**
Resíduos	20	0,064	0,003	
Total	24	1,412		

** = significância ao nível de 1%

Tabela A-4. Comparação das médias dos diâmetros das células das diferentes linhagens pelo teste de Tukey.

Tratamento	Médias
Amarela	2,6375 a
Haplóide	2,7031 a
Duplicada	2,9531 b
Deteriorada	2,9687 b
Diplóide	3,2937 c

dms a 5% = 0,1079

dms a 1% = 0,1349

Tabela A-5. Variabilidade do diâmetro nuclear nas diferentes linhagens (valores em mm).

Linhagens	nº de medidas	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Haplóide	50	9	27	13	1		
Amarela	50	6	31	13			
Duplicada	50	1	10	34	5		
Deteriorada	50	1	9	32	8		
Diplóide	50		3	13	26	7	1