

**MUTANTES MORFOLÓGICOS INDUZIDOS POR
8 - METOXIPSORALEINA E LUZ ULTRA-VIOLETA**
EM *Aspergillus nidulans*

CONSUELO MARGARIDA RUBIO DE BIAGI

Faculdade de Ciências Biológicas de Araras

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
1977

.i.

Ao Prof. Dr. *João Lúcio de Azevedo*,

por sua valiosa atenção, dedicação e apreço,

meu muito obrigado.

A

meus pais, *Francisco e Nair*

meus irmãos, *Maria Inês e João Domingos*

meu marido, *Eduardo Henrique*

minha filha, *Camila Melissa*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Expressamos nossos sinceros agradecimentos:

- Prof. Dr. *João Lúcio de Azevedo*, orientador e amigo, pelo estímulo, e compreensão.
- Prof. Dr. *Gerhard Bandel* pela orientação inicial, sugestões apresentadas e cuidadosa revisão do manuscrito.
- Prof. Dr. *Ernesto Paterniani*, pelas facilidades concedidas como Diretor do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo.
- Prof. Dr. *Flávio César de Almeida Tavares* pelas sugestões apresentadas e cuidadosa revisão do original.
- Prof. Dr. *Roland Vencovsky e Natal Antonio Vello* pela orientação na execução da análise estatística.
- Dr. *Hermínio Ometto* Presidente da Fundação do Ensino Superior de Araras pelo auxílio concedido para execução deste trabalho.
- *Cláudio Luiz Messias* por fotografar os fungos ao microscópio.
- *Aline Aparecida Pizzirani* pelos desenhos e *Cláudio Costa* pela cuidadosa correção do manuscrito.
- Funcionários do Instituto de Genética pelos serviços prestados.
- Funcionários do Setor de Genética de Microrganismos pelos serviços técnicos prestados.

- Colegas do curso de Pós-Graduação de Genética e Melhoramento de Plantas pelo apoio, convívio e amizade.

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de estudo concedida, possibilitando a execução desse trabalho.

- A meus pais pelo carinhoso apoio e a meu marido pela extrema compreensão, dedicação e estímulo um agradecimento todo especial.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.	03
2.1. Desenvolvimento das hifas e estruturas conidiais em <i>Aspergillus nidulans</i>	03
2.2. Mutantes morfológicos descritos em <i>Aspergillus nidulans</i> ..	08
2.3. 8-Metoxipsoraleina (furocomarina)	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Linhagens utilizadas.	18
3.1.1. Linhagem MSE	18
3.1.2. Linhagem <i>bia</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁	20
3.1.3. Linhagem <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>ya</i> ₁	20
3.1.4. Linhagem diplóide <i>bia</i> ₁ // MSE.	21
3.1.5. Marcadores genéticos e fenótipos dos mutantes utilizados	22
3.2. Meios de cultura e soluções usados.	22
3.2.1. Meio mínimo	22
3.2.2. Meio completo.	23
3.2.3. Solução de vitaminas	24
3.2.4. Solução de ácido nucleico de leveduras	24
3.2.5. Meio de acetato de amônio.	25
3.2.6. Meio mínimo de galactose	25
3.2.7. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo	25
3.2.8. Solução salina (0,89%)	26
3.2.9. Solução de tween-0,1%.	26
3.2.10. Solução de cloroneb-2%	26
3.2.11. Solução fosfato pH 7,0	27
3.2.12. Solução de 8-Metoxipsoraleina.	27
3.2.13. Corante safranina - 0,10%.	27

	<u>Página</u>
3.2.14. Suplementos adicionados ao meio mínimo	28
3.2.15. Placas de análise	28
3.3. Esterilização e incubação	29
3.4. Tratamento com agentes mutagênicos	29
3.4.1. Tratamento com luz ultra-violeta (253 nm)	29
3.4.2. Tratamento com 8-Metoxipsoraleina (8-MOP) e luz ultra-violeta longa - 360 nm (UVL)	30
3.5. Taxa de crescimento	31
3.6. Taxa de conidiação	32
3.7. Análise microscópica	32
3.8. Análise genética	33
3.8.1. Obtenção de heterocários	33
3.8.2. Análise mitótica	34
3.8.3. Análise meiótica	35
3.8.4. Teste do heterocário	37
3.9. Análise estatística	37
4. RESULTADOS	40
4.1. Sobrevivência aos agentes mutagênicos	40
4.1.1. Sobrevivência a 8-Metoxipsoraleina(8-MOP) e luz ul- tra-violeta longa (UVL) (360 nm)	40
4.1.2. Sobrevivência à luz ultra-violeta(253 nm)	40
4.2. Isolamento e características dos variantes morfológicos obtidos	43
4.3. Taxa de crescimento dos variantes morfológicos	53
4.4. Conidiação	58
4.5. Análise microscópica	61
4.5.1. Características microscópicas dos variantes morfo- lógicos	61

	<u>Página</u>
4.5.2. Análise métrica da estrutura conidial	73
4.6. Análise genética	80
4.6.1. Análise genética dos mutantes morfológicos obtidos por tratamento com UV. (linhagem <i>biA₁</i> ; <i>methG₁</i>) . .	80
4.6.2. Análise genética dos derivados morfológicos obti- dos por tratamento com 8-MOP e UVL (Linhagem MSE). . .	84
4.7. Efeito do 8-MOP e UVL na produção de translocações. . . .	88
5. DISCUSSÃO	90
5.1. Obtenção e características dos mutantes morfológicos. . .	90
5.2. Análise genética	95
5.2.1. Alterações morfológicas causadas por um único gene mutante	96
5.2.2. Alterações morfológicas mais complexas.	99
5.2.3. A possível localização dos determinantes de morfo- logia alterada	102
5.3. Relação entre os mutantes obtidos e bloqueios no desenvol- vimento	104
5.4. 8-MOP e UVL causando aberrações.	108
6. RESUMO E CONCLUSÕES	110
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS.	112
8. BIBLIOGRAFIA CITADA	114
9. APÊNDICE	129

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
01 - Mutantes morfológicos descritos em <i>Aspergillus nidulans</i> ..	09
02 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes a 8-MOP e UVL - Linhagem MSE	41
03 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes a 8-MOP e UVL - linhagem <i>bia</i> ₁ // MSE	42
04 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes à luz UV. Linhagem <i>bia</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁	42
05 - Descrição sumária dos variantes morfológicos derivados da linhagem <i>bia</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁ submetida ao tratamento com luz UV..	44
06 - Descrição sumária dos variantes morfológicos derivados da linhagem MSE submetida ao tratamento com 8-MOP e UVL . . .	45
07 - Diâmetro da linhagem <i>bia</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁ e seus derivados morfológicos após 1 a 10 dias de crescimento	53
08 - Diâmetro da linhagem MSE e variantes morfológicos após 1 a 10 dias de crescimento	54
09 - Análise da variância para diâmetro das colônias com 6 dias de crescimento	57
10 - Número de conídios da linhagem <i>bia</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁ e derivados morfológicos	58
11 - Número de conídios da linhagem MSE e derivados morfológicos	59
12 - Análise da variância para o número de conídios das linhagens originais e respectivos variantes morfológicos	60

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
13 - Características microscópicas dos variantes morfológicos provenientes da linhagem <i>bia</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁	61
14 - Características microscópicas dos variantes morfológicos provenientes da linhagem MSE	64
15 - Valores médios do comprimento do pedúnculo, da vesícula e do conidióforo; largura do pedúnculo e da vesícula da linhagem <i>bia</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁ e seus variantes morfológicos	73
16 - Valores médios do comprimento do pedúnculo, da vesícula e do conidióforo; largura do pedúnculo e da vesícula da linhagem MSE e seus variantes morfológicos	74
17 - Análise da variância para medidas do comprimento do pedúnculo da estrutura conidial	75
18 - Análise da variância para medidas do comprimento da vesícula da estrutura conidial	76
19 - Análise da variância para medidas do comprimento do conidióforo da estrutura conidial	77
20 - Análise da variância para medidas da largura do pedúnculo da estrutura conidial	78
21 - Análise da variância para medidas da largura da vesícula da estrutura conidial	79
22 - Análise mitótica do variante morfológico 5	81
23 - Análise meiótica do variante morfológico 5	82
24 - Segregação meiótica de cruzamento envolvendo variantes morfológicos X linhagens MSE ou MSF	82

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
25 - Segregação meiótica do cruzamento envolvendo variante morfológico 5 X linhagem MSE	83
26 - Grupos e valores de ligação dos variantes morfológicos provenientes da linhagem <i>biA₁</i> ; <i>methG₁</i>	83
27 - Análise mitótica do variante morfológico II	85
28 - Análise meiótica do variante morfológico II.	86
29 - Segregação meiótica de cruzamentos envolvendo variantes morfológicos X linhagem <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₁</i>	86
30 - Segregação meiótica de cruzamentos envolvendo variantes morfológicos I e V X linhagem <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₁</i>	87
31 - Grupos e valores de ligação dos variantes morfológicos provenientes da linhagem MSE	87
32 - Análise mitótica do D ₁ // MSE.	89

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
01 - Marcadores genéticos da linhagem MSE	19
02 - Marcadores genéticos da linhagem <i>bia</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁	20
03 - Marcadores genéticos da linhagem <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>ya</i> ₁	21
04 - Esquema da estrutura conidial indicando os locais de medidas	33
05 - Linhagem <i>bia</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁	46
06 - Variante morfológico 1	46
07 - Variante morfológico 2	47
08 - Variante morfológico 3	47
09 - Variante morfológico 4	48
10 - Variante morfológico 5	48
11 - Variante morfológico 6	49
12 - Variante morfológico 7	49
13 - Linhagem MSE	50
14 - Variante morfológico I	50
15 - Variante morfológico II.	51
16 - Variante morfológico III	51
17 - Variante morfológico IV.	52
18 - Variante morfológico V	52

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
19 - Diâmetro das colônias com 1 a 10 dias de crescimento. Linhagem <i>biA</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁ e morfológicos	55
20 - Diâmetro das colônias com 1 a 10 dias de crescimento. Linhagem MSE e morfológicos	56
21 - Microscopia da linhagem <i>biA</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁	66
22 - Microscopia do variante morfológico 1	66
23 - Microscopia do variante morfológico 2.	67
24 - Microscopia do variante morfológico 3.	67
25 - Microscopia do variante morfológico 4.	68
26 - Microscopia do variante morfológico 5.	68
27 - Microscopia do variante morfológico 6.	69
28 - Microscopia do variante morfológico 7.	69
29 - Microscopia da linhagem MSE	70
30 - Microscopia do variante morfológico I.	70
31 - Microscopia do variante morfológico II	71
32 - Microscopia do variante morfológico III.	71
33 - Microscopia do variante morfológico IV	72
34 - Microscopia do variante morfológico V	72
35 - Possível explicação para a morfologia alterada encontrada no variante 5	101
36 - Localização dos mutantes morfológicos analisados	103
37 - Mutantes morfológicos e bloqueios no desenvolvimento	105

1. INTRODUÇÃO

A análise genética de mutantes morfológicos já foi efetuada em muitos organismos superiores; no entanto, uma análise mais detalhada envolvendo inclusive os passos bioquímicos são realizados principalmente em microrganismos. Os fungos em especial, constituem-se em um excelente material para o estudo de mutantes morfológicos com taxa de crescimento, coloração de colônias, hifas e aparelhos conidiais alterados.

O *Aspergillus nidulans* é um fungo ideal para esse tipo de pesquisa, pois apresenta-se muito bem estudado geneticamente; seu aparelho conidial é adequado e bem definido; seus conídios possuem coloração característica e são dispensáveis; suas estruturas miceliais são distintas e bem estudadas. Assim sendo, mutantes para morfologia alterada podem ser distinguidos e analisados sob o ponto de vista macroscópico, microscópico e genético.

O mutagênico químico 8-metoxipsoraleina (8-MOP) quando usado em associação com luz ultra-violeta de comprimento de onda longa (UVL) é um potente mutagênico para *A. nidulans*. Apesar de ser um mutagênico não

específico, isto é, sendo capaz de causar mutação nos mais diversos locos do fungo, não se tem idéia de seu efeito em causar aberrações cromossômicas em microrganismos. Uma vez que 8-MOP não é tóxico e sendo não específico, tem sido usado em linhagens industriais para a produção de mutantes. A indução de aberrações cromossômicas pelo 8-MOP limitaria, no entanto, sua aplicabilidade na indústria.

O presente trabalho foi portanto realizado com a finalidade de em primeiro lugar estudar as características e aspectos genéticos de mutantes morfológicos em *A. nidulans* induzidos por 8-MOP e radiação ultra-violeta e, em segundo lugar verificar a possibilidade do 8-MOP em induzir, além de mutações de ponto também aberrações cromossômicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura será dividida em três partes. Na primeira citaremos trabalhos relacionados ao desenvolvimento das hifas e estruturas conidiais, na segunda os mutantes morfológicos já descritos em *Aspergillus nidulans* e na terceira dados sobre o mutagênico 8-metoxipsoraleina (8-MDP).

2.1. Desenvolvimento das hifas e estruturas conidiais em *Aspergillus nidulans*

O *Aspergillus nidulans* é um microrganismo eucarioto que completa seu ciclo assexuado de desenvolvimento mais ou menos em um dia. Estudos anteriores da genética, bioquímica e morfologia desse fungo mostram que o mesmo constitui-se em um excelente sistema para estudo da diferenciação.

Quando conídios de *A. nidulans* são semeados em meio favorável, observa-se germinação parcialmente sincronizada (ROSENBERGER e KESSEL, 1967), e após 3 - 6 horas, 90% dos conídios já germinaram (MARTINELLI, 1976). A emergência do tubo germinativo ocorre em média aos 360-400 minutos

(BAINBRIDGE, 1971; SCOTT e ALDERSON, 1975). BAINBRIDGE (1971) estudando a composição macromolecular de esporos germinando, observou aumento de RNA, peso seco, proteína e DNA após 30, 120, 150 e 180 minutos respectivamente e o aumento da quantidade dessas macromoléculas precede em 4 horas a emergência do tubo germinativo.

O crescimento da hifa ocorre através de síntese de nova parede na região apical (KATZ e ROSENBERGER, 1971). A divisão nuclear e septação são sincronicamente reguladas em função da taxa de crescimento (ROSENBERGER e KESSEL, 1967; KESSEL e ROSENBERGER, 1968; CLUTTERBUCK, 1970a; BAINBRIDGE, 1976), e a alongação das hifas e sua dimensão não são afetadas pela ploidia (CLUTTERBUCK, 1969a; FIDDY e TRINCI, 1976). A cinética do crescimento micelial foi estudada também por DORN e RIVERA (1966), TRINCI (1969) e KOCH (1975). Estudos relativos à ramificação foram realizados por MACKINTOSH e PRITCHARD (1963) e KATZ e col. (1972) indicando que o número de ramificações aumenta com o aumento da taxa de crescimento e pode ser afetada por agentes químicos.

A colônia cresce e aumenta em diâmetro por 24 horas sem qualquer diferenciação e após esse período começa o desenvolvimento de conidióforos e posteriormente de conídios. AXELROD (1972b) estudando a cinética da diferenciação de conidióforos e conídios observou o aparecimento de conidióforos e conídios após 22 e 26 horas respectivamente. A partir da célula podal desenvolve-se o conidióforo como um eixo longo e espessado terminando em uma vesícula globosa (RAPER e FENNEL, 1973). A partir da vesícula formam-se brotos e após várias mitoses do núcleo da vesícula, estes migram para os esterígmas primários que, ao atingirem seu desenvolvi-

mento máximo, originam brotos que se desenvolverão em esteríngmas secundários. O núcleo do esteríngma secundário provém por divisão do núcleo do esteríngma primário. Os conídios finalmente originam-se a partir dos esteríngmas secundários (CLUTTERBUCK, 1969a; MARTINELLI, 1976). Os conidióforos são multinucleados enquanto que os esteríngmas e conídios são uninucleados (PONTECORVO e col., 1953; CLUTTERBUCK, 1969a; MARTINELLI, 1976) embora PIZZIRANI (1977) tenha verificado que em uma determinada linhagem ocorrem conídios binucleados.

O início da conidiação é complexa (MORTON, 1961; TURIAN, 1966) e estudos preliminares em *A. nidulans* sugerem que há um balanço entre conidiação e produção de cleistotécios ou micélio aéreo. A hipótese mais geral para a indução de conidiação em fungos filamentosos é que a reprodução é iniciada por fatores que limitam o crescimento vegetativo do fungo (COCHRANE, 1958). MARTINELLI (1976) citou que a conidiação está relacionada com a diminuição de carbono e nitrogênio assimiláveis e que crescimento e conidiação são mutuamente exclusivos AXELROD e col. (1973) e GEALT e AXELROD (1974) relataram a necessidade da atividade de um gene para aquisição da competência para iniciar o desenvolvimento. PASTUSHOK e AXELROD (1976) afirmaram que o longo período de crescimento vegetativo antes do desenvolvimento é o tempo requerido para controlar a atividade endógena governada por genes e, portanto, não é necessário o esgotamento de nutrientes exógenos.

CLUTTERBUCK (1969c) sugeriu que a atividade de apenas dois locos, em adição àqueles funcionando normalmente nas hifas, são essenciais para conversão da morfologia hifal em conidial. Encontrou apenas

dois mutantes bloqueados na formação de conídios ("*bristle*" e "*abacus*") e ambos no mesmo loco. Concluiu que o loco "*bristle*" governa a mudança de tipo de crescimento hifal como encontrado no conidióforo para crescimento tipo brotamento do esterigma, sendo portanto a vesícula, o bloqueio dessa elongação do conidióforo. Postulou também que o loco "*abacus*" é o responsável pela mudança do brotamento apical dos esterigmas para brotamento intersticial dos conídios. Juntamente com esses dois locos *brl*⁺ e *aba*⁺ há necessidade de outros já ativos para que ocorra essa transformação de conidióforos em conídios, sendo que esses outros locos podem ser estruturais ou atuam como reguladores de outros genes não envolvidos nessa situação. MARTINELLI e CLUTTERBUCK (1971) estimaram 45 a 150 locos envolvidos na conidiação.

A formação, desenvolvimento ou coloração de conidióforos e conídios em *A. nidulans*, são influenciados por uma série de fatores: *temperatura* (KILBEY, 1963; TRINCI, 1969; CLUTTERBUCK, 1969c, 1970b; AXELROD, 1972b; MARTINELLI, 1972, 1976); *pH* (KILBEY, 1963; MARTINELLI, 1972; CLUTTERBUCK, 1972); *fonte de carbono* (MARTINELLI, 1972; 1976); *fonte de nitrogênio* (MARTINELLI, 1972; 1976); *glucose* (TRINCI, 1969; CLUTTERBUCK, 1970b; AXELROD, 1972a); *cloreto de potássio* (CLUTTERBUCK, 1970b; *aminoácidos e vitaminas* (MARTINELLI, 1972); *elementos essenciais* (KILBEY, 1963; AGNIHOTRI, 1967; SAXENA e SINHA (1973).

Com relação às enzimas relacionadas à conidiogênese em *A. nidulans* poucos trabalhos foram desenvolvidos. A enzima *p-difenol oxidase* (lacase) considerada como "*enzima específica da conidiação*" foi primeiramente descrita por CLUTTERBUCK (1969b) e confirmada por MARTINELLI

(1976). CLUTTERBUCK (1969b) procedeu extensivo estudo sobre essa enzima e observou que a mesma não é detectada no micélio, não existe em linhagem com esporos amarelos, forma-se durante a esporulação, seu sítio de ação é externo à membrana celular, o loco *yA* é um gene estrutural para pelo menos um componente da enzima, a indução da enzima é resultante de passos anteriores do desenvolvimento e, só é produzida após cessar o crescimento vegetativo da colonia. MARTINELLI (1976) confirmou a produção da enzima após término de crescimento, observou produção máxima 30 - 36 horas após inoculação e ausência da enzima em mutantes aconidiais. A enzima *p-difenol oxidase* contém cobre (AGNIHOTRI, 1972; HOLT e MACDONALD, 1967). Produção de esterigma e da enzima parecem ser relacionados (CLUTTERBUCK, 1972; MARTINELLI, 1976). Até o presente não se detectou qualquer substância indutora, mas parece que o substrato natural atua como indutor ou, o indutor é produto de passos anteriores do desenvolvimento ou o processo de indução é de natureza mais complexa (CLUTTERBUCK, 1972). O loco "*ivory*" (*ivo B*) é um loco estrutural para *p-difenol-oxidase* e sua atividade é controlada direta ou indiretamente pelo loco *brl*. O outro loco (*ivo A*) pode ser concernente com a produção de substrato fenólico para a enzima (CLUTTERBUCK, 1973). Análise do perfil da enzima foi diferente em linhagem selvagem e mutantes para melanina (MARTINELLI, 1969). A enzima *p-difenol-oxidase* foi também detectada em *A. niger* (CLUTTERBUCK, 1972); *A. fumigatus* (KÜSTER e LITTLE, 1963); *P. brevicompactum* (CLUTTERBUCK, 1972) e *P. spinulosum* (KÜSTER e LITTLE, 1963). A enzima *isocitrato liase*, também relacionada com a conidiação, foi estudada em *A. nidulans* (McCULLOUGH e ROBERTS, 1976); *A. niger* (GALBRAITH e SMITH, 1969); *Neurospora* (TURIAN, 1961; TURIAN e MATIKIAN, 1966).

Outras enzimas referentes à conidiação foram estudados em *Neurospora*: *trealase* e *invertase* (HILL e SUSSMAN, 1964; HANKS e SUSSMAN, 1969); *NAD glicosidase* e *Celobiase* (UREY, 1971); *NAD nucleotidase* (ZALOZAR e COCHRANE, 1956); *NADP nucleotidase* (WEISS e TURIAN, 1966); *aril-β gluco*
sidase (EBERHARDT, 1961; UREY, 1971); *β-galactosidase* (ZALOZAR, 1959).

Estudos ultraestruturais da conidiogênese, estrutura conidial ou conídios em espécies de *Aspergillus* foram realizados principalmente nos últimos anos. Esses estudos foram efetuados em *A. nidulans* (BORDER e TRINCI, 1970; WEISBERG e TURIAN, 1971; FLORANCE e col., 1972; OLIVER, 1972); *A. flavus* (BOJOVIČ - CVETIČ e VUJIČIČ, 1974); *A. niger* (TANAKA e YANAGITA, 1963; TSUKAHARA, 1968, 1970; ANDERSON e SMITH, 1971); *A. fumigatus* (CAMPBELL, 1971; GHIORSE e EDWARDS, 1973); *A. aureolatus* (VUJIČIČ e MUNTANJOLA - CVETKOVIČ, 1973); *A. giganteus* (TRINCI e col., 1968); *A. terreus* (FLETCHER, 1976); *A. clavatus* (HANLIN, 1976) e *A. oryzae* (TANAKA, 1966).

2.2. Mutantes morfológicos descritos em *Aspergillus nidulans*

Para efeito de maior compreensão e facilidade de visualização os mutantes morfológicos descritos até hoje serão apresentados em forma de tabela (Tabela 1) onde se encontram o símbolo gênico, grupo de ligação, fenótipo e referência.

Tabela 1 - Mutantes morfológicos descritos em *Aspergillus nidulans*.

Símbolo gênico	Grupo de ligação	F e n ó t i p o	Referência
<i>abaA(aba)</i>	VIII	" <i>abacus</i> " - Aconidial; apresentam estruturas retas intercaladas com protuberâncias em lugar de conídios; coloração cinza; alguns são "leaky" ou temperatura sensível.	CLUTTERBUCK, 1969c.
<i>apsA</i> <i>apsB</i>	IV VI	" <i>anucleate primary sterigmata</i> " - esterigma primário anucleado e com crescimento reduzido; forma o esterigma secundário o qual não possui posterior crescimento.	CLUTTERBUCK, 1969a.
<i>blA(bl₁)</i>	II	" <i>blue ascospores</i> " - ascosporos azuis.	APIRION, 1963.
<i>brlA</i> (<i>brl</i> , <i>br</i>)	VIII	" <i>bristle</i> " - aconidial; conidióforo defectivo com crescimento contínuo, sem desenvolvimento de vesícula (<i>brl₂</i>) ou esterigmas (<i>brl_{4,2}</i>); conidióforo incolor (<i>brlA</i>) ou pigmentado (<i>brl₉</i>); são "leaky". <i>brlA_{1,2}</i> é "non-leaky", com translocação (TB ₂ (III-VIII)).	CLUTTERBUCK, 1969c, 1970b, 1973.
<i>bwA</i> (<i>Bw</i>)	VI	" <i>brown conidia</i> " - conídios marrons; cabeça conidial pequena; epistático e <i>y</i> e <i>w</i> ; dominante.	KÄFER, 1958.
<i>chaA</i> (<i>cha</i>)	VIII	" <i>Chartreuse conidia</i> " - conídios com pigmentação verde clara.	KÄFER, 1961
<i>clA(cl₄)</i> <i>clB(cl₆)</i>	IV I	" <i>Colorless ascospores</i> " - ascosporos incolores.	APIRION, 1963
<i>coA</i> (<i>co</i>)	VIII	" <i>Compact morphology</i> " - morfologia compacta.	PONTECORVO e col. 1953; KÄFER, 1958.

Tabela 1 (Continuação).

Símbolo gênico	Grupo de ligação	F e n ó t i p o	Referência
-	II	"compact fluffy" - morfologia compacta e "fluffy"; estável; duas - mutações no grupo de ligação II.	BALL e ROPER, 1966.
col	VII	"Colonial morphology" - morfologia colonial.	KÄFER, 1958.
com (1 a 20)	I,II,IV V,VI,VII	"morfologia compacta" - crescimento reduzido; enrugamento em vários - graus; metabolismo oxidativo menor que a linhagem normal; alguns apre- sentaram aberrações cromossômicas.	ROSATO, não pu- blicado.
-	-	"crinkled" - colonia enrugada; cres- cimento linear reduzido; instável; esse efeito é resultante da translo- cação desigual III e VIII.	BAINBRIDGE, 1963a; BAIN- BRIDGE e RO- PER, 1966.
dil(A) dil	III	"dilute conidial color" - coloração diluída dos conídios.	JANSEN, in DORN, 1967.
drkA(drk) drkB	VII II	"dark conidial color" - conídios - escuros devido a defeitos estrutu- rais; drkB é supressor de brlA ₁₂ .	CLUTTERBUCK, 1969c, 1970b; OLIVER, 1972.
flA (fl) flA (fl ₂) flB (fl ₃) flC (fl ₄) flD (fl ₅)	VII VIII VIII I VIII	"fluffy morphology" - massa de micé- lio aéreo; recessivo; invasivos, isto é, infiltram e cobrem o micé- lio de colônias não "fluffy"; dife- renciação anormal; conidiação ge- ralmente ausente.	BALL e AZEVEDO, 1964; AZEVEDO, 1965; DORN e col., 1967; DORN, 1970.
fwA (fw, bge) fw ₁₀	VIII V	"fawn conidia" - conídios com pig- mentação marrom; morfologia e cabe- ça conidial normal.	CLUTTERBUCK, 1965; CUNHA, 1969.

Continua

Tabela 1 (Continuação).

Símbolo gênico	Grupo de ligação	F e n ó t i p o	Referência
<i>ivoA</i> <i>ivoB</i>	III VIII	" <i>ivory conidiophores</i> " - conidióforo e esterígmias incolores porém c/ morfologia normal; loco <i>ivoB</i> é tam bém loco da enzima p-difenol oxidase.	CLUTTERBUCK, 1969c, 1973.
<i>m</i>	-	" <i>mycelial growth form</i> " - aconidiais; não mapeados.	ROPER, 1958; KWIATKOUSKI, 1962.
<i>medA (med)</i>	I	" <i>medusa morphology</i> " - maior número de fileiras de esterígmias; conídios e células de Hülle normais; cleistotécios ausentes.	CLUTTERBUCK, 1969c.
<i>mela</i> <i>melB</i>	VII VII	" <i>melanin formation</i> " - produção excessiva de melanina (<i>mela</i>); não produção de pigmento visível (<i>melB</i>).	MARTINELLI, 1969.
-	C	" <i>minute</i> " - tamanho reduzido; menor número de estruturas conidiais e produzidos frequentemente por células de Hülle; quantidade reduzida de cleistotécios; produção de pigmento avermelhado.	ARLETT, 1957; FAULKNER e ARLETT, 1964.
<i>moA (mo₁)</i> <i>moB (mo₉)</i> <i>moC (mo₉₆)</i> <i>mo₈₇</i> <i>mo₈₉</i>	I VIII III VI VI	" <i>morphologically abnormal</i> " - <i>mo₁</i> , <i>mo₈₇</i> , <i>mo₈₉</i> = cabeça conidial anormal; <i>mo₉</i> = cabeça conidial pequena, " <i>fluffy</i> "; <i>mo₉₆</i> = conidiação tardia, semelhante ao "c".	BAINBRIDGE, 1963b, 1966.
<i>pA (p₁)</i> <i>p₃</i>	V VII	" <i>pale conidia</i> " - conídio marrom; cabeça conidial pequena; conídios se juntam formando uma massa compacta.	VAN ARCKEL, 1962; KAFER, 1965; CLUTTERBUCK, 1968.

continua

Tabela 1 (Continuação).

Símbolo gênico	Grupo de ligação	F e n ó t i p o	Referência
-	C	"red" - micélio com coloração vermelha.	ARLETT, 1957; ARLETT e col., 1962.
-	I	"red stable" - micélio vermelho; estável.	BALL e ROPER, 1966.
saA(sa)	II	"sage conidia" - conidio verde ou amarelo claro.	KILBEY, 1960.
sgpA(sgp ₁)	VII	"slow growing, noncleistothecial" - micélio escasso c/crescimento reduzido; sem cleistotécios; menor quantidade de cabeça conidial; conídios com menor viabilidade; menor produção de pigmento marrom.	HOUGHTON, 1970, 1971.
sgpB(sgp ₂)	V		
sgpC(sgp ₃)	III		
sgpD(sgp ₄)	I		
sgpE(sgp ₅)	IV		
sl	III	"slow" - taxa reduzida de crescimento.	BAINBRIDGE, in DORN, 1967.
smA(sm)	III	"small colony" - colônia pequena.	KÄFER, 1958
stu (stu)	I	"stunted conidiophores" - cabeça conidial atrofiada; parede do conidióforo sem espessamento; esporos pigmentados com viabilidade normal; células de Hülle e cleistetécios ausentes.	CLUTTERBUCK, 1969c.
veA(ve)	VIII	"velvet morphology" - aparência "fluffy", aveludado.	KÄFER, 1965; CLUTTERBUCK, 1965.

Continua

Tabela 1 (Continuação).

Símbolo gênico	Grupo de ligação	F e n ó t i p o	Referência
VG(1 a 15)	V, VI, VII, VIII	"variante morfológico" - colônias com morfologia e coloração alterada; menor taxa de crescimento e conidiação; cleistotécios menores; alguns apresentaram translocações.	LACAVAL, 1973.
WA(w)	II	"white conidia" - conídios brancos; epistático a y.	PONTECORVO, e col., 1953; CLUTTERBUCK, 1968.
wa	II	"alba conidia" - conídios incolores; epistático a y.	YUILL, 1936; KÄFER, 1958.
wn	II	"white new conidia" - conídios brancos.	PONTECORVO e col., 1953.
wetA(wet)	VII	"wet-white conidia" - conídios inicialmente incolores e a posteriori marrons; conídio acumula gotas de água; são aparentemente normais porém sofrem autólise em poucos dias.	CLUTTERBUCK, 1969c.
yA(y)	I	"yellow conidia" - conídios amarelos; loco da enzima p-difenol oxidase.	PONTECORVO, e col., 1953; KILBEY, 1963; CLUTTERBUCK, 1968, 1972.

Continua

Tabela 1 (Continuação).

Símbolo gênico	Grupo de ligação	F e n ó t i p o	Referência
yga	II	"yellow-green conidia" - conídios verdes em meio completo ou baixo pH e amarelos em meio mínimo ou - pH alto; conidióforo e esterígmias com coloração marrom claro.	DORN e RIVERA, <i>in</i> DORN, 1967; CLUTTERBUCK, 1968.
		análise de 5 classes de variantes morfológicas; não mapeados.	BULL e FAULKNER, 1964.
		mutantes oligosporogênicos e asporogênicos.	MARTINELLI e CLUTTERBUCK, 1971; MARTINELLI, 1972.

2.3. 8-Metoxipsoraleína (furocomarina)

8-Metoxipsoraleína (8-Methoxypsoralen = 8-MOP) pertence a um grupo de compostos, furocomarinas, que são considerados derivados das comarinas. As furocomarinas são encontradas em ambientes naturais e também sintéticas, sendo a maioria de origem natural, as quais são isoladas de plantas (PATHAK e col., 1962). A primeira furocomarina (5-MOP) foi isolada em 1834 por Kaulbrunner e em 1911, 8-MOP foi isolada por THOMS. As furocomarinas são inativas, química e biologicamente na ausência de radiação, tornando-se ativas em presença da mesma.

FOWLKS e col. (1958) foram os primeiros a demonstrar o efeito sensitizador de algumas furocomarinas em presença de luz, causando inativação em *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*, sendo o efeito, maior nas Gram positivas. A posteriori, outros autores demonstraram que tratamento combinado de 8-MOP ou psoraleína e ultra-violeta de comprimento de onda longa (UVL) foi efetiva na inativação de outros microrganismos como: *Sarcina lutea* (MATHEWS, 1963); *Streptomyces* (TOWNSEND e col., 1971); *Serratia marcescens* (JOSEPH e col., 1974); *Salmonella typhimurium* (SCOTT, 1976); *S. aureus* (OGINSKY e col., 1959); *E. coli* (OGINSKY e col., 1959; IGALI e col., 1970; SCOTT, 1976); bacteriófago T₄ (DRAKE e MCGUIRE, 1967); *Sacharomyces cerevisiae* (SWANBECK e THYRESSON, 1974); *Aspergillus nidulans* (ALDERSON e SCOTT, 1970; SCOTT e ALDERSON, 1971).

O efeito mutagênico das furocomarinas foi inicialmente apresentado por MUSAJO (1955) o qual constatou que 5-MOP e psoraleína são po-

tentes mutagênicos e induzem aberrações cromossômicas em raiz de cebola. SASAKI e TONOMURA (1973) observaram aberrações cromatídicas por fotossensitização de 8-MOP em leucócitos normais e anêmicos. Fotossensitização de furocomarina induzindo mutações citoplasmáticas foi mostrado por SWANBECK e THYRESON (1974) em leveduras. Com relação a mutação de ponto muitos trabalhos foram efetuados em microrganismos: *S. aureus* (OGINSKY e col., 1959); *S. lutea* (MATHEWS, 1963); bacteriófago T₄ (DRAKE e MCGUIRE, 1967); *E. coli* (IGALI e col., 1970; SCOTT, 1976); *S. typhimurium* (SCOTT, 1976); *A. nidulans* (ALDERSON e SCOTT, 1970; SCOTT e ALDERSON, 1971; MENDES e col., 1973; BIAGI e col., 1975). O trabalho relatado por CLARKE e WADE (1975) induzindo mutação "frame-Shift" com 8-MOP, no escuro, em *E. coli* K₁₂ não foi confirmado por outros pesquisadores.

Vários fatores como pH, oxigênio, temperatura, idade da cultura, pigmentos carotenóides e concentração de mutagênicos foram analisados em tratamentos com 8-MOP e UVL e comparados com tratamentos utilizando outros mutagênicos (OGINSKI e col., 1959; MATHEWS, 1963).

O efeito mutagênico causado pela fotossensitização de furocomarinas gradualmente foi sendo esclarecido. MATHEWS (1963) observou que tal tratamento não interferiu com a permeabilidade da membrana e sim atuou ao nível de ácido nucleico; IGALI e col. (1970) sugeriram ser transição de bases o tipo de mutação induzida, enquanto COLE (1970; 1971); BEN-HUR e ELKIND (1973); AVERBECK (1976) sugeriram ser devido à formação de "cross-links" da molécula de mutagênico com o DNA.

O mecanismo molecular proposto de fotossensitização de fu-

rocomarinas envolve formação de complexos moleculares das furocomarinas com os ácidos nucleicos de forma reversível; fotoligação das furocomarinas com bases pirimídicas do DNA e finalmente "*cross-linking*" entre fitas opostas de DNA (SCOTT e col. 1976).

Reparo dos danos induzidos pela fotoligação de furocomarinas com o DNA foi mostrado em experimentos por IGALI e col., (1970); BADEN e col. (1972); BEN-HUR e ELKIND (1973); COLE (1973). Esse reparo não ocorre por fotoreativação (IGALI e col., 1970) e sim por processos de reparo no escuro, ou seja, excisão e replicação posterior (COLE, 1970, 1973; HOWARD-FLANDERS e LIN, 1973; AVERBECK e MOUSTACCHI, 1975).

As vantagens de uso de 8-MOP e UVL na obtenção de mutantes em microrganismos advém do fato de que esses mutagênicos apenas produzem mutações de ponto em todos os microrganismos estudados; as mutações são ao acaso, ou seja, não têm especificidade para determinados locos (ALDERSON e SCOTT, 1970; SCOTT e ALDERSON, 1971); esse tratamento produz alta frequência de mutantes sob condições de morte moderada (MATHEWS, 1963; IGALI e col., 1970; SCOTT e ALDERSON, 1971; TOWNSEND e col., 1971; JOSEPH e col., 1974).

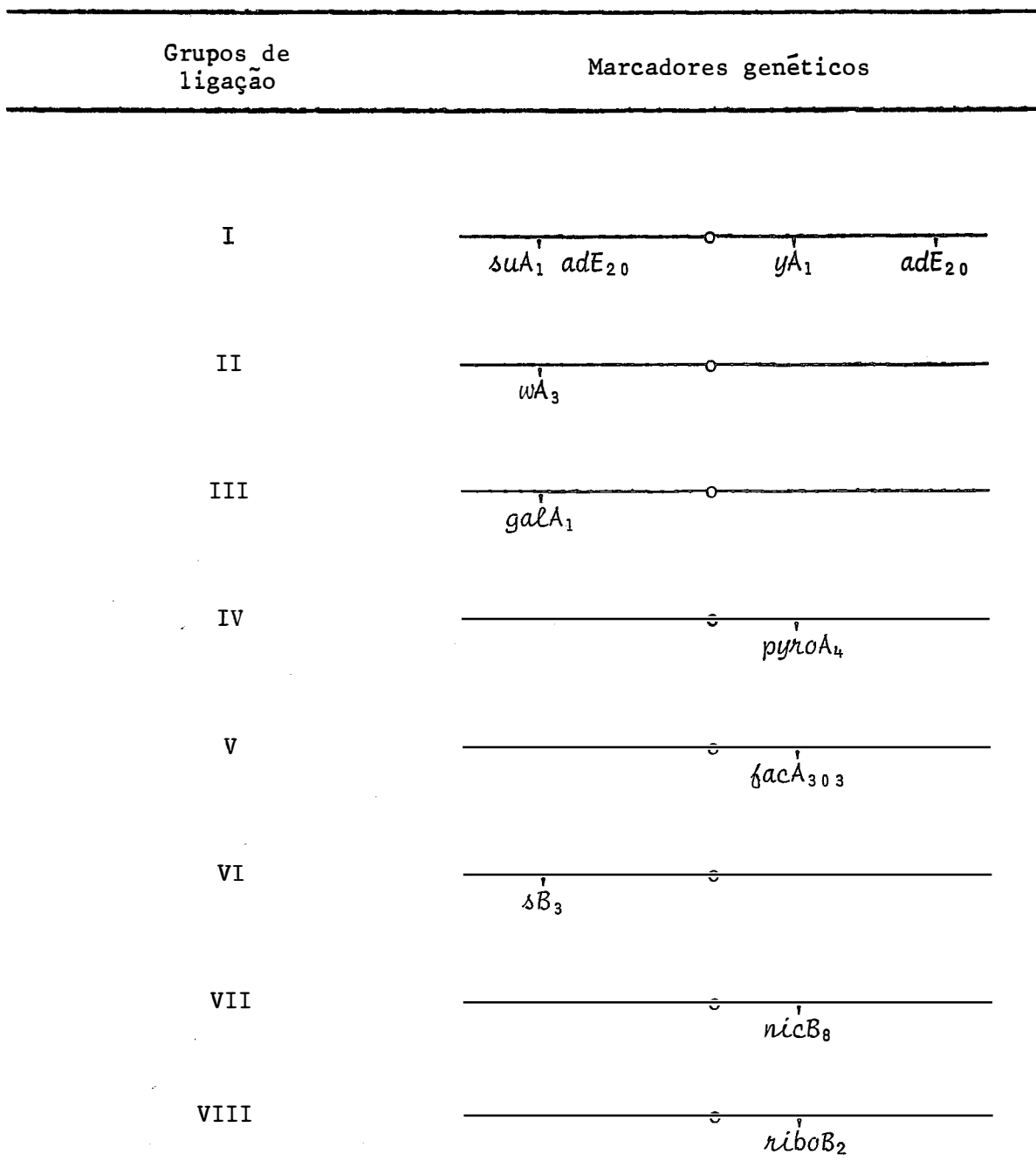
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas

3.1.1. Linhagem MSE (Master Strain E)

Contém marcadores genéticos em todos os oito grupos de ligação (Mc CULLY e FORBES, 1965) como se observa na Figura 1.

Figura 1 - Marcadores genéticos da linhagem MSE.

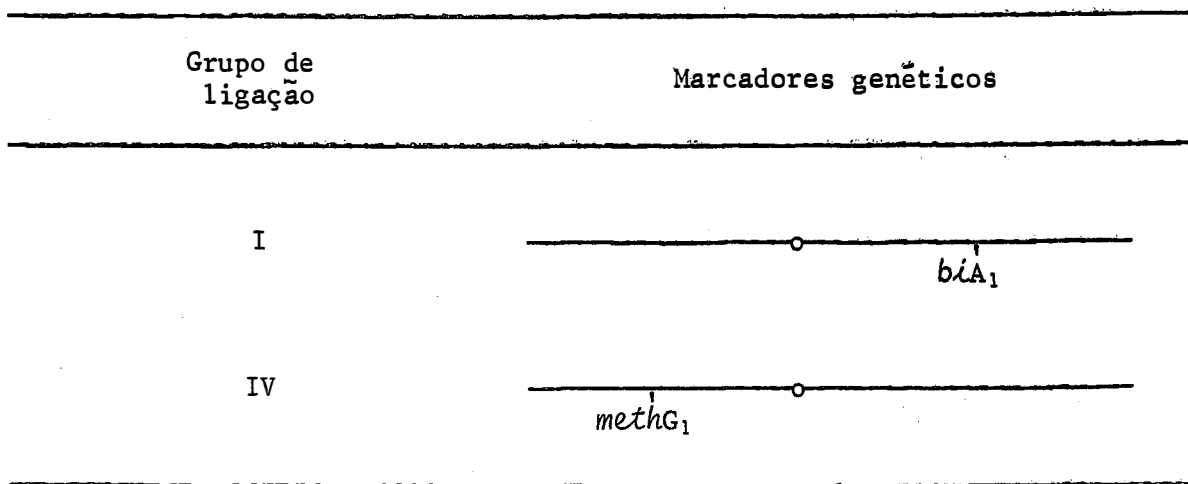


Os centrômeros estão designados por o. Os fenótipos dos marcadores genéticos podem ser encontrados no item 3.1.5. As posições dos marcadores genéticos não estão em escala no mapa.

3.1.2. Linhagem biA_1 ; $methG_1$

Sua constituição genética é apresentada na Figura 2.

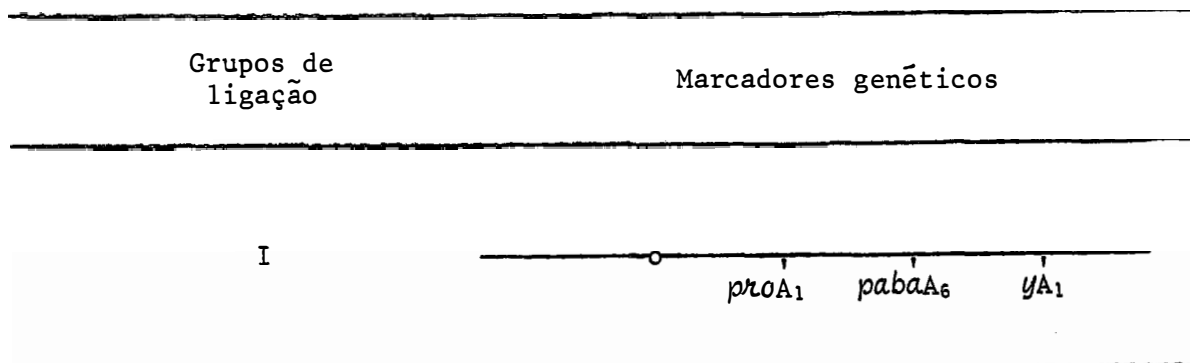
Figura 2 - Marcadores genéticos da linhagem biA_1 ; $methG_1$.



Os centrômeros estão designados por o. Os fenótipos dos marcadores genéticos são encontrados no item 3.1.5. As posições dos marcadores genéticos não estão em escala no mapa.

3.1.3. Linhagem $proA_1$; $pabaA_6$; yA_1

Sua constituição genética é apresentada na Figura 3.

Figura 3 - Marcadores genéticos da linhagem $proA_1$; $pabaA_6$; yA_1 .

O centrômero está designado por o. Os fenótipos dos marcadores genéticos são encontrados no ítem 3.1.5. As posições dos marcadores genéticos não estão em escala no mapa.

3.1.4. Linhagem diplóide $biA_1//MSE$.

Obtida a partir de um heterocário constituído pelas linhagens biA_1 e MSE.

As três primeiras linhagens são originárias do Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra; o diplóide $biA_1//MSE$ foi cedido por MENEZES (não publicado), Instituto de Genética, ESALQ; os mutantes morfológicos 1, 2 e 3 foram cedidos por ROSATO (não publicado).

3.1.5. Marcadores genéticos e fenótipos dos mutantes utilizados

<u>Marcador</u>	<u>F e n ó t i p o</u>
<i>adE₂₀</i>	Requisito para adenina.
<i>biA₁</i>	Requisito para biotina.
<i>facA₃₀₃</i>	Incapaz de crescer em meio contendo acetato como única fonte de carbono.
<i>galA₁</i>	Incapaz de crescer em meio contendo galactose como única fonte de carbono.
<i>methG₁</i>	Requisito para metionina.
<i>nicB₈</i>	Requisito para ácido nicotínico.
<i>pabaA₆</i>	Requisito para ácido <i>p</i> -aminobenzóico.
<i>proA₁</i>	Requisito para prolina.
<i>pyroA₄</i>	Requisito para piridoxina.
<i>riboB₂</i>	Requisito para riboflavina.
<i>sB₃</i>	Requisito para tiosulfato.
<i>suA₁adE₂₀</i>	Supressor do mutante <i>adE₂₀</i> .
<i>yA₁</i>	Conídios amarelos.
<i>wA₃</i>	Conídios brancos.

3.2. Meios de cultura e soluções usadas

3.2.1. Meio mínimo

Preparado de acordo com PONTECORVO e col. (1953).

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Glicose	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada.	1.000 ml

pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%.

3.2.2. Meio completo

Preparado de acordo com PONTECORVO e col. (1953). É constituído de meio mínimo adicionado de:

Peptona	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Extrato de levedura	0,5 g
Solução de vitaminas.	1,0 ml
Ácido nucleico de levedura hidrolisado	2,5 ml

pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%.

3.2.3. Solução de vitaminas

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

A solução foi posteriormente esterilizada em banho-maria por 15 minutos e guardada em frascos escuro, no refrigerador à 4°C, sob clorofórmio.

3.2.4. Solução de ácido nucleico de leveduras

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

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

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

3.2.5. Meio de acetato de amônio

Preparado de acordo com APIRION (1962).

Acetato de amônio	12,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
NaCl	2,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Ágar	15,0 g
Água destilada.	1.000 ml

pH ajustado para 6,1 com NaOH 4%.

3.2.6. Meio mínimo de galactose

Preparado da mesma forma que o meio mínimo (item 3.2.1.), substituindo-se a glicose por galactose como fonte de carbono.

3.2.7. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

Ao meio mínimo líquido, adicionou-se 2% do meio completo, distribuiu-se 2,5 ml por tubo e autoclavou-se.

3.2.8. Solução salina (0,89%)

NaCl	8,9 g
Água destilada	1.000 ml

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

3.2.9. Solução de tween - 0,1% (v/v)

tween 80.	0,1 ml
Água destilada.	100 ml

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

3.2.10. Solução de cloroneb - 2%

(1,4-dicloro - 2,5-dimetoxil benzeno)

Cloroneb	100 mg
Água destilada	50 ml

A solução foi esterilizada em banho-maria por 15 minutos e conservada no refrigerador à 4°C.

3.2.11. Solução fosfato pH 7,0

KH ₂ PO ₄	5,304 g
KH PO ₄	10,614 g
Água destilada	1.000 ml

A solução foi autoclavada e conservada em refrigerador à 4°C.

3.2.12. Solução de 8-Metoxipsoraleína (5,0 mg/ml)

8-Metoxipsoraleína	50 mg
Álcool 95%	10 ml

A solução foi autoclavada e conservada em refrigerador à 4°C.

3.2.13. Corante safranina - 0,10%

Safranina	1,0 g
Álcool 95%	100 ml

Retirou-se 10 ml da solução de safranina alcóolica-1,0% e completou-se para 90 ml de água destilada.

3.2.14. Suplementos adicionados ao meio mínimo

Preparou-se o estoque de suplementos adicionando-se cada um deles em água destilada esterilizada. As soluções foram esterilizadas em banho-maria por 15 minutos e conservadas em refrigerador a 4°C.

Solução estoque (100 ml de H ₂ O)		Quantidade adicionada por placa (20 ml de meio de cultura)	Concentração final no meio de cultura
Adenina	500,0 mg	0,1 ml	25,00 µg/ml
Ácido nicotínico	10,0 mg	0,1 ml	0,50 µg/ml
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	5,0 mg	0,1 ml	0,25 µg/ml
Biotina	4,0 mg	0,1 ml	0,20 µg/ml
Metionina	1,0 g	0,1 ml	50,00 µg/ml
Piridoxina	5,0 mg	0,1 ml	0,25 µg/ml
Prolina	1,0 g	0,1 ml	50,00 µg/ml
Riboflavina	10,0 mg	0,1 ml	0,50 µg/ml
Tiosulfato de sódio	2,0 g	0,1 ml	100,00 µg/ml

3.2.15. Placas de análise

Para a análise genética das colonias foram utilizadas placas de Petri contendo meio completo, meio mínimo, meio mínimo suplementado com todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento e meio mínimo suplementado com todos os requisitos, exceto aquele sob análise. Utilizaram-se também placas contendo meio mínimo de galactose e placas

contendo meio de acetato de amônio, suplementadas com todos os requisitos nutricionais.

3.3. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 1 atmosfera de pressão e a 120°C.

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

3.4. Tratamento com agentes mutagênicos

As linhagens MSE e *biA*₁//MSE foram submetidas ao tratamento com 8-metoxipsoraleina juntamente com luz ultra-violeta longa (360 nm). A linhagem *biA*₁; *methG*₁ foi submetida ao tratamento com luz ultra-violeta (253 nm).

3.4.1. Tratamento com luz ultra-violeta (253 nm)

Conídios da linhagem *biA*₁; *methG*₁ foram suspensos em 2,5 ml de solução de tween e agitados para desagregação das cadeias. Em hematómetro estimou-se a quantidade de conídios na suspensão. Retirou-se 1,0ml da suspensão para controle (tempo zero) e o restante foi colocado em pla

ca de Petri e irradiado. A lâmpada utilizada foi "Mineral light" 253 nm.

Após 60 segundos de irradiação, efetuou-se a diluição e 0,1 ml da suspensão foi semeado em placas contendo meio completo. Procedeu-se da mesma forma para o tempo zero. Após 72 horas de incubação procedeu-se a contagem das colônias e, considerando-se as diluições feitas e o volume semeado, estimou-se o número de conídios viáveis por mililitro. A porcentagem de sobrevivência foi calculada em relação ao controle considerado com o nível de 100% de sobrevivência. Através da inspeção visual foram isolados mutantes para morfologia alterada.

3.4.2. Tratamento com 8-Metoxipsoraleína (8-MOP) e luz ultra-violeta longa - 360 nm (UVL)

Conídios das linhagens MSE e biA_1 /MSE foram suspensos separadamente em tubos contendo solução de tween. Após desagregação dos conídios por agitação, foi estimado seu número fazendo-se contagem em hematímetro. Adicionou-se 0,8 ml da suspensão de conídios em tubos de ensaio que continham 0,4 ml da solução de 8-MOP e 8,8 ml da solução de fosfato. Os controles foram realizados do mesmo modo, colocando-se 0,4 ml de álcool 95% em lugar da solução de 8-MOP, perfazendo 10,0 ml por tubo, como segue:

	Tratamento	Controle
Solução de 8-MOP (5,0 mg/ml)	0,4 ml	-
Álcool 95%	-	0,4 ml
Solução de fosfato	8,8 ml	8,8 ml
Suspensão de conídios	0,8 ml	0,8 ml
Volume total	10,0 ml	10,0 ml

Os tubos "tratamento" e "controle" foram incubados no escuro a 37°C por 120 minutos. Decorrido esse tempo as soluções foram transferidas para placas de Petri (4,7 cm de diâmetro) e tratadas com luz UVL por 90 minutos. As suspensões tratadas e as controles foram diluídas convenientemente e semeadas (0,1 ml) em placas contendo meio mínimo para o caso da linhagem diplóide *biA₁//MSE* e em placas com meio completo no caso da linhagem haplóide MSE. Após 72 horas de incubação, procedeu-se a contagem das colônias e, considerando-se as diluições e o volume semeado, estimou-se o número de conídios viáveis por mililitro. A porcentagem de sobrevivência foi calculada em relação ao controle considerado com o nível de 100% de sobrevivência. Através de inspeção visual foram isolados mutantes para morfologia alterada.

3.5. Taxa de crescimento

Linhagens originais (*biA₁*; *methG₁* e MSE) e mutantes com

morfologia alterada (1, 2 ... 7; I,.. V) foram inoculados em placas contendo meio completo. A medida do diâmetro das colônias foi efetuada com 1 a 10 dias de crescimento.

3.6. Taxa de conidiação

Mutantes morfológicos e suas linhagens originais foram inoculados em placas contendo meio completo. Após 5 dias de incubação retiraram-se das mesmas, áreas medindo 1,5 cm de diâmetro. Essas áreas das colônias foram colocadas individualmente em tubos de ensaio contendo solução de tween e agitadas por 60 segundos para desagregação dos conídios. Estimou-se o número de conídios na suspensão por contagem em hematímetro.

3.7. Análise microscópica

Para tal análise utilizou-se a técnica de cultivo em lâmina.

Em placas contendo meio completo já sólido, colocou-se uma lâmina esterilizada. Fizeram-se quatro inóculos ao redor da lâmina a uma distância aproximada de 1 cm dela. Tal procedimento foi realizado para os mutantes morfológicos e linhagens originais (*biA*₁; *methG*₁ e MSE). Após 72 horas de incubação o micélio desenvolveu-se crescendo sobre a lâmina. Esta foi retirada e colocada sobre lâmina com uma gota do corante safranina alcóolica. Realizaram-se observações microscópicas das

hifas, conídios e aparelho conidial. Efetuaram-se também medidas do comprimento do conidióforo, da vesícula e do pedúnculo; largura do pedúnculo da vesícula e diâmetro dos conídios com auxílio de uma ocular micrométrica (Ernest Leitz Wetzlar St 6x) e objetiva de 40 vezes. Para medida de diâmetro dos conídios usou-se a objetiva de 100 vezes. A Figura 4 apresenta um esquema do aparelho conidial e indicações dos locais onde se efetuaram as medidas.

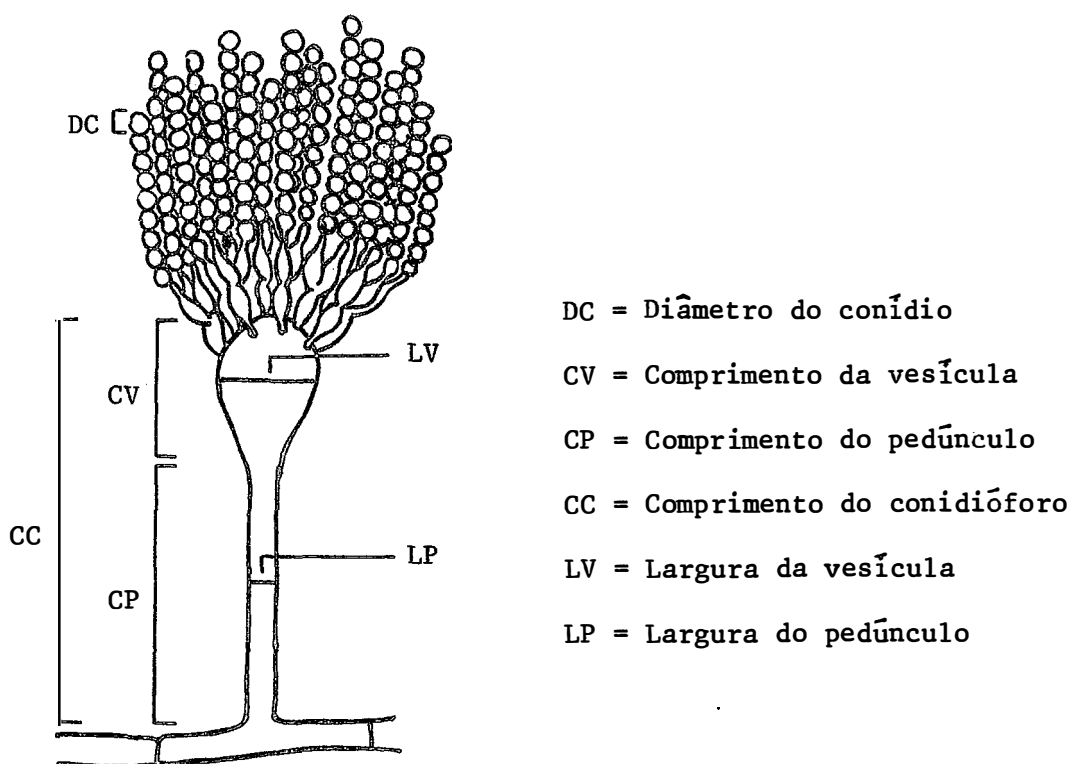


Figura 4 - Esquema do aparelho conidial indicando os locais de medidas.

3.8. Análise genética

3.8.1. Obtenção de heterocários

Utilizou-se o método descrito por PONTECORVO e col.(1953).

Em tubos de ensaio contendo meio mínimo líquido mais 2% de meio completo colocaram-se conídios dos mutantes morfológicos provenientes da linhagem *biA₁*; *methG₁* (1, 2, ... 7) e conídios da linhagem MSE ou MSF que requerem diferentes fatores de crescimento. O mesmo procedimento foi utilizado para obtenção de heterocários entre os mutantes provenientes da linhagem MSE (I, II, ... V) e linhagem *proA₁*; *pabaA₆*; *yA₁*. Após 3 a 4 dias de incubação, formou-se uma película na superfície do meio. Transferiram-se essas películas para placas contendo meio mínimo as quais após 7 a 10 dias de incubação, deram origem a setores heterocarióticos que continham núcleos geneticamente diferentes na mesma hifa, o que permitiu o crescimento.

3.8.2. Análise mitótica

Esta foi realizada através do ciclo parassexual, segundo o método de ROPER (1952). Nos setores heterocarióticos, obtidos de acordo com o método descrito no item 3.8.1., a maioria dos conídios formados são haplóides e não conseguem desenvolver-se em meio mínimo, porém pode haver fusão de núcleos haplóides formando núcleos diplóides heterozigotos que originam conídios diplóides que são capazes de se desenvolverem em meio mínimo. Pelo fato da porcentagem de aparecimento de conídios diplóides ser muito baixa, transferiu-se grande quantidade de conídios dos setores heterocarióticos para solução de tween (aproximadamente 10^7 conídios por ml) e semeou-se em placas contendo meio mínimo. Após 72 horas de incubação isolaram-se diplóides heterozigotos. Como critério para identificação dos diplóides baseou-se na capacidade de crescimento em meio mínimo

e diâmetro dos conídios. A medição do diâmetro dos conídios foi realizada em microscópio com ocular micrométrica, tomando-se cadeias de 5 conídios em lâmina com lisol diluído (1:10).

Os diplóides obtidos foram induzidos a haploidização com uso de Cloroneb (AZEVEDO e SANTANA, 1975) que inibe o crescimento de diplóides, permitindo o crescimento de setores haplóides. A haploidização ocorre através da aneuploidia com perdas sucessivas de cromossomos (KÄFER, 1961). A técnica consiste em adicionar 2,5 ml da solução a 2% de cloroneb em 200 ml de meio completo. Os diplóides foram inoculados nessas placas através de estrias (a fim de se obter maior número de setores haplóides) e após 7 a 10 dias de incubação surgiram setores verdes, amarelos, brancos ou morfológicos dependendo do cruzamento. Após se proceder o isolamento e purificação dos setores haplóides em meio completo, estes foram inoculados um a um em 26 pontos fixos em placa com meio completo. Após 3 dias de incubação, essa placa serviu como placa mestra que foi replicada para as placas de análise através de um replicador de níquel-cromo. Com 24, 48 e 72 horas de incubação efetuou-se a leitura das placas de análise anotando-se as colônias que cresceram e as que não cresceram.

3.8.3. Análise meiótica

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

O heterocário obtido conforme ítem 3.8.1. foi transferido para placas contendo meio mínimo. As placas foram vedadas com fita celulósica, para favorecer a formação de cleistotécios, e incubados por 10 dias. Sob lupa, com auxílio de um fio de platina, os cleistotécios maduros foram retirados e rolados em placas com meio mínimo, a fim de libertá-los das células de Hülle e conídios aderentes. Cada cleistotécio limpo foi transferido para tubos de ensaio contendo solução de tween e rompidos na parede do tubo, libertando dessa forma os ascósporos. Com a mesma pipeta utilizada para o esmagamento, a parede do tubo foi lavada suspendendo dessa forma os ascósporos na solução de tween. Em placas com meio completo, semeou-se 0,1 de cada solução sendo o restante conservado em refrigerador. Após 3 dias de incubação foi possível verificar se os cleistotécios eram híbridos. Os cleistotécios autofecundados foram descartados. Dentre os híbridos escolheu-se um para análise dos ascósporos.

Os ascósporos do cleistotécio selecionado foram semeados em placas contendo meio completo e após 3 dias de incubação foram transferidos para as placas mestras que contêm meio completo. Após 3 dias de incubação as colônias foram replicadas para as placas de análise com auxílio do replicador. Leitura das placas de análise procedeu-se após 24, 48 e 72 horas.

Para verificação do tipo de segregação do caráter sob análise, os ascósporos foram semeados em placas com meio completo e após incubação por 3 dias procedeu-se a contagem das diferentes classes de recombinantes.

3.8.4. Teste do heterocário

O teste do heterocário foi efetuado de acordo com JINKS (1963). Esse teste nos dá indicação se o caráter morfológico é determinado por fatores citoplasmáticos ou não.

Após preparo do heterocário conforme item 3.8.1., com auxílio de uma alça de platina retiraram-se os conídios formados pelo heterocário os quais foram colocados em tubos contendo solução de tween. Após estimado seu número em hematímetro e diluição conveniente, foram semeados em placas contendo meio completo. Após 3 dias de incubação as colônias foram transferidas para placas de análise contendo meio mínimo, meio mínimo suplementado com os requisitos nutricionais de uma ou outra linhagem envolvida no cruzamento.

3.9. Análise estatística

Para as medidas do diâmetro de colônia, comprimento do pendúnculo, da vesícula e do conidióforo e largura do pendúnculo e da vesícula foi realizada análise da variância segundo o esquema:

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre tratamentos	13	S ₁	Q ₁	Q ₁ /Q ₆
Entre variantes G ₁	6	S ₂	Q ₂	Q ₂ /Q ₆
Entre variantes G ₂	4	S ₃	Q ₃	Q ₃ /Q ₆
Original G ₁ vs original G ₂	1	S ₄	Q ₄	Q ₄ /Q ₆
Entre grupos	2	S ₅	Q ₅	Q ₅ /Q ₆
Resíduo	266	S ₆	Q ₆	
Total	279			

Para taxa de condição a análise da variância foi realizada da segundo o esquema:

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre tratamentos	13	S ₁	Q ₁	Q ₁ /Q ₂
Col. dentro do tratamento	14	S ₂	Q ₂	Q ₂ /Q ₃
Repet. dentro da colônia	28	S ₃	Q ₃	
Total	55	S ₄		
Entre variantes G ₁	6	S ₅	Q ₄	Q ₄ /Q ₂
Entre variantes G ₂	4	S ₆	Q ₅	Q ₅ /Q ₂
Original G vs original G ₂	1	S ₇	Q ₆	Q ₆ /Q ₂
Entre grupos	2	S ₈	Q ₇	Q ₇ /Q ₂

O valor de recombinação (C) foi calculado pela fórmula:

$$C = \frac{\text{número de recombinantes}}{\text{nº total de ascósporos}} \times 100$$

Para detecção de diferenças de cada mutante com sua linhagem original foi utilizado teste Dunnett; comparações dos mutantes entre si foram realizados pelo teste de Tukey (STEEL e TORRIE, 1960).

4. RESULTADOS

4.1. Sobrevivência aos agentes mutagênicos

4.1.1. Sobrevivência a 8-Metoxipsoraleína (8-MOP) e luz ultra-violeta longa (UVL) (360 nm)

A Tabela 2 apresenta o número e a porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem haplóide MSE submetida ao tratamento com 8-MOP e UVL. Na Tabela 3 encontraram-se o número e a porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem diplóide $bia_1//$ MSE submetidos ao tratamento com 8-MOP e UVL.

4.1.2. Sobrevivência à luz ultra-violeta (253 nm)

O número e a porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem haplóide $bia_1; methG_1$ submetida ao tratamento com luz UV estão representados na Tabela 4.

Tabela 2 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes a 8-MOP e UVL. Linhagem MSE.

	Conídios viáveis/ml			% relativa de sobreviventes			
	Repetições			Repetições			
	1a.	2a.	3a.	1a.	2a.	3a.	
Controle	$6,43 \times 10^5$	$8,24 \times 10^4$	$3,44 \times 10^4$	100,00	100,00	100,00	100,00
Tratamento	$4,60 \times 10^2$	$2,50 \times 10$	$4,30 \times 10$	0,07	0,03	0,12	0,07

Tabela 3 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes a 8-MOP e UVL. Linhagem *biA₁* // MSE.

	Conídios viáveis/ml		% relativa de sobreviventes		Média
	R e p e t i ç õ e s		R e p e t i ç õ e s		
	1a.	2a.	1a.	2a.	
Controle	$5,42 \times 10^6$	$6,23 \times 10^5$	100,00	100,00	100,00
Tratamento	$9,58 \times 10^4$	$7,60 \times 10^3$	1,76	1,21	1,48

Tabela 4 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes à luz UV. Linhagem *biA₁*; *methG₁*.

	Conídios viáveis/ml		% relativa de sobreviventes		Média
	R e p e t i ç õ e s		R e p e t i ç õ e s		
	1a.	2a.	1a.	2a.	
Controle	$1,96 \times 10^7$	$2,42 \times 10^6$	100,00	100,00	100,00
Tratamento (60 seg)	$2,85 \times 10^6$	$4,30 \times 10^5$	14,54	17,76	16,15

4.2. Isolamento e características dos variantes morfológicos obtidos

Colônias com morfologia alterada foram identificadas através de inspeção visual, baseando-se à priori na coloração, tamanho e conidiação da colônia. Foram identificados e isolados 12 variantes sendo 7 deles, provenientes da linhagem *biA₁; methG₁* tratada com luz UV e 5, da linhagem MSE submetida ao tratamento com 8-MOP e UVL.

Os derivados morfológicos da linhagem *biA₁; methG₁* foram numerados de acordo com a ordem de isolamento e designados por algarismos arábicos, os derivados da linhagem MSE foram designados por algarismos romanos.

Quanto a coloração, os variantes morfológicos apresentaram tonalidade diversas indo de rosa a marrom. Com relação ao tamanho das colônias, alguns derivados foram compactos, outros apresentaram tamanho semelhante à linhagem original, sendo algumas das colônias morfológicas, enrugadas no centro e outras com enrugamento até à periferia e bordo irregular.

A conidiação dos derivados morfológicos obtidos variou desde praticamente nula em alguns, até quase normal em outros; em nenhum caso, no entanto, obteve-se conidiação igual à das linhagens originais.

As Tabelas 5 e 6 apresentam uma descrição sumária das principais características desses derivados com morfologia alterada. As Figuras 5 a 18 mostram os derivados morfológicos e as linhagens *biA₁; meth G₁* e MSE de onde eles se originaram.

Tabela 5 - Descrição sumária dos variantes morfológicos derivados da linhagem *b1A₁*; *methG₁* submetida ao tratamento com luz UV.

Variante	M o r f o l o g i a
1	micélio vermelho, compacto, enrugado, apresenta setores, bordo irregular, conidiação bastante escassa.
2	micélio roxo, compacto, enrugado, bordo regular, conidiação bastante escassa.
3	micélio marrom, tamanho relativamente pequeno, bordo regular, conidiação escassa, conídios marrons.
4	micélio rosa, tamanho grande, bordo regular, conidiação média, conídios brancos.
5	micélio marrom, tamanho grande, bordo regular, conidiação escassa, conídios verdes.
6	micélio vermelho, tamanho relativamente grande, bordo irregular, conidiação bastante escassa.
7	micélio marrom, tamanho relativamente grande, bordo regular, conidiação média, conídios brancos.

Tabela 6 - Descrição sumária dos variantes morfológicos derivados da linhagem MSE submetida ao tratamento com 8-MOP e UVL.

Variante	M o r f o l o g i a
I	micélio vermelho, tamanho relativamente grande, bordo regular, conidiação bastante escassa.
II	micélio marrom claro, tamanho médio, bordo regular, conidiação relativamente escassa, conídios marrom-claros.
III	micélio marrom claro, tamanho médio, bordo regular, conidiação relativamente escassa, conídios marrom-claros.
IV	micélio marrom, tamanho grande, bordo regular, conidiação relativamente escassa, conídios brancos.
V	micélio marrom, tamanho relativamente grande, bordo regular, conidiação relativamente escassa, conídios marrom-claros.



Figura 5 - Linhagem *biA*₁; *methG*₁.



Figura 6 - Variante morfológico 1.



Figura 7 - Variante morfológico 2.

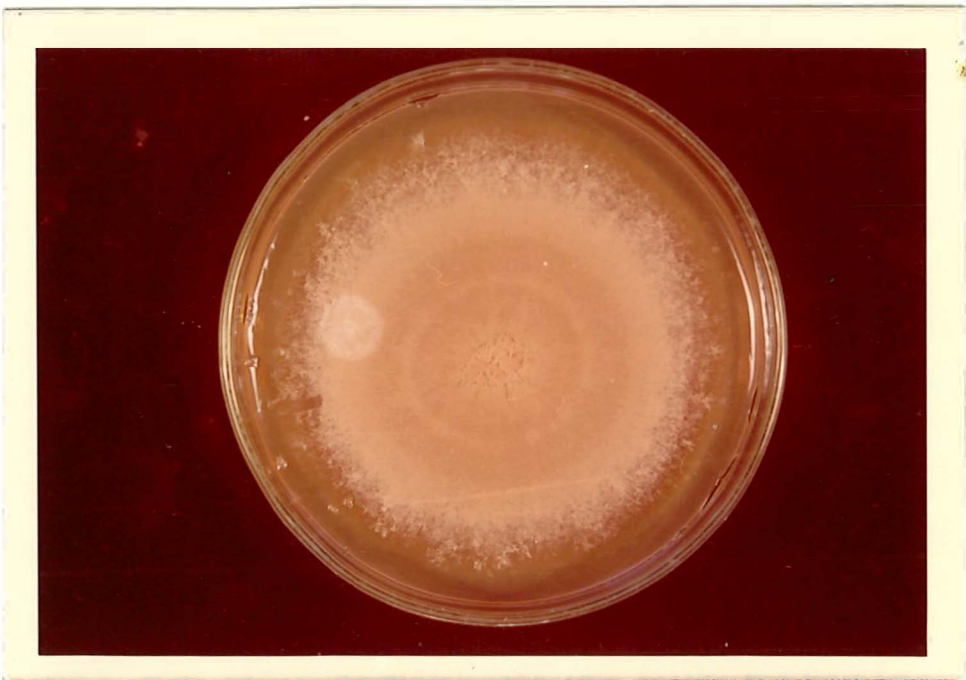


Figura 8 - Variante morfológico 3.



Figura 9 - Variante morfológico 4.



Figura 10 - Variante morfológico 5.



Figura 11 - Variante morfológico 6.



Figura 12 - Variante morfológico 7.

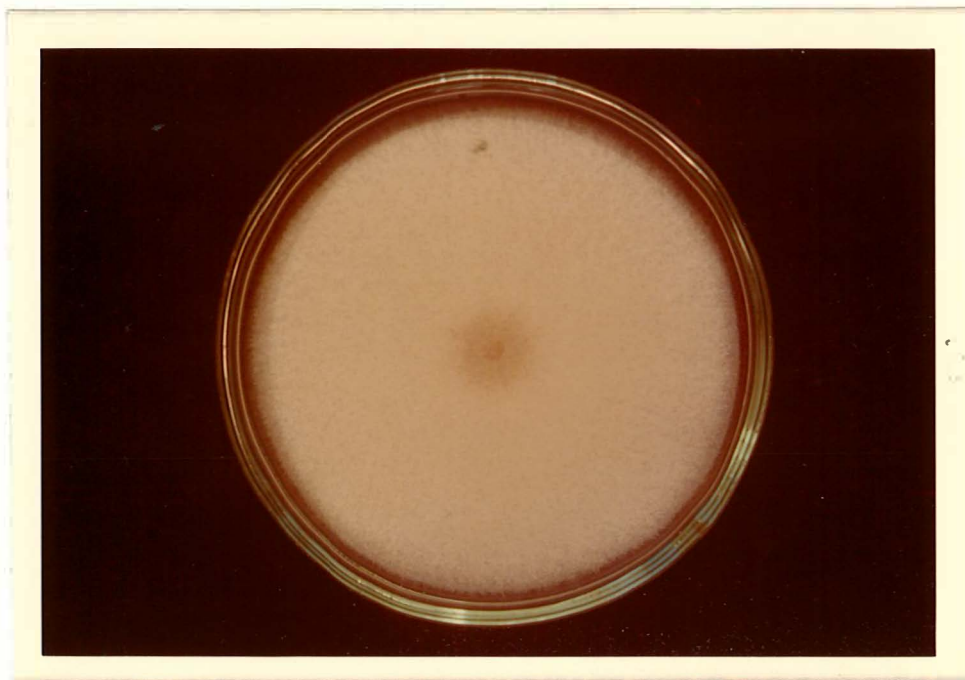


Figura 13 - Linhagem MSE.



Figura 14 - Variante morfológico I.

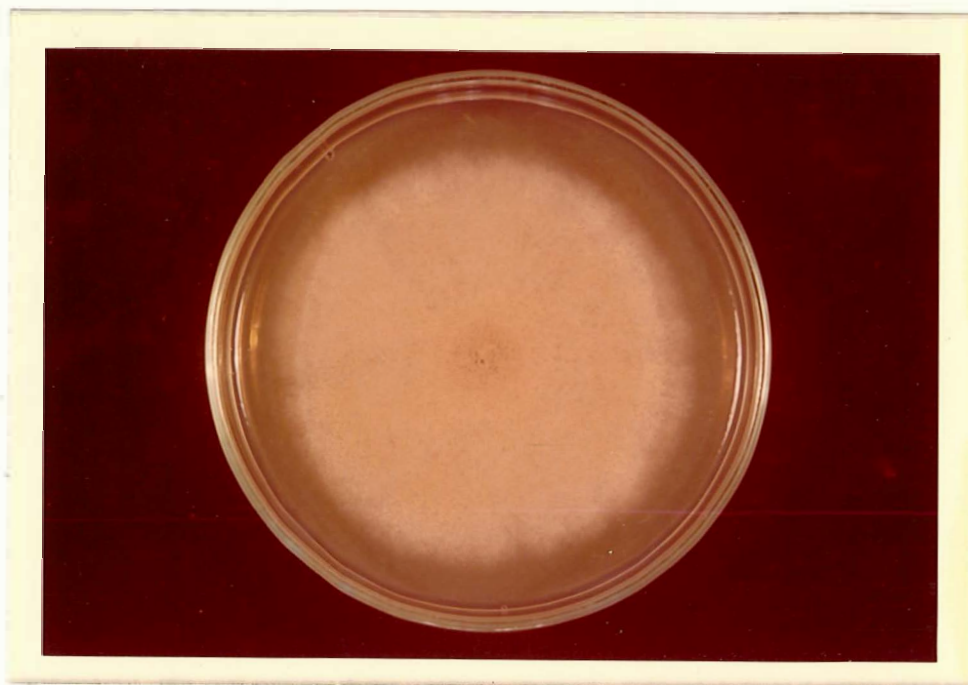


Figura 15 - Variante morfológico II.

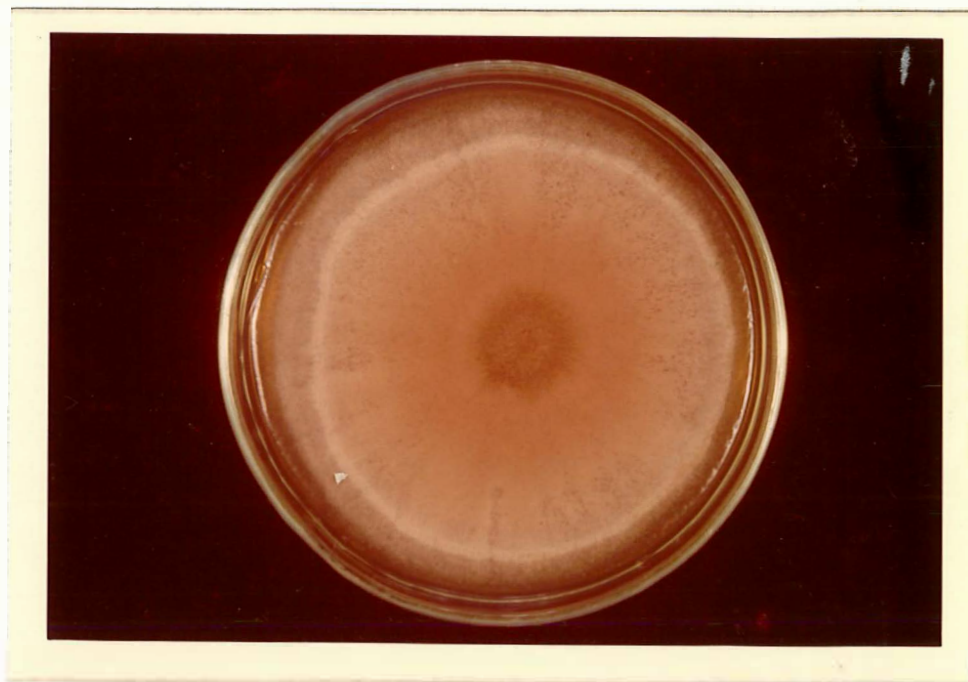


Figura 16 - Variante morfológico III.

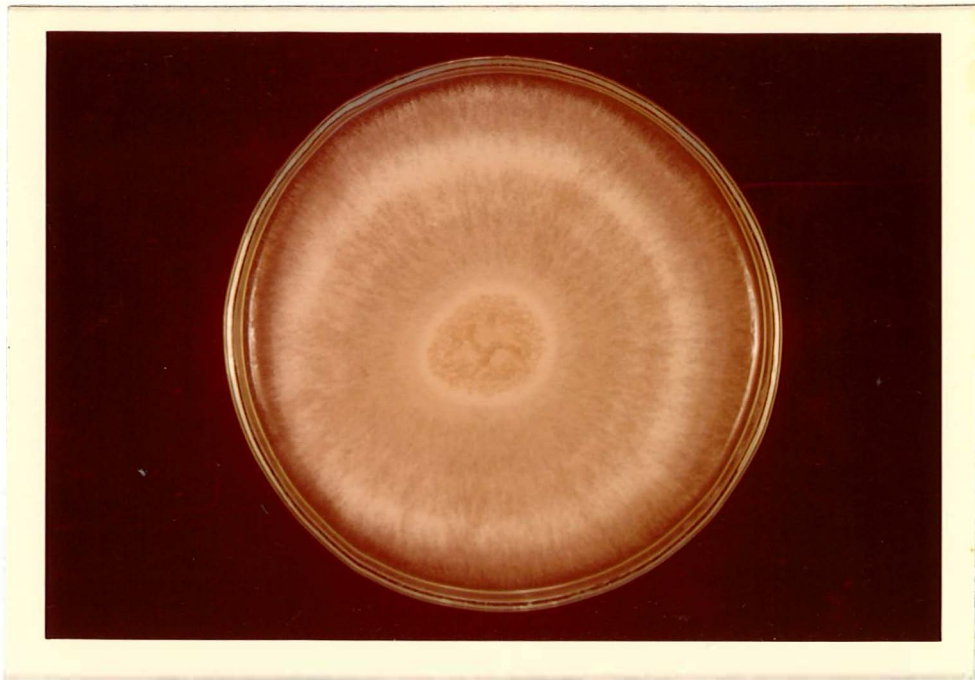


Figura 17 - Variante morfológico IV.



Figura 18 - Variante morfológico V.

4.3. Taxa de crescimento dos variantes morfológicos

A Tabela 7 mostra o diâmetro das colônias da linhagem biA_1 ; $methG_1$ e dos variantes com morfologia alterada originados dessa linhagem. A Tabela 8 apresenta o diâmetro das colônias da linhagem MSE e dos variantes morfológicos originados dessa linhagem. As medidas foram efetuadas com 1 a 10 dias após a inoculação. Nas Figuras 19 e 20 estão representados os valores de crescimento concernentes as Tabelas 7 e 8. A análise da variância realizada para o 6º dia de crescimento está representada na Tabela 9.

Tabela 7 - Diâmetro (média de 10 colônias) da linhagem biA_1 ; $methG_1$ e seus derivados morfológicos após 1 a 10 dias de crescimento. (Diâmetro das colônias em cm).

Variante número	Dias (Diâmetro das colônias em cm)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,44	0,80	1,02	1,43	1,50	2,08	2,19	2,81	3,08	3,17
2	0,40	0,90	1,20	1,90	2,05	2,33	2,42	3,00	3,23	3,43
3	0,41	1,20	1,81	2,11	3,17	3,90	4,89	4,90	6,32	7,27
4	0,67	2,77	3,52	4,71	7,00	7,73	8,51	8,52	8,55	8,56
5	0,70	2,66	4,08	5,27	6,31	7,39	8,35	8,38	8,43	8,71
6	0,55	2,18	3,61	4,18	4,63	6,71	7,78	8,52	8,58	8,67
7	0,84	2,54	4,07	4,09	5,73	6,17	7,87	8,27	8,33	8,67
biA_1 ; $methG_1$	0,98	2,67	4,29	5,62	7,81	8,32	8,50	8,62	8,64	8,78

DMS
(5%) TUKEY 0,5075
DUNNETT 0,4129

Tabela 8 - Diâmetro (média de 10 colônias) da linhagem MSE e variantes morfológicas após 1 a 10 dias de crescimento. (Diâmetro das colônias em cm).

Variante número	Dias (Diâmetro das colônias em cm)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	0,66	2,62	3,72	4,63	6,06	7,92	8,42	8,57	8,65	8,68
II	0,65	1,52	2,51	3,59	5,04	5,21	5,59	7,54	8,01	8,11
III	0,65	1,66	2,93	3,57	3,68	5,87	7,24	8,18	8,28	8,41
IV	1,05	2,44	4,35	5,21	6,93	8,47	8,55	8,84	8,92	8,97
V	0,91	2,55	3,66	4,06	5,65	7,95	8,29	8,43	8,59	8,81
MSE	0,98	2,88	4,80	5,95	7,94	8,39	8,65	8,69	8,70	8,84

DMS TUKEY 0,5075
 (5%) DUNNETT 0,3947

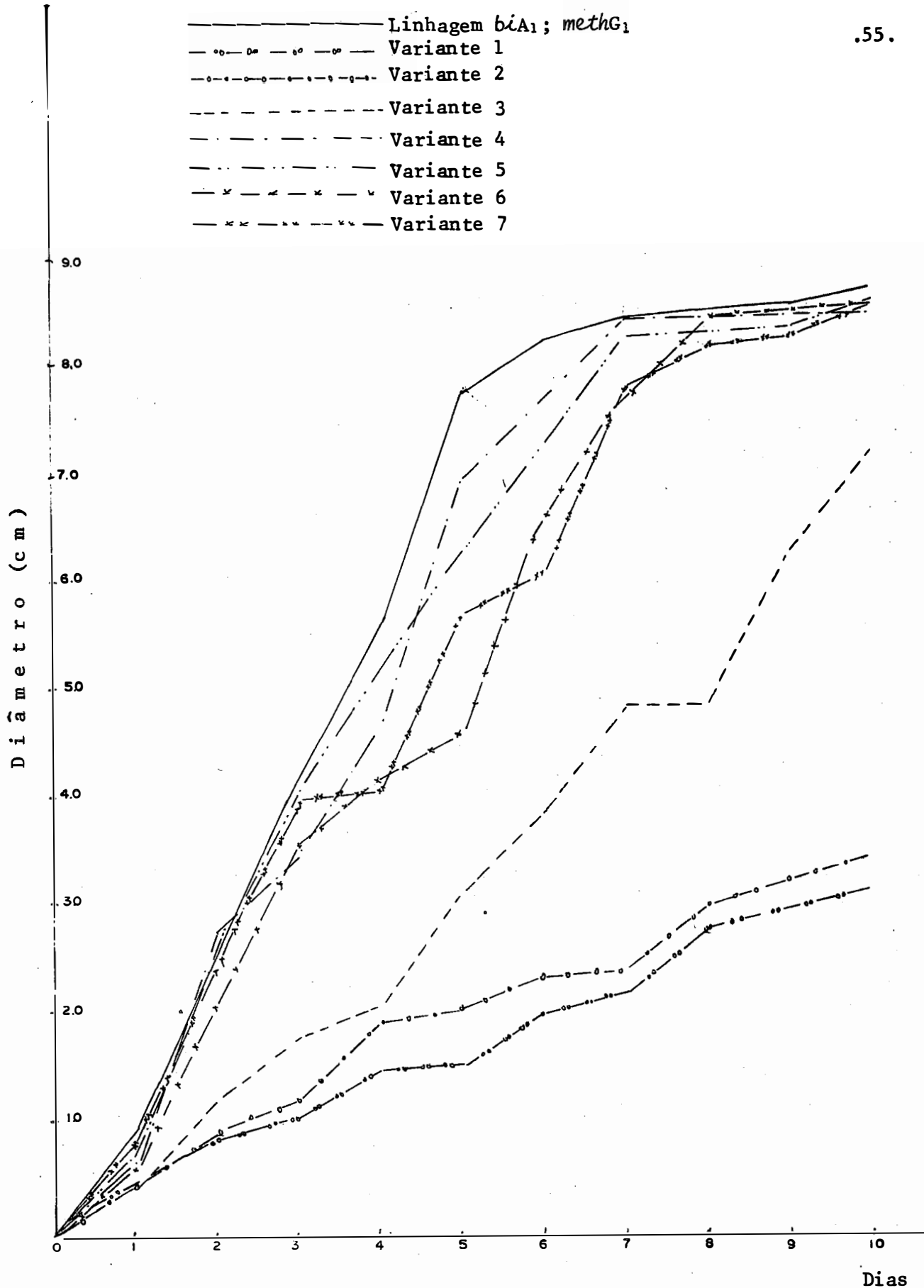


Figura 19 - Diâmetro das colônias com 1 a 10 dias de crescimento. Linhagem *biA*₁; *methG*₁ e morfológicos.

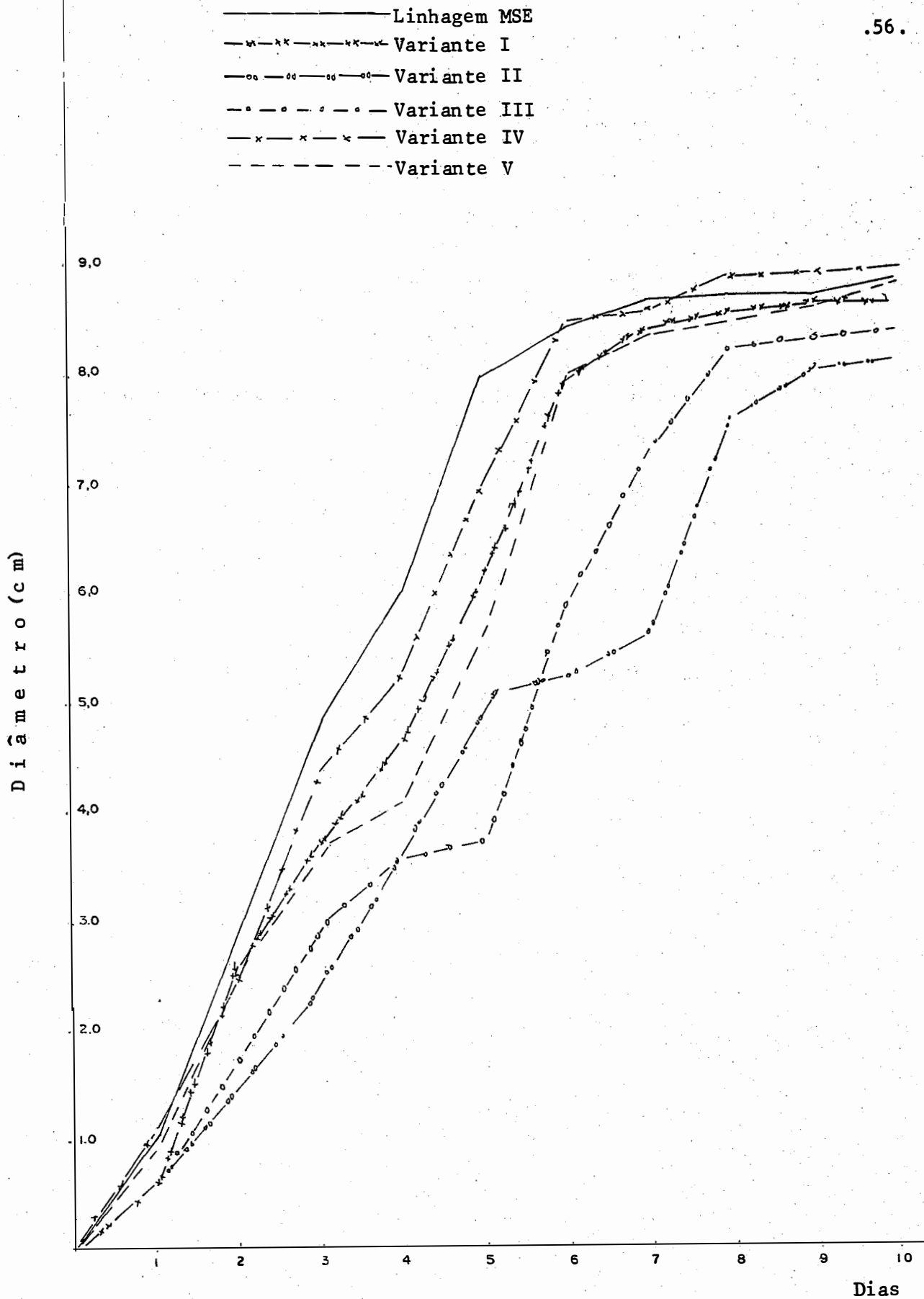


Figura 20- Diâmetro das colônias com 1 a 10 dias de crescimento.
Linhagem MSE e morfológicas.

Tabela 9 - Análise da variância para diâmetro das colônias com 6 dias de crescimento.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre tratamentos	13	626,2049	48,1696	414,18**
Entre variantes G ₁	6	340,7814	56,7969	488,36**
Entre variantes G ₂	4	83,5552	20,8888	179,61**
Original G ₁ vs original G ₂	1	0,0245	0,0245	0,21 n.s.
Entre grupos	2	201,8438	100,9219	867,77**
Resíduo	126	14,6540	0,1163	
Total	139	640,8589		

CV = 5,40%.

n.s. = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Significado das abreviações de todas as análises da variância:

G₁ = grupo 1, que corresponde à linhagem *bíA₁*; *methG₁* e variantes morfológicas dela provenientes (1, 2, ... 7).

G₂ = grupo 2, que corresponde à linhagem MSE e variantes morfológicas dela provenientes (I, II, ... V).

4.4. Conidiação

Através da contagem de conídios em área determinada, foi possível avaliar a capacidade de conidiação dos variantes morfológicos. A Tabela 10 apresenta o número de conídios da linhagem *biA₁; methG₁* e derivados morfológicos originários dessa linhagem. O número de conídios da linhagem MSE e seus derivados morfológicos é mostrada na Tabela 11.

A Tabela 12 mostra a análise da variância para o número de conídios das linhagens originais e derivados morfológicos.

Tabela 10 - Número de conídios (média de 4 repetições) da linhagem *biA₁; methG₁* e derivados morfológicos.

Mutante	Número de conídios (x 10 ⁴ /ml)
1	1,00
2	2,25
3	17,25
4	85,25
5	12,00
6	0,50
7	41,25
<i>biA₁; methG₁</i>	254,25

DMS TUKEY 0,3943
(5%) DUNNETT 0,3298

Tabela 11 - Número de conídios (média de 4 repetições) da linhagem MSE e derivados morfológicos.

Mutante	Número de conídios (x 10 ⁴ /ml)
I	0,75
II	28,50
III	35,75
IV	25,25
V	27,50
MSE	237,00

DMS TUKEY 0,3943
(5%) DUNNETT 0,3028

Tabela 12 - Análise da variância para o número de conídios das linhagens originais e respectivos variantes morfológicos.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre tratamentos	13	29,0079	2,2314	474,76**
Col. dentro do tratamento	14	0,0655	0,0047	0,19 n.s.
Repetição dentro da colonia	28	0,6878	0,0246	
Total	55	29,7613		
Entre variantes G ₁	6	11,4783	1,9130	407,03**
Entre variantes G ₂	4	4,9349	1,2337	262,49**
Original G ₁ vs original G ₂	1	0,0017	0,0017	0,36 n.s.
Entre grupos	2	12,5929	6,2964	1339,66**

n.s. = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

4.5. Análise microscópica

4.5.1. Características microscópicas dos variantes morfológicos

Através da análise microscópica, foi possível detectar-se alterações na estrutura conidial e micélio dos variantes analisados. A Tabela 13 apresenta as características dos morfológicos oriundos da linhagem *bia*₁; *methG*₁. As características dos variantes morfológicos provenientes da linhagem MSE são mostradas na Tabela 14.

As Figuras 21 a 34 são fotografias ao microscópio dos variantes morfológicos e respectivas linhagens originais.

Tabela 13 - Características microscópicas dos variantes morfológicos provenientes da linhagem *bia*₁; *methG*₁.

Variante	Características microscópicas
1	Hifas e estruturas conidiais apresentam-se transparentes; células hifais são menores em comprimento e algumas bastante tortuosas; a hifa apresenta estruturas globosas intercaladas com células normais; ramificação frequente e origina-se das estruturas globosas, de células normais ou tortuosas; estrutura conidial apresenta pedúnculo, vesícula, esterígmias primários e secundários; pedúnculo do conidióforo origina-se a partir das estruturas globosas, das células normais ou das células tortuosas; há poucas estruturas conidiais e poucos conídios; conidióforos ligeiramente mais curtos.

Continua

Tabela 13 - Continuação.

Variante	Características microscópicas
2	<p>Hifas e estruturas conidiais apresentam-se transparentes; células hifais são bem menores em comprimento ou seja septação é bastante próximas; hifa bastante tortuosa e apresenta estruturas globosas intercaladas com células normais; ramificações bastante próximas originando-se das células normais ou globosas; estrutura conidial apresenta pedúnculo, vesícula, esterígm^{as} primários e secundários; pedúnculo origina-se de células normais ou globosas e não se nota célula podal típica; há poucas estruturas conidiais e poucos conídios; conidióforos curtos.</p>
3	<p>Hifas e estruturas conidiais apresentam-se transparentes; células hifais de comprimento e morfologia normal; hifas com células normais e tortuosas; ramificação frequente; estrutura conidial apresenta pedúnculo, vesícula, esterígm^{as} primários e secundários; esterígm^{as} primários mais longos que o normal; alguns conidióforos originam-se de célula podal típica, outros não; há muitas estruturas conidiais e quantidade reduzida de conídios; conidióforos curtos e alguns septados.</p>
4	<p>Hifas e estruturas conidiais apresentam-se transparentes; células hifais um pouco mais finas que a normal, porém de morfologia normal; ramificação espassada; estrutura conidial apresenta pedúnculo, vesícula, esterígm^{as} primários e secundários; conidióforos com célula podal típica; existe quantidade normal de estruturas conidiais e quantidade média de conídios; conidióforos ligeiramente mais curtos.</p>

Continua

Tabela 13 - Continuação.

Variante	Características microscópicas
5	<p>Estruturas conidiais apresentam-se transparentes, porém as hifas tem tonalidade um pouco mais escura (marrom claro); células hifais são bem menores em comprimento ou seja septação bem mais próximas porém morfologia normal; ramificação esparsa; raramente estruturas globosas aparecem intercalando células hifais; estrutura conidial apresenta pedúnculo, vesícula, esterígmias primários e secundários; célula podal presente; conidióforo septado; quantidade normal de estruturas conidiais e reduzida de conídios; conidióforos mais longos.</p>
6	<p>Hifas e estruturas conidiais apresentam-se transparentes; comprimento das células hifais é bem menor que o normal; apresenta células redondas intercaladas as normais; ramificação esparsa; estrutura conidial apresenta pedúnculo, vesícula, esterígmias primários e secundários; conidióforos origina-se de células normais e é septado; quantidade reduzida de estruturas conidiais e conídios; conidióforos curtos.</p>
7	<p>Hifas são transparentes enquanto que estruturas conidiais são mais escuros (marrom); comprimento das células hifais é bem menor que o normal, são em sua maioria de aparência normal havendo algumas redondas ou sinuosas; ramificação intensa; estrutura conidial apresenta pedúnculo, vesícula, esterígmias primários e secundários; conidióforos septados ou não; quantidade média de estruturas conidiais e reduzida e conídios.</p>

Tabela 14 - Características microscópicas dos variantes morfológicos provenientes da linhagem MSE.

Variante	Características microscópicas
I	<p>Hifas e estruturas conidiais apresentam coloração vermelha clara; células hifais são bem menores em comprimento ou seja septações bem próximas; hifas tortuosas com estruturas globosas intercaladas com células normais; ramificação frequente; estrutura conidial apresenta pedúnculo, vesícula, esterígmias primários e secundários, porém alguns apresentam só pedúnculo ou pedúnculo e vesícula; conidióforos septados ou não; há poucas estruturas conidiais e raríssimos conídios; conidióforos curtos.</p>
II	<p>Hifas e estruturas conidiais transparentes; comprimento de células hifais é menor que o normal, sendo a morfologia de algumas, normal e de outra, sinuosas ou redondas; ramificação esparsa; estrutura conidial apresenta pedúnculo, vesícula, esterígmias primários e secundários; quantidade média de estruturas conidiais e reduzida de conídios; conidióforos curtos.</p>
III	<p>Hifas e estruturas conidiais transparentes; células hifais com comprimento e morfologia normal; ramificação normal; estrutura conidial com pedúnculo, vesícula, esterígmias primários e secundários; quantidade média de estruturas conidiais e reduzida de conídios.</p>

Continua

Tabela 14 - Continuaçãc

Variante	Características microscópicas
IV	<p>Hifas transparentes e estruturas conidiais mais escuras; células hifais com comprimento e morfologia normais; ramificações normal; estrutura conidial apresenta pedúnculo, vesícula, esterígmas primários e secundários; conidióforo origina-se de célula podal típica; quantidade média de estruturas conidiais e reduzida de conídios.</p>
V	<p>Hifas transparentes e estruturas conidiais mais escuras; células hifais com morfologia e comprimento normais; ramificação hifal normal; estrutura conidial apresenta pedúnculo, vesícula, esterígmas primários e secundários; quantidade média de estruturas conidiais e reduzida de conídios; conidióforos mais longos que o normal.</p>



Figura 21 - Microscopia da linhagem $biA_1; methG_1$ (aumento 320 vezes).

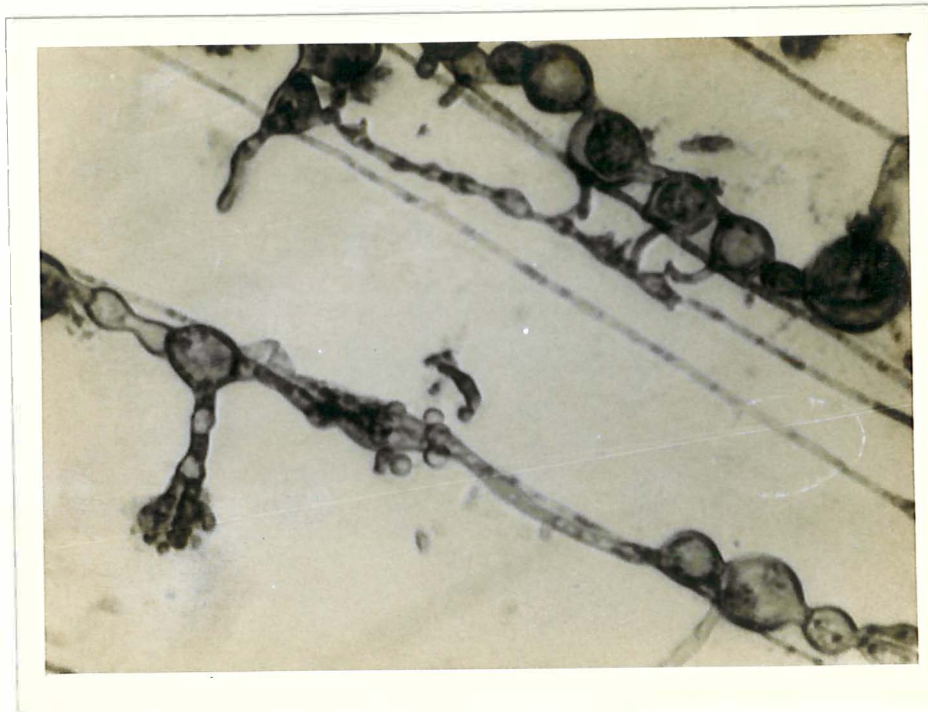


Figura 22 - Microscopia do variante morfológico 1 (aumento 320 vezes).



Figura 23 - Microscopia do variante morfológico 2 (aumento 320 vezes).



Figura 24 - Microscopia do variante morfológico 3 (aumento 320 vezes).



Figura 25 - Microscopia do variante morfológico 4 (aumento 320 vezes).



Figura 26 - Microscopia do variante morfológico 5 (aumento 320 vezes).

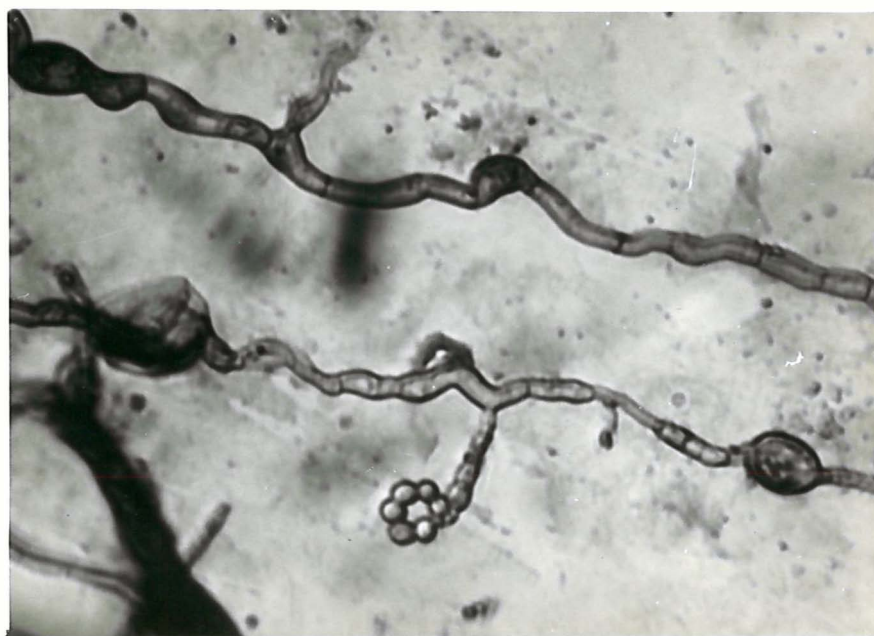


Figura 27 - Microscopia do variante morfológico 6 (aumento 320 vezes).



Figura 28 - Microscopia do variante morfológico 7 (aumento 320 vezes).



Figura 29 - Microscopia da linhagem MSE (aumento 320 vezes).



Figura 30 - Microscopia do variante morfológico I (aumento 320 vezes).

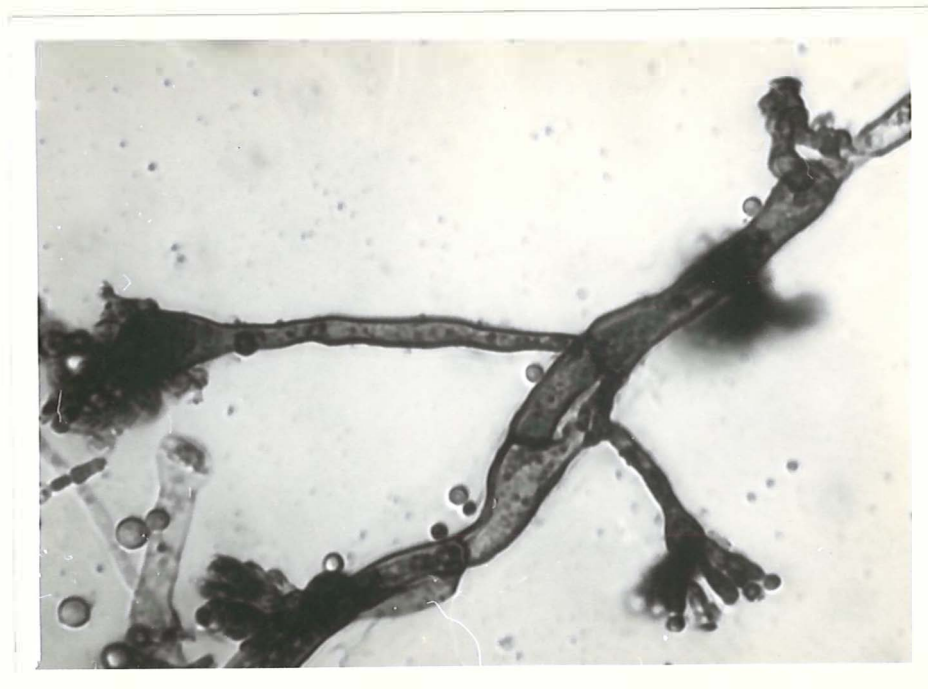


Figura 31 - Microscopia do variante morfológico II (aumento 320 vezes).



Figura 32 - Microscopia do variante morfológico III (aumento 320 vezes).



Figura 33 - Microscopia do variante morfológico IV (aumento 320 vezes).

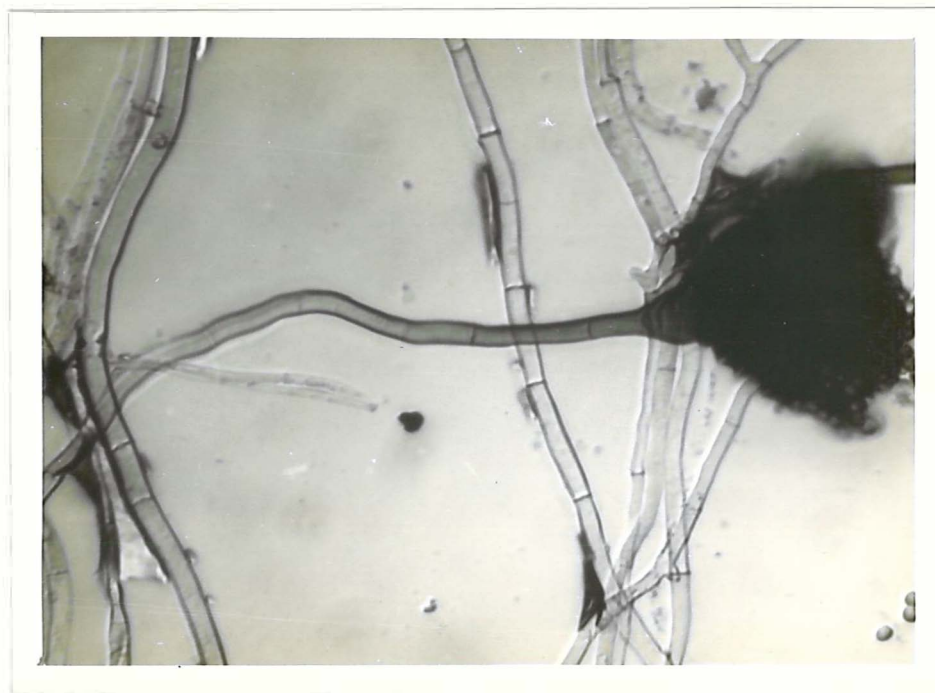


Figura 34 - Microscopia do variante morfológico V (aumento 800 vezes).

4.5.2. Análise métrica da estrutura conidial

A Tabela 15 mostra as medidas do comprimento do pedúnculo, da vesícula e do conidióforo; largura do pedúnculo e da vesícula da linhagem *biA*₁; *methG*₁ e derivados morfológicos originados dessa linhagem. Medidas do comprimento do pedúnculo, da vesícula e do conidióforo; largura do pedúnculo e da vesícula da linhagem MSE e derivados morfológicos originários desta são apresentados na Tabela 16. Análise da variância para medidas do comprimento do pedúnculo, vesícula e conidióforo e largura do pedúnculo e vesícula das linhagens originais e variantes morfológicos são apresentados respectivamente nas Tabelas 17, 18, 19, 20 e 21.

Tabela 15 - Valores médios (de 20 medições) de comprimento do pedúnculo, da vesícula e do conidióforo; largura do pedúnculo e da vesícula da linhagem *biA*₁; *methG*₁ e seus variantes morfológicos.

Variantes	Comprimento (μ)*			Largura (μ)*	
	P	V	C	P	V
1	48,09	8,90	56,90	4,31	7,78
2	36,93	6,92	44,16	3,66	6,09
3	31,14	6,93	37,87	3,70	6,42
4	49,40	8,53	57,94	3,75	8,71
5	85,40	10,22	95,62	4,17	10,03
6	25,87	6,47	32,34	3,00	5,39
7	70,59	10,68	81,28	4,31	9,14
<i>biA</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁	67,47	8,90	76,40	3,98	8,67
DMS	20,6231	2,7280	22,5891	0,8384	1,5951
(5%) TUKEY DUNNETT	16,8260	2,2257	18,4299	0,6840	1,3012

*P = pedúnculo; V = vesícula; C = conidióforo.

Tabela 16 - Valores médios (de 20 medições) do comprimento do pedúnculo, da vesícula e do conidióforo; largura do pedúnculo e da vesícula da linhagem MSE e seus variantes morfológicos.

Variante	Comprimento (μ)*			Largura (μ)*		
	P	V	C	P	V	
I	14,43	6,18	20,62	1,87	3,75	
II	48,09	8,90	57,00	4,31	8,90	
III	76,50	7,97	84,18	4,50	8,49	
IV	79,34	10,03	90,75	3,94	9,00	
V	94,06	12,37	103,59	4,12	10,26	
MSE	73,78	9,57	83,25	3,75	9,75	
DMS	TUKEY	20,6231	2,7280	22,5891	0,8384	1,5951
(5%)	DUNNETT	16,0690	2,1255	17,6005	0,6532	1,2426

*P = pedúnculo; V = vesícula; C = conidióforo.

Tabela 17 - Análise da variância para medidas do comprimento do pedúnculo da estrutura conidial.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre tratamentos	13	154073,1516	11851,7808	30,27**
Entre variantes G ₁	6	55783,8886	9297,3147	23,74**
Entre variantes G ₂	4	79871,9425	19967,9856	50,99**
Original G ₁ vs original G ₂	1	397,7194	397,7194	1,02 n.s.
Entre grupos	2	18019,6011	9009,8005	23,01**
Resíduos	266	104150,9237	391,5448	
Total	279	258224,0753		

CV = 34,58%

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s.= não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 18 - Análise da variância para medidas do comprimento da vesícula da estrutura conidial.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre tratamentos	13	810,1381	62,3183	9,10**
Entre variantes G ₁	6	337,3731	56,2288	8,21**
Entre variantes G ₂	4	427,8122	106,9530	15,61**
Original G ₁ vs original G ₂	1	4,4756	4,4756	0,65 n.s.
Entre grupos	2	40,4772	20,2386	2,95**
Resíduo	266	1822,3548	6,8509	
Total	279	2632,4929		

CV = 29,88%

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 19 - Análise da variância para medidas do comprimento do conidióforo da estrutura conidial.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre tratamento	13	171233,7253	13171,8250	28,04**
Entre variantes G ₁	6	64273,8081	10712,3013	22,80**
Entre variantes G ₂	4	87193,3860	21798,3465	46,40**
Original G ₁ vs original G ₂	1	468,3349	468,3349	1,00 n.s.
Entre grupos	2	19298,1963	9649,0981	20,54**
Resíduo	266	124952,6107	469,7466	
Total	279	296186,3360		

CV = 32,91%

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 20 - Análise da variância para medidas da largura do pedúnculo da estrutura conidial.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre tratamentos	13	119,3119	9,1778	14,18**
Entre variantes G ₁	6	26,4435	4,4072	6,81**
Entre variantes G ₂	4	91,6615	22,9153	35,41**
Original G ₁ vs original G ₂	1	0,5452	0,5452	0,84 n.s.
Entre grupos	2	0,6617	0,3308	0,51 n.s.
Resíduo	266	172,1408	0,6475	
Total	279	291,4527		

CV = 21,11%

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s.= não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 21 - Análise da variância para medidas da largura da vesícula da estrutura conidial.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre tratamentos	13	953,1927	73,3225	31,30**
Entre variantes G ₁	6	361,6559	60,2759	25,73**
Entre variantes G ₂	4	504,0381	126,0095	53,80**
Original G ₁ vs original G ₂	1	11,6101	11,6101	4,96**
Entre grupos	2	75,8886	37,9443	16,20**
Resíduo	266	623,0926	2,3424	
Total	279	1576,2853		

CV = 19,06%

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

4.6. Análise genética

4.6.1. Análise genética dos mutantes morfológicos obtidos por tratamento com UV (linhagem *biA₁*; *methG₁*)

Para efeito de ilustração, apresentamos a análise genética mitótica e meiótica de um dos variantes morfológicos; as análises genéticas dos demais são apresentadas no apêndice (Tabelas A₁ a A₁₃).

As Tabelas 22 e 23 apresentam respectivamente análise mitótica e meiótica do variante 5.

O número de segregantes meióticos de todos os cruzamentos realizados envolvendo os variantes morfológicos provenientes da linhagem *biA₁*; *methG₁*, é mostrado na Tabela 24. Foi realizada análise estatística para a verificação do nível de significância de cada resultado. Devido ao fato do variante morfológico 5 ter apresentado valor de X^2 muito elevado para proporção 1:1, efetuou-se a análise para proporção 2:1, sendo a mesma mostrada na Tabela 25. A Tabela 26 apresenta os grupos e valores de ligação dos variantes morfológicos 1 a 7 provenientes da linhagem *biA₁*; *methG₁*.

Tabela 22 - Análise mitótica do variante morfológico 5.

Haplóides variante 5 // MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	S e t o r e s	
		normais	morfológicos
I	bi ⁺	43	25
	bi	20	25
II	w ⁺	36	*
	w	27	
III	gal ⁺	10	5
	gal	53	45
IV	pyro ⁺	27	47
	pyro	36	3
V	fac ⁺	2	50
	fac	61	0
VI	s ⁺	4	10
	s	59	40
VII	nic ⁺	1	50
	nic	62	0
VIII	ribo ⁺	40	46
	ribo	23	4

*Não foi possível distinguir a coloração dos conídios.

Os determinantes genéticos da morfologia alterada localizam-se nos grupos de ligação V e VII.

Tabela 23 - Análise meiótica do variante morfológico 5.

Variante 5 x MSE				
Grupos de ligação	Marcadores	C o l o n i a s		Valor de recombinação
		normais	morfológicos	
V	fac ⁺	27	48	29,01%
	fac	67	20	
VII	nic ⁺	27	47	29,62%
	nic	67	21	

Tabela 24 - Segregação meiótica de cruzamentos envolvendo variantes morfológicos X linhagens MSE ou MSF.

Cruzamentos	Segregantes		Total	Proporção esperada	X ²
	normais	morfológicos			
Variante 1 X MSE	577	514	1091	1:1	3,6379 n.s.
Variante 2 X MSE	709	701	1410	1:1	0,0452 n.s.
Variante 3 X MSE	310	237	547	1:1	9,7422**
Variante 4 X MSE	557	529	1086	1:1	0,7218 n.s.
Variante 4 X MSF	808	883	1691	1:1	3,3267 n.s.
Variante 5 X MSE	851	468	1319	1:1	111,2122**
Variante 6 X MSE	558	497	1055	1:1	3,5270 n.s.
Variante 7 X MSE	492	538	1030	1:1	2,0544 n.s.

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s.= não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 25 - Segregação meiótica do cruzamento envolvendo variante morfológico 5 X linhagem MSE.

Cruzamento	Segregantes		Total	Proporção esperada	X ²
	normais	morfológicos			
Variante 5 X MSE	851	468	1319	2:1	2,7397 n.s.

Tabela 26 - Grupos e valores de ligação dos variantes morfológicos provenientes da linhagem *bia*₁; *methG*₁.

Mutantes	Grupos de ligação	Marcadores	Valores de ligação
1	I	bi	5,03%
2	I	bi	27,50%
3	II	w	67,09%
4	VI	s	24,28%
5	V	fac	29,01%
	VII	nic	29,62%
6	I	bi	37,27%
7	VII	nic	23,26%

4.6.2. Análise genética dos derivados morfológicos obtidos por tratamento com 8-MOP e UVL. (Linhagem MSE)

Para efeito de ilustração apresentamos a análise genética mitótica e meiótica de um dos derivados morfológicos; as análises genéticas dos demais estão apresentadas no apêndice (Tabelas A₁₄ a A₂₁).

As Tabelas 27 e 28 apresentam respectivamente análise mitótica e meiótica do variante morfológico II.

O número de segregantes meióticos de todos os cruzamentos realizados envolvendo os variantes morfológicos provenientes da linhagem MSE são mostrados na Tabela 29. Foi realizada análise estatística para a verificação do nível de significância de cada resultado. Devido ao fato dos variantes morfológicos I e V terem apresentado valor de X^2 muito elevado para proporção 1:1, efetuou-se a análise para proporção 3:1, sendo a mesma mostrada na Tabela 30. A Tabela 31 apresenta os grupos e valores de ligação dos variantes morfológicos I a V provenientes da linhagem MSE.

Tabela 27 - Análise mitótica do variante morfológico II.

Haplóides variante II // <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₁		
Grupos de ligação	Marcadores	Setores normais
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	23
	<i>pro</i> <i>paba</i>	29
II	<i>w</i> ⁺	39
	<i>w</i>	13
III	<i>gal</i> ⁺	42
	<i>gal</i>	10
IV	<i>pyro</i> ⁺	52
	<i>pyro</i>	0
V	<i>fac</i> ⁺	50
	<i>fac</i>	2
VI	<i>s</i> ⁺	46
	<i>s</i>	6
VII	<i>nic</i> ⁺	37
	<i>nic</i>	15
VIII	<i>ribo</i> ⁺	51
	<i>ribo</i>	1

O determinante genético da morfologia alterada localiza-se no grupo de ligação IV.

Tabela 28 - Análise meiótica do variante morfológico II.

Variante II X <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₁				
Grupo de ligação	Marcador	C o l o n i a s		Valor de recombinação
		normais	morfológicos	
IV	pyro ⁺	56	0	17,44%
	pyro	15	15	

Tabela 29 - Segregação meiótica de cruzamentos envolvendo variantes morfológicas X linhagem *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₁.

Cruzamentos	Segregantes		Total	Proporção esperada	X ²
	normais	morfológicos			
Var. I X <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₁	349	136	485	1:1	93,5442**
Var. II X <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₁	493	468	961	1:1	0,6502 n.s.
Var. III X <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₁	612	434	1046	1:1	30,2906**
Var. IV X <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₁	802	468	1270	1:1	87,8392**
Var. V X <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₁	1324	472	1796	1:1	404,1780**

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 30 - Segregação meiótica de cruzamentos envolvendo variante morfológico I e V X linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₁*.

Cruzamentos	Segregantes		Total	Proporção esperada	X ²
	normais	morfológicos			
Var. I X <i>proA₁; pabaA₆; yA₁</i>	349	136	485	3:1	2,3924 n.s.
Var. V X <i>proA₁; pabaA₆; yA₁</i>	1324	472	1796	3:1	1,5708 n.s.

n.s. = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 31 - Grupos e valores de ligação dos variantes morfológicos provenientes da linhagem MSE.

Mutantes	Grupos de ligação	Marcadores	Valores de ligação
I	I	pro paba	0,0%
	IV	pyro	2,50%
II	IV	pyro	17,44%
III	V	fac	34,14%
IV	II	w	24,83%
V	III	gal	32,08%
	VIII	ribo	42,53%

4.7. Efeito do 8-MOP e UVL na produção de translocações

Como nosso intuito era verificar se tratamento com 8-MOP e UVL causava translocação, apenas efetuamos a análise mitótica de 20 diplóides da linhagem $b\lambda A_1 // MSE$. A Tabela 32 mostra a análise genética de um dos diplóides, sendo que os outros 19 seguem o mesmo padrão, isto é, translocações não foram detectadas.

Tabela 32 - Análise mitótica do D₁// MSE.

Haplóides D ₁ // MSE										
Setor Haplói- de	Requisitos nutricionais									
	Cor	MC	MM	MM+T	+gal	-piro	+fac	-s	-nic	-ribo
1	w	+	-	+	+	+	-	+	+	+
2	w	+	-	+	+	-	+	-	+	+
3	w	+	-	+	+	-	+	+	+	+
4	w	+	-	+	+	+	-	+	+	+
5	w	+	-	+	+	+	+	-	+	-
6	w	+	-	+	+	-	-	-	+	+
7	w	+	-	+	-	+	+	-	-	+
8	w	+	-	+	-	+	+	+	-	-
9	w	+	-	+	-	+	+	+	+	+
10	w	+	-	+	-	+	-	-	+	+
11	w	+	-	+	-	+	-	+	+	-
12	y	+	-	+	-	+	+	+	-	-
13	y	+	-	+	-	+	+	-	-	+
14	y	+	-	+	-	-	-	+	-	+
15	y	+	-	+	+	+	+	-	-	-
16	y	+	-	+	-	-	+	+	-	+
17	y	+	-	+	-	+	-	-	-	-
18	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+
19	y	+	-	+	+	+	-	-	-	-
20	y	+	-	+	-	-	+	+	-	+

Legenda para Tabela 32:

+ = Crescimento.

- = Ausência de crescimento.

y = Colonia com fenótipo amarelo.

w = Colonia com fenótipo branco.

MC = Meio completo.

MM = Meio mínimo.

MM+T = Meio mínimo + todos os requisitos nutrimentais envolvidos no cruzamento.

+gal = Meio mínimo de galactose + todos os requisitos nutrimentais envolvidos no cruzamento.

-piro = MM+T, menos piridoxina.

+fac = Meio de acetato de amônio + todos os requisitos nutrimentais envolvidos no cruzamento.

-s = MM+T, menos tiosulfato de sódio.

-nic = MM+T, menos nicotinamida.

-ribo = MM+T, menos riboflavina.

5. DISCUSSÃO

5.1. Obtenção e características dos mutantes morfológicos

Tanto a luz ultra-violeta como também o 8-MOP e ultra-violeta longa mostraram ser agentes mutagênicos bastante eficientes na produção de mutantes morfológicos.

Tratamento de conídios da linhagem *bia*₁; *methG*₁ com luz UV e da linhagem MSE com 8-MOP e UVL produziu colonias com morfologia, coloração, taxa de crescimento e ou conidiação alterada, sendo essas mudanças mais drásticas ou menos drásticas conforme o mutante obtido (Tabelas 5 e 6; Figuras 5 a 18). A taxa de crescimento das colonias (Tabelas 7 e 8; Figuras 19 e 20) variou consideravelmente e quase todos os mutantes apresentaram menor taxa de crescimento quando comparados com a da linhagem original. Essa diferença foi observada especialmente até o 6º dia de crescimento. A partir do 6º dia alguns mutantes tiveram taxa de crescimento semelhante ao da linhagem original pois após esse período de tempo as linhagens normais atingiram os bordos da placa e praticamente paralizaram seu crescimento enquanto que os mutantes morfológicos continuaram a

crescer até atingir os bordos da placa.

A análise da variância (Tabela 9) foi efetuada para diâmetro da colônia com 6 dias de crescimento. Tal análise não mostrou efeito significativo apenas para comparação entre as duas colônias originais, evidenciando que, para essa característica, elas são iguais. Tratamentos com luz UV ou 8-MOP e UVL produziram mutantes com crescimento menor e semelhante aos originais.

A análise da variância para densidade de conidiação (Tabela 12) da mesma forma foi não significativa para comparação entre as duas colônias originais. Todos os variantes apresentaram menor conidiação que as originais (Tabelas 10 e 11). Comparando-se o diâmetro da colônia com a conidiação notou-se a não dependência dos dois caracteres, ou seja, crescimento micelial e produção de conídios. Assim, variantes com elevada taxa de crescimento (variantes 6 e I) apresentaram baixíssima taxa de conidiação. Observação macroscópica desses variantes sugeriram que os mesmos seriam do tipo micelial devido a reduzida conidiação; no entanto, a produção de conídios foi confirmada por análise microscópica. Variantes compactos (1 e 2) apresentaram taxa de conidiação baixa enquanto que os demais apresentaram densidade de conidiação variada. Tais observações concordam com a hipótese de que o crescimento micelial e a produção de conídios são mutualmente independentes. Pela análise da variância (Tabela 12) também não se detectou diferenças estatisticamente significativas para comparação de colônias dentro do tratamento indicando não haver heterogeneidade na produção de conídios, em colônias do mesmo variante. A maioria dos variantes obtidos foram oligosporogênicos porém não se obteve

variantes asporogênicos. Tal fato era esperado pois, de acordo com MARTINELLI (1972), a indução de mutantes asporogênicos ocorre com frequência muito baixa.

A presença de alterações na coloração, taxa de crescimento e/ou densidade de conidiação num mesmo variante poderia ser devido a uma mutação com efeitos pleiotrópicos. MARTINELLI e CLUTTERBUCK (1971) observaram que em 85% dos mutantes para conidiação por eles obtidos também outras características foram alteradas. Parece, portanto, não haver relação entre as características estudadas em um mesmo mutante; porém em diferentes graus há uma associação causada talvez por pleiotropia.

Em adição às mudanças macroscópicas ocorridas nos variantes morfológicos, alterações microscópicas foram observadas com relação à coloração, tamanho e/ou formato das hifas e estruturas conidiais. (Tabelas 13 e 14; Figuras 22 a 34). O aspecto das hifas na quase totalidade dos casos foi transparente, porém os isolados 5 e I apresentaram hifas com pigmentação marrom claro e vermelha, respectivamente. Os conidióforos nos variantes 7, I, IV, V também apresentaram pigmentação escura, o que não ocorreu nos outros variantes (Tabelas 13 e 14). Talvez nos variantes com conidióforos mais claro o problema esteja relacionado com deposição de pigmentos ou espessamento da parede. Mutantes "*ivory*" (CLUTTERBUCK, 1969c) e "*yellow green*" (CLUTTERBUCK, 1972) apresentam conidióforos e esterígmas incolores e cinza escuro, respectivamente. Talvez um estudo comparativo desses mutantes e aqueles por nós obtidos desse boa indicação do gene responsável ou enzima alterada, envolvidos.

O comprimento da célula hifal foi menor nos variantes 1, 2, 5, 6, 7, I, II (Figuras 22, 23, 26, 27, 28, 30, 31). Essa característica talvez se deva a uma frequente septação ou poderia decorrer do fato de que a septação ocorreria em período normal, porém devido alterações em enzimas que promovem o crescimento, essas células hifais crescem até determinado estágio e depois estacionam por falta de deposição de nova parede para elongação.

No micélio das variantes 1, 2, 3, 5, 6, 7, I, II (Figuras 22, 23, 24, 26, 27, 28, 30, 31) apareceram células hifais tortuosas e/ou arredondadas intercaladas com células normais. Essa alteração na morfologia hifal poderia também ser resultante de metabolismo enzimático alterado e conseqüentemente menor deposição de quitina na parede o que acarretaria a não formação de parede rígida e sim com sinuosidades, atingindo o ponto máximo de ausência de deposição nas células globosas que adquirem esse formato devido pressão osmótica muito grande no interior da célula hifal. KATZ e ROSENBERGER (1970) também observaram um mutante (T^S) que devido a baixa quantidade de amino-açúcar na parede, produziu célula hifal globosa e de tamanho irregular em meio com baixa concentração de estabilizador osmótico. Outra suposição para estruturas arredondadas nas hifas dos variantes 1 e I seria considerá-las como células de Hülle, porém para tal afirmativa novos estudos necessitariam ser desenvolvidos.

A estrutura conidial em todos os variantes analisados foi constituída pelo pedúnculo, vesícula globosa, esterígmas primários, secundários e conídios. No entanto, o variante I apresentou com certa frequên

cia estruturas conidiais constituídas apenas do pedúnculo ou pedúnculo e vesícula não formando estrutura subsequente. No variante 3 os esterígmas primários são mais longos e os isolados 3, 5, 6 e 7 (Figuras 24, 26, 27 e 28) apresentam pedúnculos septado. Mutante "stu" (CLUTTERBUCK, 1969c) apresenta cabeça conidial atrofiada. MARTINELLI e CLUTTERBUCK (1971) dentre os mutantes estudados encontraram alguns com bloqueio na formação de vesícula e/ou estruturas subsequentes, porém não podemos fazer comparações com o variante I pois este apresenta também estruturas conidiais normais entre as anômalas. Presença de conidióforos com pedúnculo septado nos isolados 3, 5, 6 e 7, talvez se deva ao fato do mecanismo de septação hifal não ser bloqueado no aparelho conidial causando, conseqüentemente, a septação do pedúnculo.

Alguns variantes (1, 2, 6, I) apresentam quantidade reduzida de estruturas conidiais. Comparando-se esses mutantes com os demais em relação à taxa de conidiação observa-se que esta também é reduzida. No entanto o variante 3 apresenta elevada quantidade de estruturas conidiais e densidade de conidiação reduzida. Portanto, no caso do variante 3, a mutação deve ter ocorrido em gene que governa o desenvolvimento tardio da conidiogênese, ou seja, o bloqueio se manifesta no momento da conidiação.

A análise métrica do pedúnculo, vesícula e conidióforo das linhagens originais e mutantes (Tabelas 15 e 16) indicam a ocorrência de mutantes com valores inferiores, semelhantes e superiores aos originais. Análise da variância para comprimento do pedúnculo da vesícula e do conidióforo (Tabelas 17, 18 e 19) não mostrou efeito significativo apenas para comparação entre as duas linhagens originais. Para largura do pedúnculo

lo os resultados foram não significativos para comparação entre as duas linhagens originais e entre grupos (Tabela 20). Análise da variância para medidas da largura da vesícula mostrou efeito significativo para todas as comparações (Tabela 21). Pelos testes de TUKEY e DUNNETT (Tabelas 15 e 16) observaram-se mutantes que diferiram significativamente dos originais e também entre si. Os coeficientes de variação foram bastante altos o que significa que dentro de cada tratamento há grande diversidade de valores, ou seja, valores altos e baixos para cada linhagem ou mutante. Além de apresentarem valores extremos há uma gama variável de valores intermediários o que nos leva a sugerir que esses caracteres devam ser governados por poligenes ou que sejam influenciados por genes modificadores e altamente influenciados pelo ambiente interno da colônia.

Apesar das mutações terem causado diferenças no comprimento e largura do conidióforo, deve ser salientado que o diâmetro dos conídios foi semelhante para todos os mutantes morfológicos e linhagens originais.

5.2. Análise genética

A análise genética realizada tanto através do ciclo sexual (análise meiótica) como através do ciclo parasexual (análise mitótica) revelou que na maioria dos casos um único gene é o responsável pela alteração na morfologia, uma vez que tanto a análise mitótica indicou que apenas um grupo de ligação estava envolvido, como também a análise meiótica apresentou uma segregação de 1 normal:1 morfológico. Em vários casos detectou-se ligação entre o gene responsável pela morfologia alterada com

outro gene localizado no mesmo grupo de ligação envolvido. Em outros casos, no entanto, eventos mais complexos do que uma simples mutação gênica devem ter ocorrido. Assim, em primeiro lugar serão apresentados os casos onde um único gene explica a alteração morfológica obtida sendo em seguida, analisados os casos mais complexos.

5.2.1. Alterações morfológicas causadas por um único gene mutante

Nessa classe se enquadram os variantes 1, 2, 3, 4, 6 e 7 derivados da linhagem *bia*₁; *methG*₁ tratada com luz ultra-violeta e os II, III e IV derivados da linhagem MSE tratada com 8-MOP e UVL. Assim, no caso do variante 1, a análise mitótica revelou que todos setores haplóides normais derivados do diplóide entre esse variante e a linhagem MSE eram independentes de biotina enquanto que o único setor haplóide morfológico era deficiente para biotina e os outros grupos de ligação segregando independentemente do caráter morfológico (Tabelas A₁). Desta maneira o gene responsável pelo caráter morfológico designado de *mor*₁ localiza-se no grupo de ligação 1, o que foi confirmado pela análise meiótica (Tabela A₂) que indicou estar o gene *mor*₁ ligado ao gene *bia*₁ (5, 03 unidades de recombinação). A proporção de 1 normal:1 morfológico (Tabela 24) era então de se esperar. Seguindo-se raciocínio semelhante, o gene responsável pela morfologia alterada no variante 7 (*mor*₇) pode ser localizado no grupo de ligação VII a 23, 26 unidades do gene *níc B*₈ (Tabela A₁₂ e A₁₃) e no variante 2 (*mor*₂) pode ser localizado no grupo de ligação 1 a 27,50 unidade do gene *bia*₁. No variante 6 os dados de análise mitótica não foram con-

clusivos embora dessem indicação do gene mutante estar no grupo de ligação I (Tabela A₁₀) pois de 54 setores haplóides normais analisados apenas 7 eram deficientes para biotina. No entanto, a análise meiótica (Tabela A₁₁) revelou ligação desse gene (*mor₆*) com o gene *b₁A₁* (37,27 unidades) e a segregação foi de 1 normal para 1 morfológico (Tabela 24).

No variante 3 (Tabela A₅) os dados da análise mitótica apresentaram indicação de ligação entre o determinante para morfologia alterada e o grupo de ligação II. De fato, a análise meiótica revelou segregação de 1 normal:1 morfológico, mas ausência de ligação meiótica entre as marcas *WA₁* e *mor₃*. (Tabela A₆). No variante 4 (Tabelas A₇ e A₈) houve uma segregação mitótica completamente anômala tanto no diplóide construído entre esse variante com a linhagem MSE como com a linhagem MSE. Na realidade houve alta frequência de tipos parentais o que poderia indicar um alto nível de translocações ou mais provavelmente uma afinidade por certos cromossomos não homólogos na segregação. Se esse foi o caso o gene *mor₄* seria o responsável por essa segregação mitótica anômala. Futuros estudos com esse mutante poderão dar indicações mais precisas do fenômeno. No entanto, a análise meiótica revelou ligação entre *mor₄* e *δB₃* (Tabela A₉) de 24, 28 unidades. A segregação meiótica de 1 normal:1 morfológico (Tabela 24) indicou também que um único gene está envolvido na alteração morfológica alterada e indica inclusive que se o gene *mor₄* altera a segregação mitótica o mesmo não se verifica na meiose.

Nos variantes II, III, e IV todos derivados da linhagem MSE, uma segregação meiótica de 1 normal:1 morfológico foi também observada (Tabela 29), embora em dois casos a diferença em favor dos normais fosse

significativa. Isso, no entanto, pode ser explicado por uma diferença de viabilidade entre os 2 tipos de colonias, as normais devendo ser mais viáveis no caso. Aliás, resultados semelhantes já foram obtidos por AZEVEDO e ROPER (1970) e AZEVEDO (1971) analisando mutantes com morfologia alterada. No variante II, a análise mitótica revelou que todos setores haplóides *pyro*⁺ eram normais não se obtendo setores haplóides morfológicos. Embora também fosse constatada baixa frequência de setores *fac* e *ribo*, a análise meiótica revelou claramente ligação entre o gene para morfologia alterada (*morIII*) e o gene *pyroA₄*, ambos no grupo de ligação IV, distanciados de 17,44 unidades (Tabelas 27 e 28).

O variante III apresentou por análise mitótica evidências de um gene mutante para morfologia ligado apenas com o grupo de ligação V, (Tabela A₁₆); de 47 setores haplóides normais analisados apenas 4 foram incapazes de crescer em acetato como única fonte de carbono. De fato a análise meiótica (Tabela A₁₇) revelou ligação entre o morfológico (*mor III*) e o gene *facA₃₀₃*, ambos no grupo de ligação V (34, 14 unidades). O variante IV analisado através de seus segregantes haplóides derivados de um diplóide entre ele e a linhagem *proA₁*; *pabaA₆*; *yA₁* (Tabela A₁₈) mostrou que, embora em alguns grupos de ligação poucos segregantes não parentais tivessem sido obtidos, evidências de ligação só ocorreu com o grupo de ligação II, onde todos morfológicos foram brancos e 39 dos 41 normais analisados foram coloridos. De fato a análise meiótica (Tabela A₁₉) revelou ligação entre o gene para morfologia alterada (*mor IV*) e o gene *uA₃* (24, 83 unidades) ambos no grupo de ligação II.

5.2.2. Alterações morfológicas mais complexas

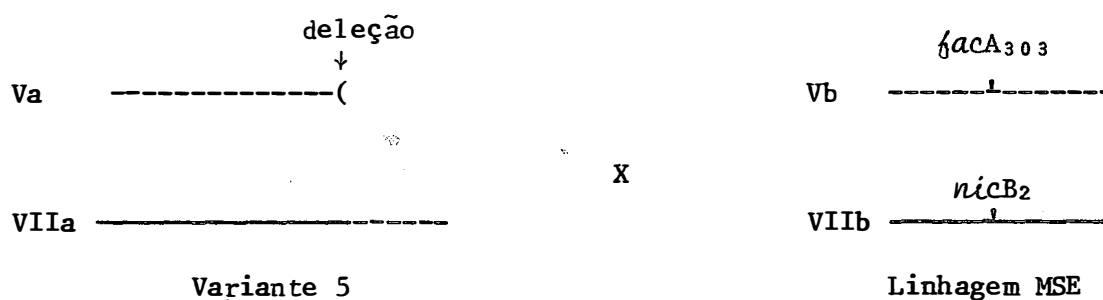
Esse foi o caso do variante 5 derivado da linhagem *bia*₁; *methG*₁ e dos variantes I e V provenientes da linhagem MSE.

O variante 5, apresentou segregação meiótica que difere da segregação de 1:1 mas pode ser explicada com base em um evento simples. Neste caso, a segregação meiótica foi de 2 normais:1 morfológico (Tabela 25). A análise mitótica revelou 2 grupos de ligação envolvidos, ou seja, os grupos de ligação V e VII (Tabela 22) e de fato ligação meiótica foi encontrada tanto para *aca*₃₀₃ no grupo de ligação V (29,01 unidades) como para *nícB*₂ no grupo de ligação VII (29,62 unidades), como se verifica pelos dados da Tabela 23. Neste caso pode-se supor que uma translocação não recíproca seja a causa do fenótipo alterado, envolvendo os grupos de ligação V e VII. Em cruzamentos com linhagem normal resultariam 2 parentais, 1 normal e um morfológico e de 2 recombinantes 1 seria letal (deleção) e outro duplicado, mas de morfologia normal (Figura 33). Haveria assim, segregação de 2 normais:1 morfológico e como sempre o fenótipo alterado estaria ligado à deleção cujo ponto de quebra seria o determinante *mor*₅. Poderia haver ligação entre o gene no grupo de ligação e a deleção e também com o gene no outro grupo de ligação se ele estivesse próximo a região duplicada. Casos de deleção alterando morfologia já foram descritos por BALL (1967) e AZEVEDO (1971).

Nos variantes I e V ambos provenientes da linhagem MSE tratada por 8-MOP e UVL, a segregação meiótica foi de 3 normais:1 morfológico (Tabela 30). No variante I, embora tenha ocorrido alta frequência de

combinações parentais na análise mitótica (Tabela 14), tanto esta sugeriu e a análise meiótica confirmou (Tabela A₁₅), ligação com os genes *proA*₁ e *pabaA*₆ no grupo de ligação I e com *pyro A*₄ no grupo de ligação IV. Interessante no caso foi ausência de recombinantes entre o determinante para morfologia alterada no grupo de ligação I e *proA*₁ e *pabaA*₆ o que sugere fortemente a existência de inversão cromossômica no caso. Assim, deve existir uma inversão no grupo de ligação I que dá alteração na morfologia (*morIA*) e outro gene no grupo de ligação IV (*morIB*) ligado ao gene *pyro A*₄ (2,50 unidades). Uma inversão com efeito semelhante já foi relatada em *A. nidulans* (AZEVEDO e ROPER, 1970).

Finalmente o variante V analisado mitoticamente (Tabela A₂₀) revelou que dois grupos de ligação (III e VIII) estavam envolvidos. De fato a análise meiótica (Tabela A₂₁) confirmou a existência de 2 genes mutantes para a morfologia alterada, o primeiro deles (*morVA*) ligado a *galA*₁ (32,08 unidades) e o segundo (*morVB*) ligado a *ribo B*₂ (42,53 unidades).



Va VIIa = morfológico

Vb VIIb = normal

Va VIIb = letal

Vb VIIa = normal duplicado

Figura 35 - Possível explicação para a morfologia alterada encontrada no variante 5 (A direção da translocação é arbitária).

5.2.3. A possível localização dos determinantes de morfologia alterada

Com base na discussão dos resultados apresentada nos itens 5.2.1. e 5.2.2. fica possível localizar os determinantes para morfologia alterada em um mapa genético. Essa localização é evidentemente tentativa e futuros cruzamentos tem que ser realizados para confirmarem as hipóteses sugeridas. A Figura 36 mostra a localização dos mutantes.

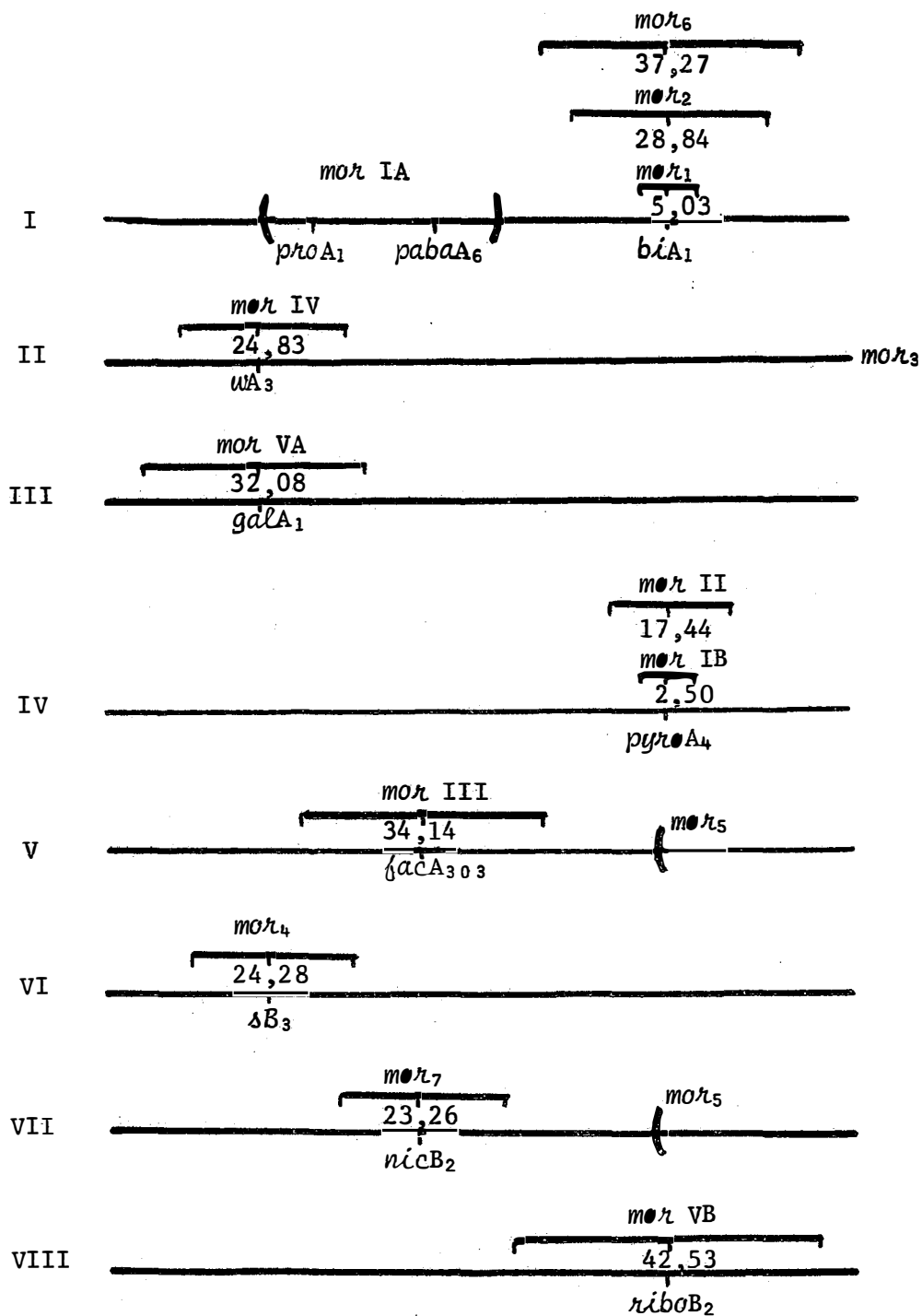


Figura 36 - Localização dos mutantes morfológicos analisados. O sinal () indica inversão e o sinal (indica translocação não recíproca.

5.3. Relação entre os mutantes obtidos e bloqueios no desenvolvimento

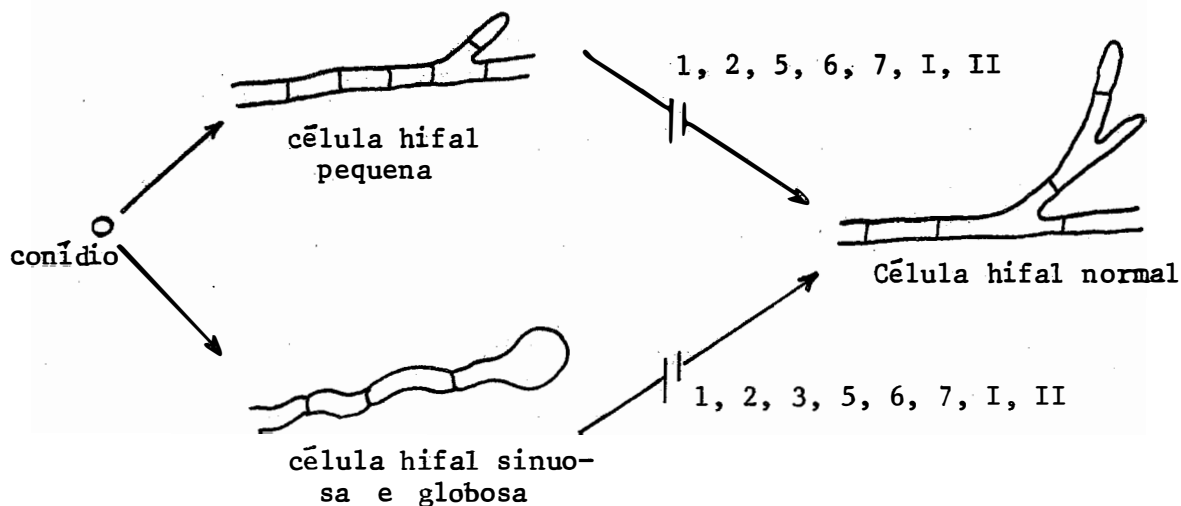
Neste ítem, procuramos correlacionar as mutações produzidas por luz UV ou 8-MOP e UVL com alterações observadas nas hifas e estruturas conidiais. Devemos salientar que a sequência do desenvolvimento apresentada na Figura 37 foi apenas uma tentativa para facilitar ao leitor a interpretação dos resultados. Outros modelos de tal sequência poderiam ser sugeridos.

Os mutantes morfológicos 1, 2, 3, 4, 6, 7 provenientes da linhagem *bia*₁; *methG*₁ e II, III e IV derivados da linhagem MSE apesar de apresentarem alteração em apenas um loco gênico possuem alterações ao nível de tipo, formato, coloração e/ou ramificação de hifas, como também alterações nas estruturas conidiais. Diante desse fato sugerimos efeitos pleiotrópicos. Estudos realizados em *Neurospora crassa* (MISHA,1977) também dão evidências de mutações afetando conidiação e outras fases do ciclo celular.

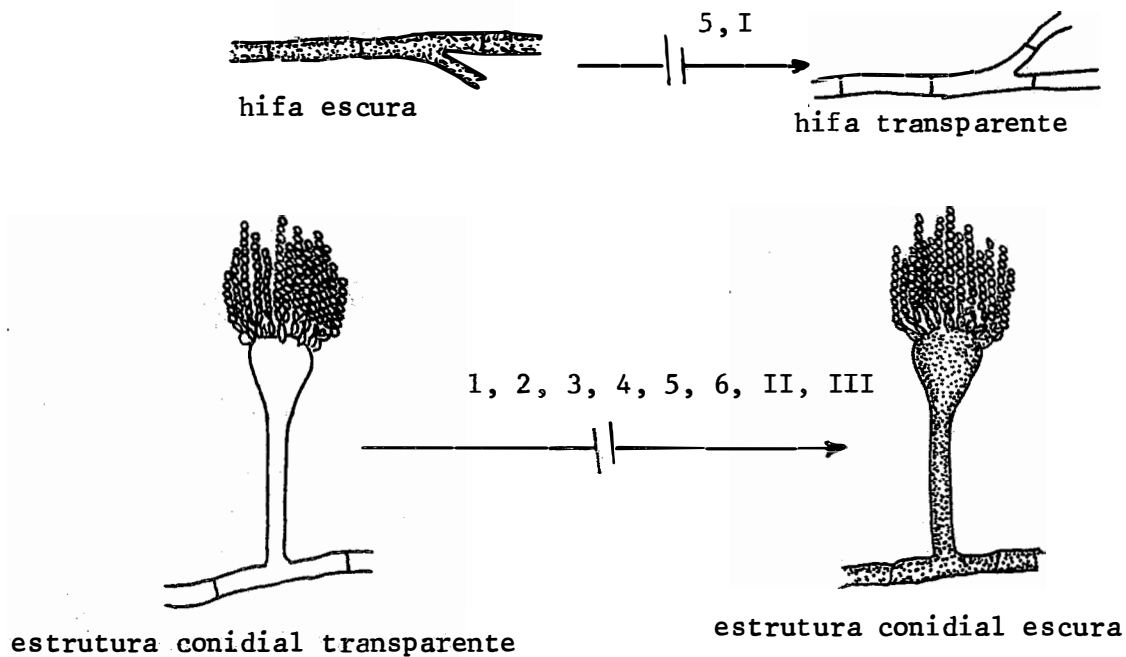
Os variantes morfológicos com duas alterações gênicas e/ou aberrações cromossômicas são de análise mais complexa, uma vez que, como salientado acima, uma única mutação já apresentou efeito pleiotrópico. Nesses casos as duas mutações poderiam ser separadas em linhagens diferentes e analisadas para detectar-se qual o nível de atuação de cada mutação. O variante V, por exemplo, que apresenta 2 mutações gênicas, poderíamos sugerir que uma das mutações alterou coloração das hifas e a outra produção de conídios e coloração de colônia ou vice-versa.

Futuros estudos serão realizados nesse sentido uma vez que os mutantes analisados apresentam-se como excelente material para essa pesquisa.

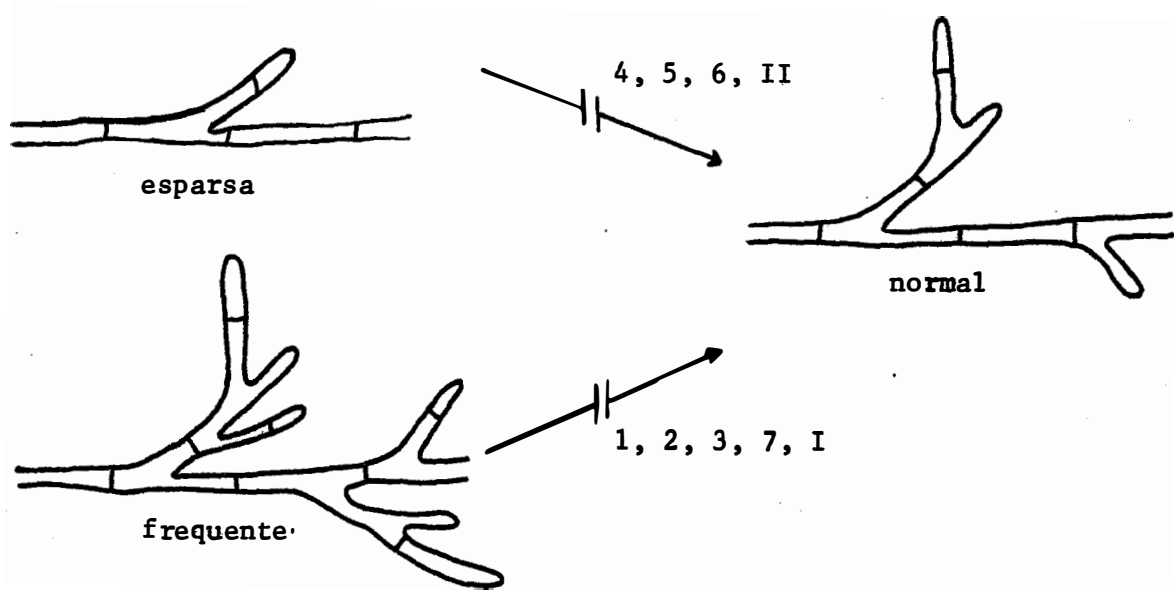
Comprimento e morfologia das células hifais



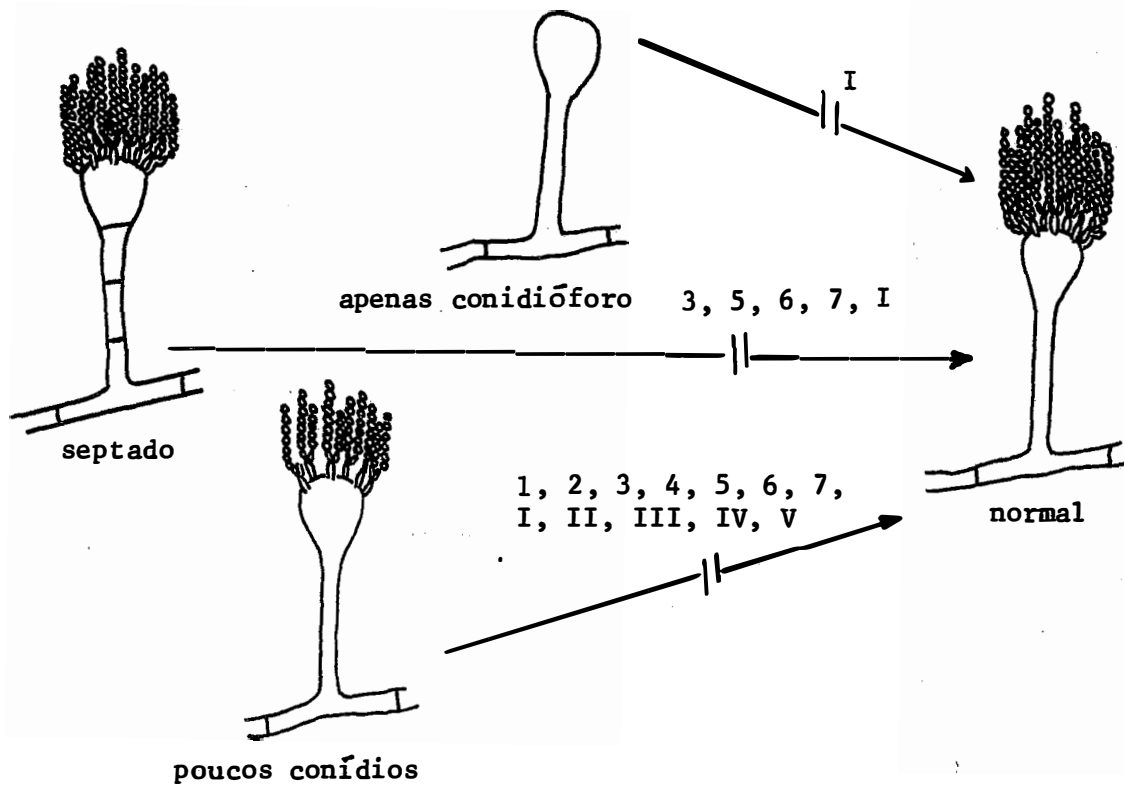
Coloração das hifas e estruturas conidiais



Ramificação das hifas



Estruturas conidiais



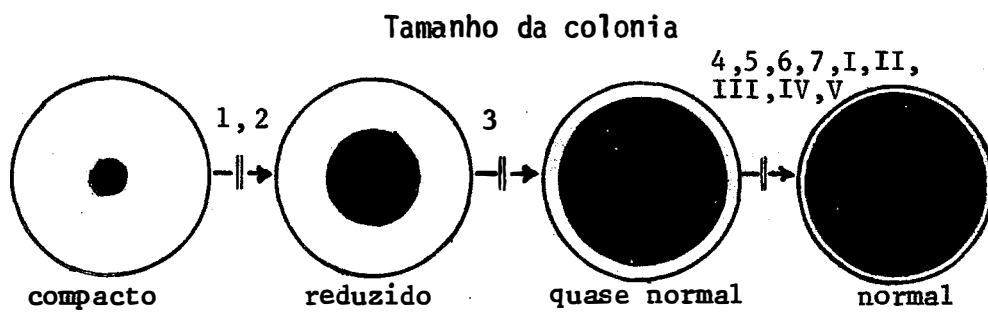
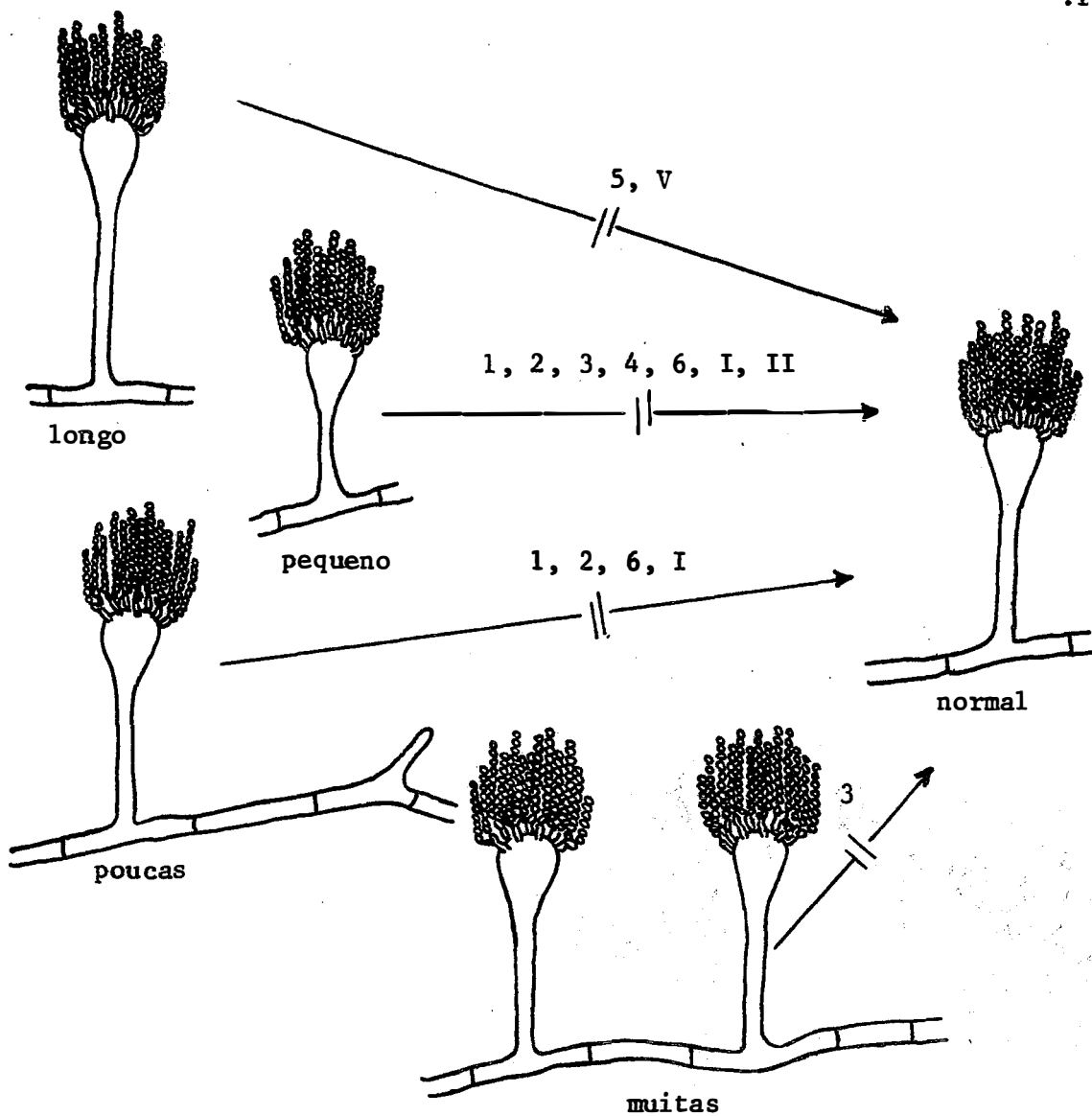


Figura 37 - Mutantes morfológicos e bloqueios no desenvolvimento.

5.4. 8-MOP e UVL causando aberrações

Trabalhos realizados por vários autores mostraram maior so brevivência de linhagens diplóides a agentes mutagênicos do que linhagens haplóides (D'ARCE, 1972; MENEZES e col., 1973; ALMEIDA, 1976; PIZZIRANI, 1977). No presente trabalho tal fato foi confirmado com o uso de 8-MOP e UVL na linhagem diplóide, *bia*₁//MSE e linhagem haplóide MSE, sendo a porcentagem de sobrevivência 1,48 e 0,07%, respectivamente (Tabelas 2 e 3).

De acordo com CURTIS (1970), conídios com maior grau de pigmentação são mais resistentes a luz UV em *Aspergillus carbonarius*. MENEZES e col. (1973) utilizando 8-MOP e UVL para tratamento da linhagem *bia*₁; *methG*₁ de *A. nidulans* que apresenta conídios de coloração verde, obtiveram porcentagem de sobrevivência superior a nossa. Essa diferença faz juz à afirmação de CURTIS (1970), pois a linhagem por nós utilizada apresenta conídios brancos (MSE).

A análise mitótica efetuada nos 20 diplóides da linhagem *bia*₁//MSE submetida a ação de 8-MOP + UVL, não deu indícios da ocorrência de translocações cromossômicas, o que vem a corroborar com resultados obtidos em *A. nidulans* por outros autores (ALDERSON e SCOTT, 1970; SCOTT e ALDERSON, 1971; MENEZES e col., 1973 e BIAGI e col., 1975). No entanto análise genética do mutante morfológico I indicou a presença de inversão cromossômica. MUSAJO (1955) constatou que 5-MOP e psoraleinas são potentes mutagênicos e induzem aberrações cromossômicas em raiz de cebola e SASAKI e TONOMURA (1973) detectou aberrações cromatídicas em leucócitos normais e anêmicos com o uso de 8-MOP. Tais resultados levam-nos a sugerir que a

dose utilizada de 8-MOP e UVL para tratamento da linhagem MSE foi um pouco forte uma vez que a mesma é haplóide e possui conídios brancos, enquanto que na diplóide $b^iA_1//MSE$ com conídios verdes, não detectou-se aberrações cromossômicas (translocações).

A não especificidade de 8-MOP e UVL citada por ALDERSON e SCOTT, 1970 e SCOTT e ALDERSON, 1971, foi confirmada, uma vez que os determinantes de morfologia alterada localizaram-se em diferentes grupos de ligação.

Tais características desses mutagênicos são ideais para a obtenção de linhagens de fungos utilizados em indústria para maior produção de produtos metabólicos. Devemos para tal salientar que a dose utilizada deve ser mais fraca afim de induzir-se apenas mutações de ponto.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se obter e analisar variantes com morfologia alterada em *Aspergillus nidulans*, através do uso de luz ultra-violeta ou 8-Metoxipsoralaina (8-MOP) e ultra violeta longa (UVL). Tais variantes foram analisados macroscópica, microscópica e geneticamente. Além disso, procurou-se verificar se o mutagênico 8-MOP em associação com luz UVL causava além de mutações gênicas, aberrações cromossômicas. Dos resultados obtidos, as seguintes conclusões pu deram ser tiradas:

- a) A análise genética demonstrou que os variantes com morfologia alterada na maioria dos casos, tiveram alterações morfológicas como consequência de uma mutação gênica; em outros, duas mutações gênicas ou aberrações cromossômicas estavam envolvidas. As mutações condicionando morfologia alterada localizaram-se em todos os grupos de ligação, mas um maior número de mutações ocorreu no grupo de ligação I talvez devido ao seu maior tamanho.

- b) Não houve correlação entre taxa de crescimento linear e densidade de conidiação nos variantes analisados e, todos os variantes morfológicos estudados, apresentaram taxa de crescimento linear e conidiação, reduzidas em comparação com as respectivas linhagens originais.

- c) Vários passos do desenvolvimento da hifa e estruturas conidiais foram alterados e algumas mutações mostraram efeitos pleiotrópicos.

- d) Tratamento com 8-MOP e UVL não causou translocações cromossômicas em diplóides analisados, porém detectou-se um possível caso de inversão, após o tratamento de linhagem haplóide com 8-MOP e UVL.

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present research was carried out aiming the obtention of morphological variants induced by ultra-violet light and 8-methoxypsoralen (8-MOP) plus near ultra-violet (NUV) in *Aspergillus nidulans*. The obtained variants were macroscopically, microscopically and genetically analysed. Also, the possible induction of chromosomic aberrations caused by 8-MOP + NUV in diploid strains was studied. From the obtained results the following conclusions could be drawn:

- a) Genetic analysis have shown that the morphological variants were generally due to mutations which behaved as single genes; in few cases two genic mutations or chromosomic aberrations were involved. Mutations causing alterations in morphology were located in all linkage groups with predominance of linkage group I; this was probably due to the fact that such linkage group is one of the largest in *A. nidulans*.
- b) There was no correlation between linear growth rate and density of conidiation in the variants analysed. All

morphological variants studied presented reduced linear growth rate and conidiation when compared to the respective original strains, from which they were obtained.

- c) Several steps of hyphal and conidial apparatus development were altered and some mutations presented pleiotropic effects.

- d) In diploids, treatment with 8-MOP plus NUV produced no translocations but a possible case of inversion was detected following treatment of an haploid strain with 8-MOP + NUV.

8. BIBLIOGRAFIA CITADA

AGNIHOTRI, V.P. 1967. Role of trace in the growth and morphology of five ascosporic *Aspergillus* especies. *Canadian Journal of Botany*, 45:73-79.

ALDERSON, T. e B.R. SCOTT, 1970. The photosensitising effect of 8-methoxypsoralen on the inactivation and mutation of *Aspergillus* conidia by near ultra-violet light. *Mutation Research*, 9:569-578.

ALMEIDA, L.M. 1976. Obtenção de linhagens com duplicações cromossômicas em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre, 122p. Piracicaba, SP.

ANDERSON, J.G. e J.E. SMITH, 1971. The production of conidiophores and conidia by newly germinated conidia of *Aspergillus niger* (microcycle conidiation). *Journal of General Microbiology*, 69:185-197.

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.

APIRION, D. 1963. Formal and physiological genetics of ascospore colour in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 4:276-283.

- ARLETT, C.F. 1957. Induction of cytoplasmatic mutants in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London, 179:1250-1251.
- ARLETT, C.F., M. GRINDLE e J.L. JINKS. 1962. The "Red " cytoplasmatic variant of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 17: 197-209.
- AVERBECK, D. 1976. Structural specificity of photoactive furocoumarins inducing genetic damage in yeast. In: Scott, B.R., M.A. Pathak e G.R. Mohn, 1976. Molecular and genetic basis of furocoumarins reactions. *Mutation Research*, 39:29-74.
- AVERBECK, D. e E. MOUSTACCHI, 1975. 8-Methoxypsoralen plus 365 nm light effects and repair in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 395: 393-404.
- AXELROD, D.E. 1972a. Quantitative assays of differentiation of *Aspergillus nidulans*. *Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology*, 72:68.
- AXELROD, D.E. 1972b. Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 73:181-184.
- AXELROD, D.E., M. GEALT e M. PASTUSHOK, 1973. Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Developmental Biology*, 34:9-15.
- AZEVEDO, J.L. 1965. The centromere of chromosome VII of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 6:7.
- AZEVEDO, J.L. 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. Ph. D. thesis, University of Sheffield. 240p. England.
- AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER. 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus* successive and transposable genetic changes. *Genetical Research*, 16: 79-93.

- AZEVEDO, J.L. e E.P. SANTANA. 1975. The use of chloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 13:6.
- BADEN, H.P., J.M. PARRINGTON, J.D.A. DELHANTY e M.A. PATHAK. 1972. DNA synthesis in normal and *Xeroderma pigmentosum* fibroblasts following treatment with 8-methoxypsoralen and long wave ultra-violet light. *Biochimica et Biophysical Acta*, 262:247-255.
- BAINBRIDGE, B.W. 1963a. Study of a translocation affecting morphology. *Aspergillus News Letter*, 4:20-21.
- BAINBRIDGE, B.W. 1963b. Genetic analysis of morphological mutants. *Aspergillus News Letter*, 4:20.
- BAINBRIDGE, B.W. 1966. Table of located or partially located mutants and revised map of linkage group III. *Aspergillus News Letter*, 7:19-21.
- BAINBRIDGE, B.W. 1971. Macromolecular composition and nuclear division during spore germination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 66:319-325.
- BAINBRIDGE, B.W. 1976. Estimation of the generation time and peripheral growth zone of *Aspergillus nidulans* and *Alternaria solani* hyphae from radial growth rates and ranges in apical cell length. *Journal of General Microbiology*, 97:125-127.
- 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.
- BALL, C. 1967. Chromosome instability related to gene suppression in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 10:173-183.

- BALL, C. e J.L. AZEVEDO. 1964. A "fluffy" mutant in *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 5:9.
- BALL, C. e J.A. ROPER. 1966. Studies on the inhibition and mutations of *Aspergillus nidulans* by acridines. *Genetical Research*, 7:207-221.
- BEN-HUR, E. e M.M. ELKIND. 1973. DNA cross-linking in chinese hamster cells exposed to near ultraviolet light in the presence of 4, 5', 8-trimethylpsoralen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 331:181-193.
- BIAGI, C.M.R., E.M. MENEZES e J.L. AZEVEDO. 1975. Mutagenicidade de 8-MOP em *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Cultura*, 27:228 supl.
- BOJOVIČ-CVETIČ, D. e R. VUJIČIČ, 1974. Ultrastructure of conidiophores in *Aspergillus flavus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 63:131-135.
- BORDER, D.J. e A.P.J. TRINCI. 1970. Fine structure of the germination of *Aspergillus nidulans* conidia. *Transactions of the British Mycological Society*, 54:143-152.
- BULL, A.T. e B.M. FAULKNER. 1964. Mutants of *A. nidulans* obtained following treatment with 8-azaguanine (8 AG). *Aspergillus News Letter*, 5:8-9.
- CAMPBELL, C.K. 1971. Fine structure and physiology of conidial germination in *Aspergillus fumigatus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 57:393-402.
- CLARKE, C.H. e M.J. WADE. 1975. Evidence that caffeine, 8-methoxypsoralen and steroidal diamines are frameshift mutagens for *E. coli* K-12. *Mutation Research*, 28:123-125.
- CLUTTERBUCK, A.J. 1965. A fawn conidia mutant in *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 6:12.

- CLUTTERBUCK, A.J. 1968. New conidial colour mutants in *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 9:14.
- CLUTTERBUCK, A.J. 1969a. Cell volume per nucleus in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 55:291-299.
- CLUTTERBUCK, A.J. 1969b. The effect of morphological and spore colour mutants on a spore-specific enzyme of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 24:515.
- CLUTTERBUCK, A.J. 1969c. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 63:317-327.
- CLUTTERBUCK, A.J. 1970a. Synchronous nuclear division and septation in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 60:133-135.
- CLUTTERBUCK, A.J. 1970b. A variegated position effect in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 16:303-315.
- CLUTTERBUCK, A.J. 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 70:423-435.
- CLUTTERBUCK, A.J. 1973. Interrelations between development and pigmentation during conidiation of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 74:s50.
- COCHRANE, V.W. 1958. *Physiology of fungi*. John Wiley e Sons, Inc. New York. 524p.
- COLE, R.S. 1970. Light-induced cross-linking of DNA in the presence of furocoumarins (psoralen). Studies with phage λ , *Escherichia coli* and mouse leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 217:30-39.

- COLE, R.S. 1971. Inactivation of *Escherichia coli*, F' episomes at transfer, and bacteriophage lambda by psoralen plus 360 nm light: Significance of deoxyribonucleic acid cross-link. *Journal of Bacteriology*, 107:846-852.
- COLE, R.S. 1973. Repair of DNA containing interstrand crosslinks in *Escherichia coli*: sequential excision and recombination. *Proceedings of National Academy of Sciences. USA.*, 70:1064-1068.
- CUNHA, P.R. 1969. A study of aspects of heterokaryosis in *Aspergillus nidulans*. Thesis for Master of Science, University of Sheffield. 167p.
- CURTIS, C.R. 1970. Comparison of UV-induced delay in germination in pigmented and pigment-inhibited conidia of *Aspergillus carbonarius*. *Radiation Botany*, 10:125-130.
- D'ARCE, M.M.C.D. 1972. Contribuição ao estudo de aberrações cromossômicas numéricas em *Aspergillus nidulans*. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre. 50p. Piracicaba, SP.
- DORN, G.L. 1967. A revised map of the eight linkage groups of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 56:619-631.
- DORN, G.L. 1970. Genetic and morphological properties of undifferentiated and invasive variants of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 66:267-279.
- DORN, G.L., G.M. MARTIN e D.M. PURNELL. 1967. Genetic and cytoplasmatic control of undifferentiated growth in *Aspergillus nidulans*. *Life Sciences*, 6:629-633.
- DORN, G. e W. RIVERA. 1966. Kinetics of fungal growth and phosphatase formation in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 92:1618-1622.

- DRAKE, J.W. e J. McGUIRE. 1967. Properties of r mutants of bacteriophage T₄ photodynamically induced in the presence of thiopyronin and psoralen. *Journal of Virology*, 1:260-267.
- EBERHARDT, B.M. 1961. Exogenous enzymes of *Neurospora* conidia and mycelia. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 58:11-16.
- FAULKNER, B.M. e C.F. ARLETT. 1964. The "minute" cytoplasmatic variant of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 19:63-73.
- FIDDY, C. e A.P.J. TRINCI. 1976. Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 97:169-184.
- FLETCHER, J. 1976. Electron microscopy of genesis, maturation and wall structure of conidia of *Aspergillus terreus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 66:27-34.
- FLORANCE, E.R., W.C. DENISON e T.C. ALLEN. 1972. Ultrastructure of dormant and germinating conidia of *Aspergillus nidulans*. *Mycologia*, 64:115-123.
- FOWLKS, W.L., D.G. GRIFFITH e E.L. OGINSKY. 1958. Photosensitization of bacteria by furocoumarins and related compounds. *Nature*, London, 181:571-572.
- GALBRAITH, J.C. e J.E. SMITH. 1969. Changes in activity of certain enzymes of a tricarboxylic acid cycle and the polyoxylate cycle during the initiation of conidiation of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 15:1207-1212.
- GEALT, M.A. e D.E. AXELROD. 1974. Coordinate regulation of enzyme inducibility and developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Developmental Biology*, 41:224-232.
- GHIORSE, W.C. e M.R. EDWARDS. 1973. Ultrastructure of *Aspergillus fumigatus*. Conidia development and maturation. *Protoplasma*, 76:49-59.

- HANKS, D.L. e A.S. SUSSMAN. 1969. The relation between growth, conidiation and trehalase activity in *Neurospora crassa*. *American Journal of Botany*, 56:1152-1159.
- HANLIN, R.T. 1976. Phialide and conidium development in *Aspergillus clavatus*. *American Journal of Botany*, 63:144-155.
- HILL, E.P. e A.S. SUSSMAN. 1964. Development of trehalase and invertase activity in *Neurospora*. *Journal of Bacteriology*, 88:1556-1561.
- HOLT, G. e K.D. MACDONALD. 1967. Influence of copper on spore colour in *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum* and its availability from different media. *Aspergillus News Letter*, 8:8-9.
- HOUGHTON, J.A. 1970. A new class of slow-growing non-perithecial mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 16:285-292.
- HOUGHTON, J.A. 1971. Biochemical investigation of the slow-growing non-perithecial (sgp) mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 17:237-244.
- HOWARD-FLANDERS, P. e P.F. LIN. 1973. Genetic recombination induced by DNA cross-links in repress phage lambda. *Genetics*, 73:85-90(suppl).
- IGALI, S., B.A. BRIDGES, M.J. ASHWOOD-SMITH e B.R. SCOTT. 1970. Mutagenesis in *Escherichia coli*. IV. Photosensitization to near ultraviolet light by 8-methoxypsoralen. *Mutation Research*, 9:21-30.
- JINKS, J.L. 1963. Extrachromosomal Inheritance. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey. 177p.
- JOSEPH, R., M.S. SHANTHAMMA, F. REHANA e K. NAND. 1974. Induced mutations in *Serratia marcescens* by near UV-light in presence of psoralen. *Experientia*, 30:360-361.

- KÄFER, E. 1958. An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 9:105-145.
- KÄFER, E. 1961. The presences of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46:1581-1609.
- KÄFER, E. 1965. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 52:217-232.
- KATZ, D., D. GOLDSTEIN e R.F. ROSENBERGER. 1972. Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters. *Journal of Bacteriology*, 109:1097-1100.
- KATZ, D. e R.F. ROSENBERGER. 1970. A mutation in *Aspergillus nidulans* producing hyphal walls which lack chitin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 208:452-460.
- KATZ, D. e R.F. ROSENBERGER. 1971. Hyphal wall synthesis in *Aspergillus nidulans*: effect of protein synthesis inhibition and osmotic shock on chitin insertion and morphogenesis. *Journal of Bacteriology*, 108: 184-190.
- KESSEL, M. e R.F. ROSENBERGER. 1968. Regulation and timing of deoxyribonucleic acid synthesis in hyphae of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 95:2275-2281.
- KILBEY, B.J. 1960. "Sage": a colour modifier in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London, 180:906-907.
- KILBEY, B.J. 1963. Yellow conidial mutants of *Aspergillus nidulans* strain 16643. *Aspergillus News Letter*, 4:16-17.
- KOCH, A.L. 1975. The kinetics of mycelial growth. *Journal of General Microbiology*, 89:209-216.

- KÜSTER, E. e LITTLE, B.T. 1963. Role of phenolases in the formation of quinonoid fungal metabolic products of *Aspergillus fumigatus* Fres. and *Penicillium spinulosum* Thom. *Biochimica et Biophysica Acta*, 67:288-294.
- KWIATKOWSKI, E.A. 1962. Mycelial mutants in *A. nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 3:2.
- LACAVAL, P.M. 1973. Mutantes morfológicos induzidos por raios gama em *Aspergillus nidulans*. Tese apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia de Jaboticabal para obtenção do título de Doutor. 85p. Jaboticabal, SP.
- MACKINTOSH, M.E. e R.H. PRITCHARD. 1963. The production and replica plating of microcolonies of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 4:217-231.
- MARTINELLI, S.D. 1969. Phenol oxidases produced by mutant and wild type strains of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 10:24-25.
- MARTINELLI, S.D. 1972. Some characteristics of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 29:130.
- MARTINELLI, S.D. 1976. Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged culture. *Transactions of the British Mycological Society*, 67:121-128.
- MARTINELLI, S.D. e A.J. CLUTTERBUCK. 1971. A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 69:261-268.
- MATHEWS, M.M. 1963. Comparative study of lethal photosensitization of *Sarcina lutea* by 8-methoxypsoralen and by toluidine blue. *Journal of Bacteriology*, 85:322-328.

- McCULLOUGH, W. e C.F. ROBERTS. 1976. Isocitrato lyase constitutive mutants in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 36:291.
- 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*, 6:352-359.
- MENEZES, E.M., J.L. AZEVEDO e C. BALL. 1973. Efeito da luz ultra-violeta longa e 8-metoxipsoralen (8-MOP) em 4 linhagens de *Aspergillus nidulans*. *Relatório Científico do Instituto de Genética*. ESALQ/USP. Piracicaba, 7:110-112.
- MISHRA, N.C. 1977. Genetics and biochemistry of morphogenesis in *Neurospora*. *Advances in Genetics*, 19:341-405.
- MORTON, A.G. 1961. The induction of sporulation in mould fungi. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 153:548-549.
- MUSAJO, L. 1955. Intercessanti proprieta delle furocoumarine naturali. In: Scott, B.R., M.A. Pathak e G.R. Mohn, 1976. Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions. *Mutation Research*, 39:29-74.
- OGINSKY, E.L., G.S. GREEN, D.G. GRIFFITH, e W.L. FOWLKS. 1959. Lethal photosensitization of bacteria with 8-methoxypsoralen to long wave length ultraviolet radiation. *Journal of Bacteriology*, 78:821-833.
- OLIVER, P.T.P. 1972. Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. *Journal General of Microbiology*, 73:45-54.
- PASTUSHOK, M. e D.E. AXELROD. 1976. Effect of glucose, ammonium and media maintenance on the time of conidiophore initiation by surface colonies of *Aspergillus nidulans*. *Journal General of Microbiology*, 94:221-224.

- PATHAK, M.A., F. DANIELS e T.B. FITZPATRICK. 1962. The presently known distribution of furocoumarins (psoralens) in plants. *Journal of Investigative Dermatology*, 39:225-249.
- PIZZIRANI, A.A. 1977. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre. 111p. Piracicaba, SP.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONS, K.D. MACDONALD e A.W.J. BUFTON. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.
- RAPER, K.B. e D.I. FENNELL. 1973. The genus *Aspergillus*. R.E. Krieger Publishing Company. Huntington, New York. 686p.
- ROPER, J.A. 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8:14-15.
- ROPER, J.A. 1958. Nucleo-cytoplasmatic interaction in *Aspergillus nidulans*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 23: 141-154.
- ROSENBERGER, R.F. e M. KESSEL. 1967. Synchrony of nuclear replication in individual hyphae of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 94:1464-1469.
- SASAKI, M.S. e A. TONOMURA. 1973. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Research*, 33:1829-1836.
- SAXENA, R.K. e U. SINHA. 1973. Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged liquid culture. *Journal of General and Applied Microbiology*, 19:141-146.

- SCOTT, B.R. 1976. Failure to detect a mutagenic activity of 8-methoxypsoralen (in the dark) in strain of *Samonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Mutation Research*, 40:167-168.
- SCOTT, B.R. e T. ALDERSON. 1971. The random (non-specific) foward mutational response of gene loci in *Aspergillus* conidia after photosensitization to near ultraviolet light (365 nm) by 8-methoxypsoralen. *Mutation Research*, 12:29-34.
- SCOTT, B.R. e T. ALDERSON. 1975. An observation on conidial germination times. *Aspergillus News Letter*, 12:28-29.
- SCOTT, B.R., M.A. PATHAK e G.R. MOHN. 1976. Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions. *Mutation Research*, 39:29-74.
- STEEL, R.G.D. e J.H. TORRIE. 1960. Principles and Procedures of Statistics. Mc Graw-Hill Book Company, Inc., New York. 481p.
- SWANBECK, G. e M. THYRESSON. 1974. Induction of respiration-deficient mutants in yeast by psoralen and light. *Journal of Investigative Dermatology*, 63:242-244.
- TANAKA, K. 1966. Change in ultrastructure of *Aspergillus oryzae* conidia during germination. *Journal of General and Applied Microbiology*, 12: 239-246.
- TANAKA, K. e YANAGITA. 1963. Electron microscopy on ultrathin sections of *Aspergillus niger*. II. Fine structure of conidia - bearing apparatus. *Journal of General and Applied Microbiology*, 9:189-203.
- THOMS, H. 1911. The constitution of xanthotoxin and its relationship to bergapten. *Berichte Deutschen Chemischer Gesellsch*, 44:3325-3332.

- TOWNSEND, M.E., H.M. WRIGHT e D.A. HOPWOOD. 1971. Efficient mutagenesis by near ultraviolet light in the presence of 8-methoxypsoralen in *Streptomyces*. *Journal of Applied Bacteriology*, 34:799-801.
- TRINCI, A.P.J. 1969. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *Journal of General Microbiology*, 57:11-24.
- TRINCI, A.P.J., A. PEAT e G.H. BANBURY. 1968. Fine structure of phialide and conidiospore development in *Aspergillus giganteus* "wehmer". *Annals of Botany*, 32:241-250.
- TSUKAHARA, T. 1968. Electron microscopy of swelling and germinating conidiospores of *Aspergillus niger*. *Sabouradia*, 6:185-191.
- TSUKAHARA, T. 1970. Electron microscopy of conidiospore formation in *Aspergillus niger*. *Sabouradia*, 9:93-97.
- TURIAN, G. 1961. L'acétate et son double effect d'induction isocitratasique et de différenciation conidienne chez *Neurospora*. In: Weiss, B. e G. Turian. 1966. A study of conidiation in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology*, 4:407-418.
- TURIAN, G. 1966. Morphogenesis in Ascomycetes. In: The Fungi (G.C. Ainsworth and A.S. Sussman, Edts.). Academic Press, New York, 2:339-385.
- TURIAN, G. e N. MATIKIAN. 1966. Conidiation of *Neurospora crassa*. *Nature*, London, 212:1067-1068.
- UREY, J.C. 1971. NADase and conidiation in *Neurospora*. *Genetics*, 68:s69.
- VAN ARKEL, G.A. 1962. A new colour mutante: "pale". *Aspergillus News Letter*, 3:3.

- VUJIČIĆ, R. e M. MUNTANJOLA-CVETROVIĆ. 1973. A comparative ultrastructural study on conidium differentiation in *Cladosarum* - like mutant 22B of *Aspergillus aureolatus*. *Journal of General Microbiology*, 79:45-51.
- WEISBERG, S.H. e G. TURIAN. 1971. Ultrastructure of *Aspergillus nidulans* conidia and conidial lomassomes. *Protoplasma*, 72:55-67.
- WEISS, B. e G. TURIAN. 1966. A study of conidiation in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology*, 44:407-418.
- YUILL, E. 1939. Two new *Aspergillus* mutants. In: Raper, K.B. e D.I. Fennell, 1973. *The genus Aspergillus*. R.E. Kriger Publishing Company. Huntington, New York. 686p
- ZALOZAR, M. 1959. Growth and differentiation of *Neurospora*. *American Journal of Botany*, 46:602-610.
- ZALOZAR, M. e V.W. COCHRANE. 1956. Diphosphopyridine nucleotidase in the life cycle of *Neurospora crassa*. *American Journal of Botany*, 43: 107-110.

9. APÉNDICE

Tabela A₁ - Análise mitótica do variante morfológico 1.

Haplóides variante 1//MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	S e t o r e s	
		normais	morfológicos
I	bi ⁺	25	0
	bi	0	1
II	w ⁺	12	0
	w	13	1
III	gal ⁺	13	0
	gal	12	1
IV	pyro ⁺	17	1
	pyro	8	0
V	fac ⁺	14	0
	fac	11	1
VI	s ⁺	14	1
	s	11	0
VII	nic ⁺	13	1
	nic	12	0
VIII	ribo ⁺	15	1
	ribo	10	0

O determinante genético da morfologia alterada localiza-se no grupo de ligação I.

Tabela A₂ - Análise meiótica do variante morfológico 1

Variante 1 x MSE				
Grupo de Ligação	Marcador	C o l o n i a s		Valor de recombinação
		normais	morfológicas	
I	bi ⁺	127	2	5,03%
	bi	5	5	

Haplóide variante 2//MES

Grupo de ligação	Marcadores	Setores normais
I	bi ⁺	15
	bi	1
II	w ⁺	8
	w	8
III	gal ⁺	9
	gal	7
IV	pyro ⁺	11
	pyro	5
V	fac ⁺	8
	fac	8
VI	s ⁺	5
	s	11
VII	nic ⁺	8
	nic	8
VIII	ribo ⁺	9
	ribo	7

O determinante genético da morfologia alterada localiza-se no grupo de ligação I.

Tabela A₄ - Análise meiótica do variante morfológico 2

Variante 2 x MSE

Grupo de ligação	Marcador	Colônias normais	Valor de recombinação
I	bi ⁺	42	27,50%
	bi	24	

Tabela A₅ - Análise mitótica do variante morfológico 3

Haplóide variante 3// MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	S e t o r e s	
		normais	morfológicos
I	bi ⁺	67	7
	bi	3	1
II	w ⁺	2	*
	w	68	
III	gal ⁺	53	3
	gal	17	5
IV	pyro ⁺	39	3
	pyro	31	5
V	fac ⁺	30	3
	fac	40	5
VI	s ⁺	14	6
	s	56	2
VII	nic ⁺	25	5
	nic	45	3
VIII	ribo ⁺	21	6
	ribo	49	2

* Não foi possível distinguir a coloração dos conídios.

O determinante genético da morfologia alterada localiza-se no grupo de ligação II.

Tabela A₆ - Análise meiótica do variante morfológico 3

Variante 3 x MSE			
Grupo de Ligação	Marcador	Colonias normais	Valor de recombinação
II	w ⁺	208	67,09%
	w	102	

Tabela A₇ - Análise mitótica do variante morfológico 4

Haplóides variante 4//MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	S e t o r e s	
		normais	morfológicos
I	bi ⁺	48	0
	bi	0	63
II	w ⁺	0	0
	w	48	63
III	gal ⁺	0	63
	gal	48	0
IV	pyro ⁺	0	63
	pyro	48	0
V	fac ⁺	0	63
	fac	48	0
VI	s ⁺	0	63
	s	48	0
VII	nic ⁺	0	63
	nic	48	0
VIII	ribo ⁺	0	63
	ribo	48	0

Não foi possível concluir em que grupo de ligação se localiza o determinante genético da morfologia alterada.

Tabela A₈ - Análise mitótica do variante morfológico 4

Haplóides variante 4//MSF			
Grupos de ligação	Marcadores	S e t o r e s	
		normais	morfológicos
I	bi ⁺	26	0
	bi	0	4
II	w ⁺	26	0
	w	0	4
III	gal ⁺	0	4
	gal	26	0
IV	pyro ⁺	0	4
	pyro	26	0
V	fac ⁺	0	4
	fac	26	0
VI	s ⁺	1	4
	s	25	0
VII	nic ⁺	0	4
	nic	26	0
VIII	ribo ⁺	0	4
	ribo	26	0

Não foi possível concluir em que grupo de ligação se localiza o determinante genético da morfologia alterada.

Tabela A₉ - Análise meiótica do variante morfológico 4

Variante 4 x MSE				
Grupo de ligação	Marcador	C o l o n i a s		Valor de recombinação
		normais	morfológicas	
VI	s ⁺	12	2	24,28%
	s	51	5	

Tabela A₁₀ - Análise mitótica do variante morfológico 6

Haplóides variante 6//MSE		
Grupos de ligação	Marcadores	Setores normais
I	bi ⁺	47
	bi	7
II	w ⁺	15
	w	39
III	gal ⁺	17
	gal	37
VI	pyro ⁺	23
	pyro	31
V	fac ⁺	26
	fac	28
VI	s ⁺	24
	s	30
VII	nic ⁺	25
	nic	29
VIII	ribo ⁺	23
	ribo	31

Os dados sugerem que o determinante genético da morfologia alterada localiza-se no grupo de ligação I.

Tabela A₁₁ - Análise meiótica do variante morfológico 6

Variante 6 x MSE				
Grupo de ligação	Marcador	C o l o n i a s		Valor de recombinação
		normais	morfológicas	
I	bi ⁺	157	30	37,27%
	bi	74	18	

Tabela A₁₂ - Análise mitótica do variante morfológico 7

Haplóides variante 7//MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	S e t o r e s	
		normais	morfológicos
I	bi ⁺	33	22
	bi	4	2
II	w ⁺	23	24
	w	15	0
III	gal ⁺	4	10
	gal	33	14
IV	pyro ⁺	11	20
	pyro	26	4
V	fac ⁺	15	21
	fac	22	3
VI	s ⁺	9	4
	s	28	20
VII	nic ⁺	0	24
	nic	37	0
VIII	ribo ⁺	16	19
	ribo	21	5

O determinante genético da morfologia alterada localiza-se no grupo de ligação VII.

Tabela A₁₃ - Análise meiótica do variante morfológico 7

Variante 7 x MSE				
Grupo de Ligação	Marcador	C o l o n i a s		Valor de recombinação
		normais	morfológicas	
VII	nic ⁺	23	103	23,26%
	nic	52	24	

Tabela A₁₄ - Análise mitótica do variante morfológico I

.143.

Haplóide variante I // <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₁</i>			
Grupo de ligação	Marcadores	S e t o r e s	
		normais	morfológicos
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	1	3
	<i>pro</i> <i>paba</i>	66	0
II	<i>w</i> ⁺	64	*
	<i>w</i>	3	
III	<i>gal</i> ⁺	62	0
	<i>gal</i>	5	3
IV	<i>pyro</i> ⁺	65	0
	<i>pyro</i>	2	3
V	<i>fac</i> ⁺	47	0
	<i>fac</i>	20	3
VI	<i>s</i> ⁺	51	2
	<i>s</i>	16	1
VII	<i>nic</i> ⁺	66	3
	<i>nic</i>	1	0
VIII	<i>ribo</i> ⁺	67	3
	<i>ribo</i>	0	0

* Não foi possível observar coloração de conídios, pois este mutante raramente apresenta-os.

Os determinantes genéticos da morfologia alterada localizam-se nos grupos de ligação I e IV.

Tabela A₁₅ - Análise meiótica do variante morfológico I

Variante I x <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₁				
Grupos de ligação	Marcadores	C o l o n i a s		Valor de recombinação
		normais	morfológicos	
I	<i>pro</i> ⁺	0	24	0,0%
	<i>pro</i>	16	0	
	<i>pab</i> ⁺	0	24	0,0%
	<i>paba</i>	16	0	
IV	<i>pyro</i> ⁺	16	1	2,50%
	<i>pyro</i>	0	23	

Tabela A₁₆ - Análise mitótica do variante morfológico III

Haplóides variante III// <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₁		
Grupo de ligação	Marcadores	Setores normais
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	34
	<i>pro</i> <i>paba</i>	13
II	<i>w</i> ⁺	14
	<i>w</i>	33
III	<i>gal</i> ⁺	33
	<i>gal</i>	14
IV	<i>pyro</i> ⁺	29
	<i>pyro</i>	18
V	<i>fac</i> ⁺	43
	<i>fac</i>	4
VI	<i>s</i> ⁺	34
	<i>s</i>	13
VII	<i>nic</i> ⁺	30
	<i>nic</i>	17
VIII	<i>ribo</i> ⁺	35
	<i>ribo</i>	12

O determinante genético da morfologia alterada localiza-se no grupo de ligação V.

Tabela A₁₇ - Análise meiótica do variante morfológico III

Variante III x <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₁				
Grupo de ligação	Marcador	C o l o n i a s		Valor de recombinação
		normais	morfológicas	
V	<i>fac</i> ⁺	54	10	34,14%
	<i>fac</i>	18	0	

Tabela A₁₈ - Análise mitótica do variante morfológico IV

Haplóides variante IV// <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₁			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		normais	morfológicos
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	27	5
	<i>pro</i> <i>paba</i>	14	0
II	<i>w</i> ⁺	39	0
	<i>w</i>	2	5
III	<i>gal</i> ⁺	38	3
	<i>gal</i>	1	2
IV	<i>pyro</i> ⁺	41	3
	<i>pyro</i>	0	2
V	<i>fac</i> ⁺	37	3
	<i>fac</i>	4	2
VI	<i>s</i> ⁺	40	4
	<i>s</i>	1	1
VII	<i>nic</i> ⁺	41	4
	<i>nic</i>	0	1
VIII	<i>ribo</i> ⁺	39	5
	<i>ribo</i>	2	0

O determinante genético da morfologia alterada localiza-se no grupo de ligação II .

Tabela A₁₉ - Análise meiótica do variante morfológico IV.

Variante IV x <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₁				
Grupo de ligação	Marcador	C o l o n i a s		Valor de recombinação
		normais	morfológicas	
II	w ⁺	722	0	24,83%
	w	305	201	

Tabela A₂₀ - Análise mitótica do variante morfológico V

Haplóides variante V// <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₁</i>		
Grupo de ligação	Marcadores	Setores normais
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	28
	<i>pro</i> <i>paba</i>	22
II	<i>w</i> ⁺	47
	<i>w</i>	3
III	<i>gal</i> ⁺	50
	<i>gal</i>	0
IV	<i>pyro</i> ⁺	45
	<i>pyro</i>	5
V	<i>fac</i> ⁺	33
	<i>fac</i>	17
VI	<i>s</i> ⁺	48
	<i>s</i>	2
VII	<i>nic</i> ⁺	44
	<i>nic</i>	6
VIII	<i>ribo</i> ⁺	50
	<i>ribo</i>	0

Os determinantes genéticos da morfologia alterada localizam-se nos grupos de ligação III e VIII.

Tabela A₂₁ - Análise meiótica do variante morfológico V

Variante V x <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₁				
Grupos de ligação	Marcadores	C o l o n i a s		Valor de recombinação
		normais	morfológicos	
III	<i>gal</i> ⁺	63	18	32,08%
	<i>gal</i>	25	28	
VIII	<i>ribo</i> ⁺	51	20	42,53%
	<i>ribo</i>	37	26	