

ELZA MACHADO MENEZES

Licenciada em Ciências Biológicas

**ANÁLISE GENÉTICA DE VARIANTES DETERIORADOS E
SUAS REVERSÕES EM *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter.**

Orientador : Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Uni-
versidade de São Paulo, para obtenção do
título de "Mestre".

PIRACICABA

Estado de São Paulo

1974

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo,

eminente Geneticista de Microrganismos,
exemplo de Professor, sábio e modesto,
minha sincera homenagem.

Ao meu esposo

A minha mãe

Aos meus irmãos

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ficam aqui consignados os sinceros agradecimentos a:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, mestre e amigo, pelo estímulo e valiosa orientação na realização deste trabalho e pela nossa iniciação na pesquisa científica.

Prof. Dr. Ernesto Paterniani, pelas facilidades concedidas como Diretor do Instituto de Genética.

Prof. Dr. Almiro Blumenschein, pelas facilidades concedidas quando Diretor do Instituto de Genética.

Prof. Dr. Flávio César de Almeida Tavares, pela revisão cuidadosa do original e pelas sugestões apresentadas.

Meu esposo, Eurípedes Barsanulfo Menezes, pelo estímulo e extrema paciência.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela autorização de minha permanência em Piracicaba, para o término deste trabalho.

Funcionários da Biblioteca Central da ESALQ/USP, pelos serviços prestados.

E finalmente, a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do presente trabalho.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE QUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE GRÁFICOS	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Instabilidade mitótica	3
2.1.1. Instabilidade em organismos superiores	3
2.1.2. Instabilidade em microrganismos	5
2.1.3. Instabilidade em <u>Aspergillus nidulans</u>	6
2.1.4. O efeito de agentes físicos e químicos sobre a instabilidade em <u>Aspergillus nidulans</u>	9
2.2. Genes supressores	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Símbolos e fenótipos dos mutantes usados	13
3.2. Linhagens utilizadas	14
3.3. Meios de Cultura e Soluções usadas	16
3.3.1. Meio Mínimo (PONTECORVO e col., 1953)	16
3.3.2. Meio Completo (PONTECORVO e col., 1953)	16
3.3.3. Meio de acetato de amônio (APIRION, 1962)	17
3.3.4. Meio Mínimo mais galactose	17
3.3.5. Solução de vitaminas	17
3.3.6. Solução salina	18
3.3.7. Solução de tween	18
3.3.8. Meio mínimo líquido + 2% de meio completo	18
3.3.9. Solução de p-fluorfenilalanina (pFA)	18

	Pág.
3.3.10. Suplementos adicionados ao meio mínimo	19
3.3.11. Placas de análise	19
3.4. Esterilização e temperatura usadas	19
3.5. Obtenção de setores deteriorados espontaneamente, a partir das linhagens <u>A</u> e <u>pro₁, paba₆, y</u>	20
3.6. Obtenção de colônias deterioradas após tratamento com luz ultra-violeta	20
3.7. Obtenção de setores deteriorados induzidos por <u>DNA</u> exógeno	21
3.8. Obtenção de reversões	21
3.8.1. Reversão espontânea	21
3.8.2. Reversão induzida por luz ultra-violeta	22
3.9. Técnicas de Análise Genética	22
3.9.1. Obtenção de heterocários	22
3.9.2. Análise mitótica	23
3.9.3. Análise meiótica	24
3.9.4. Análise genética das reversões	25
3.9.5. Testes de alelismo	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Obtenção espontânea de setores deteriorados e melhorados e análise do seu número e emergência	27
4.2. Obtenção de setores deteriorados e melhorados induzidos por luz ultra-violeta e análise do seu número e emergência	31
4.3. Obtenção de colônias deterioradas após tratamento da linhagem <u>A</u> , com luz ultra-violeta	32
4.4. Obtenção de setores deteriorados e melhorados induzidos por <u>DNA</u> exógeno e análise do seu número e emergência ..	33

	Pág.
4.5. Comparação entre a instabilidade espontânea e induzida por luz ultra-violeta e DNA exógeno	35
4.6. Análise genética dos deteriorados obtidos espontaneamente	40
4.7. Análise genética dos deteriorados obtidos após tratamento com luz ultra-violeta	45
4.8. Obtenção das reversões	51
4.9. Estudo das reversões	52
4.9.1. Análise genética das reversões obtidas espontaneamente	52
4.9.2. Análise genética das reversões induzidas por luz ultra-violeta	54
4.9.3. Testes de alelismo	60
5. DISCUSSÃO	63
5.1. Observação da instabilidade mitótica espontânea e induzida	63
5.2. Análise genética dos variantes deteriorados obtidos	65
5.3. Frequência de reversões	69
5.4. Análise genética das reversões	71
6. RESUMO E CONCLUSÕES	73
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS	75
8. BIBLIOGRAFIA CITADA	78
APÊNDICE	85

LISTA DE QUADROS

Quadro	Pág.
1 Número de setores obtidos espontaneamente	28
2 Distância do centro da colônia ao ponto de emergência de setores deteriorados e melhorados obtidos espontaneamente	30
3 Número de setores obtidos após tratamento com luz ultra-violeta	31
4 Distância do centro da colônia ao ponto de emergência de setores deteriorados e melhorados após tratamento com luz ultra-violeta	32
5 Número de setores induzidos pelo DNA exógeno	34
6 Distância do centro da colônia ao ponto de emergência de setores deteriorados e melhorados obtidos após tratamento com DNA exógeno	34
7 Análise mitótica do V_{36}	40
8 Análise meiótica do V_{36}	41
9 Análise mitótica do $V_{36.1}$	42
10 Análise meiótica do $V_{36.1}$	43
11 Análise mitótica do $V_{36.1.1}$	44
12 Análise meiótica do $V_{36.1.1}$	45
13 Análise mitótica do V_{41}	46
14 Análise meiótica do V_{41}	47
15 Segregação meiótica obtida de cruzamentos envolvendo linhagens normais X linhagens com os determinantes de deterioração	48

Quadro	Pág.
16 Localização dos determinantes de deterioração nos grupos de ligação do <u>A. nidulans</u>	49
17 Frequência de reversões espontâneas	51
18 Frequência de reversões após tratamento com luz ultravioleta	52
19 Análise mitótica da reversão 1 do V ₃₇	53
20 Análise meiótica da reversão 1 do V ₃₇	54
21 Análise mitótica da reversão 2 do V ₄₁	55
22 Segregantes meióticos do cruzamento reversão 2 do V ₄₀ X MSE	56
23 Localização dos supressores nos grupos de ligação do <u>A. nidulans</u>	58
24 Segregantes meióticos resultantes de cruzamentos envolvendo supressores localizados no mesmo grupo de ligação ...	61

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Marcadores genéticos da linhagem <u>A</u>	14
2	Marcadores genéticos da linhagem <u>MSE</u>	15
3	Variante deteriorado $V_{36.1}$ e seu derivativo $V_{36.1.1}$	29
4	Reversão verdadeira do variante deteriorado V_{40}	57
5	Reversão devido a supressores do variante deteriorado V_{37}	57
6	Genes supressores alelos	62
7	Genes supressores não alelos	62
8	Esquema representativo dos prováveis genótipos dos variantes deteriorados V_{36} , $V_{36.1}$ e $V_{36.1.1}$	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico		Pág.
1	Número de setores obtidos espontaneamente	28
2	Pedigree das colônias deterioradas obtidos após tratamento com luz ultra-violeta	33
3	Porcentagem de setores amarelos obtidas espontaneamente e induzidos por luz ultra-violeta e DNA exógeno	36
4	Porcentagem de setores verdes obtidos espontaneamente e induzidos por luz ultra-violeta e DNA exógeno	37
5	Porcentagem de setores deteriorados obtidos espontaneamente e induzidos por luz ultra-violeta e DNA exógeno ...	38
6	Porcentagem de setores obtidos espontaneamente e induzidos por luz ultra-violeta e DNA exógeno	39
7	Localização dos determinantes de deterioração nos grupos de ligação do <u>A. nidulans</u> ,	50
8	Localização dos supressores nos grupos de ligação do <u>A. nidulans</u> ,	59

1. INTRODUÇÃO

O fenômeno da instabilidade genética mitótica ou somática é conhecido e descrito em muitos organismos incluindo-se entre eles principalmente o milho, a Drosophila, o fumo, as bactérias e os fungos. Uma característica comum em quase todos os casos de instabilidade é a presença de material genético em excesso.

Os fungos se constituem em excelente material para estudos de instabilidade mitótica. Especialmente para o caso do Aspergillus nidulans estes estudos ficam facilitados, pois aliado a um ciclo vital rápido dois tipos de recombinação estão envolvidos, ou sejam, o ciclo sexual e o ciclo parassexual. Além disso, nessa espécie há possibilidade do isolamento de setores com instabilidade mitótica, o que é praticamente impossível de ser realizado em organismos superiores.

Linhagens do fungo filamentosso A. nidulans, que apresentam duplicações cromossômicas são instáveis mitoticamente e produzem setores melhorados e deteriorados (NGA & ROPER, 1968; AZEVEDO & ROPER, 1970 e AZEVEDO, 1971). Os setores melhorados foram estudados por NGA & ROPER (1968) e originam-se por deleções cromossômicas de tamanhos variados, em um dos segmentos em duplicata. Os setores deteriorados, por outro lado, tem sua provável origem devido a novas duplicações no segmento originalmente duplicado. Eles foram analisados por NGA & ROPER (1968), AZEVEDO &

ROPER (1970), AZEVEDO (1971) e ROSATO (1973). A análise genética dos variantes deteriorados de segunda ordem mostrou, em muitos casos, que o determinante de deterioração estava localizado em grupos de ligação não envolvidos na duplicação original, tendo-se sugerido que ocorreram transposições de material genético de um grupo de ligação para outro. Esses setores deteriorados caracterizam-se por apresentar taxa de crescimento, em certos casos, reduzida, coloração marron do micélio, pequena produção de conídios, além de instabilidade vegetativa em variados graus.

Para se ter uma melhor compreensão do fenômeno da instabilidade mitótica em A. nidulans é de grande interesse o estudo de um número maior de variantes deteriorados, obtidos a partir de linhagens instáveis tanto espontaneamente, como induzidos por agentes mutagênicos. Também o estudo da frequência de reversão e as causas dessa reversão em linhagens de genótipo deteriorado, podem contribuir para o esclarecimento do fenômeno da instabilidade mitótica. Como citado, uma vez que, o fenômeno parece ser dependente da presença de material genético em excesso, seria interessante observar o efeito de ácido desoxiribonucleico (DNA) exógeno na instabilidade vegetativa. Segundo estas considerações, o presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se obter maior número de variantes deteriorados espontaneamente e induzidos por luz ultra-violeta e para através da análise genética, verificar as causas da deterioração. Também, para se ter uma visão dos fenômenos genéticos envolvidos na instabilidade foram realizados estudos da reversão de alguns dos variantes deteriorados e sua análise genética. Finalmente, foi também verificada a possível ação mutagênica do DNA exógeno na produção de setores deteriorados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A presente revisão da literatura será dividida em duas partes principais. Na primeira será feita uma revisão dos trabalhos relacionados com a instabilidade mitótica em geral, mais especificamente referente aos casos já descritos de instabilidade em A. nidulans. A segunda parte da revisão será relativa aos genes supressores, uma vez que muitos dos casos de reversão são devidos aos mesmos.

2.1. Instabilidade mitótica

2.1.1. Instabilidade em organismos superiores

Os primeiros casos bem estudados de instabilidade somática em organismos vivos foram descritos por DEMEREC (1937) em Drosophila mostrando que o aumento da taxa de mutação era devido a presença de genes mutadores. No entanto, apesar de publicações esporádicas a respeito, estudos mais detalhados foram realizados em milho por McCLINTOCK (1951, 1953, 1955, 1956), concluindo que existe um tipo de unidade genética que não apresenta localização permanente na estrutura cromossômica. Quando esses elementos são temporariamente ligados ao gene cromossomal, modificam sua expressão fenotípica, sua taxa de mutação, ou ambas. A autora denominou essas unidades de "elementos controladores", que parecem existir em diferentes formas, dependendo dos locos aos quais estão associados. Ainda em

milho, GREENBLATT & BRINK (1962, 1963) e GREENBLATT (1966), denominaram de "elementos movimentadores" aos "elementos controladores" de McCLINTOCK responsáveis pelo mecanismo de transposição de material genético de um sítio doador para um sítio receptor, durante os processos de duplicação cromossômica na mitose. GREENBLATT (1968) continuando os trabalhos com coloração em pericarpo de milho, sugeriu que: "a transposição ocorre somente quando o cromossomo e o elemento transponível modulador (Mp) estão se replicando; apenas a nova cópia de Mp sofre transposição; o sítio receptor do Mp não pode ter se replicado durante a transposição e o Mp transposto pode replicar uma segunda vez". Portanto nos casos de instabilidade descritos em milho, transposição de material genético e duplicações cromossômicas parecem estar envolvidos. O mesmo provavelmente ocorre em Drosophila melanogaster, pois, GREEN (1967) descreveu a instabilidade no loco "white" que apresentou mutação para diferentes estados alélicos desde o selvagem até o branco. Em 1969 o mesmo autor estudou quatro tipos de transposições independentes de um segmento do gene "white" para o cromossomo III de D. melanogaster. Análises genéticas indicaram transposições de um elemento controlador. Assim, reversão de w^c para w^+ corresponde à liberação do elemento controlador dando estabilidade e transposição desse elemento para outro cromossomo origina a instabilidade.

Ainda em organismos superiores, BURNS & GERSTEL (1967) estudaram um caso de instabilidade em híbridos de Nicotiana tabacum X Nicotiana otophora. Verificaram que se tratava da instabilidade de um bloco de heterocromatina ao qual estava ligado o alelo Co^V para a coloração carmin. Este podia se ligar a diferentes cromossomos durante as divisões mitóticas, originando a instabilidade. A perda do segmento produzia setores variegados.

2.1.2. Instabilidade em microrganismos

Também em microrganismos, à semelhança do que ocorre em organismos superiores, casos de instabilidade genética tem sido relatados com certa frequência. Assim, TREFFERS e col. (1954) detectaram em Escherichia coli uma alta taxa de mutação para resistência à estreptomicina e GOLDSTEIN & SMOOT (1955) descreveram uma linhagem com alta taxa de mutação para auxotrofia. Em ambos os casos, a alta taxa de mutação era devido a genes mutadores.

DAWSON & SMITH - KEARY (1963) estudando a instabilidade genética em Salmonella typhimurium propuzeram o termo "epissomos controladores" aos elementos responsáveis pela instabilidade, idênticos aos "elementos controladores" em milho, descritos por McCLINTOCK.

Em Neurospora crassa foi descrito por BARNETT & DE SERRES (1963) um caso de instabilidade onde o sítio instável existe sob a forma de dois alelos altamente mutáveis, cada um mutando para o outro, espontaneamente, em alta frequência. Os autores sugeriram como responsável pela instabilidade, mudanças do tipo transição, dos pares de bases.

Ainda em Neurospora, NEWMEYER (1965) e NEWMEYER & TAYLOR (1967) analisaram um caso de instabilidade devido a uma inversão pericêntrica. Quando ocorria permuta simples na região invertida originavam dois produtos: um duplicado e o outro deficiente para o mesmo segmento, este último, sendo letal. As progênies apresentando duplicações eram instáveis mitoticamente, produzindo setores que se assemelhavam ao tipo selvagem.

LENHART (1973a) realizou estudos sobre os diversos mecanismos responsáveis pela instabilidade vegetativa nos Ascomicetos. Ele considerou como mecanismos da instabilidade: a mutação cromossômica, a

aneuploidia, a heterocariose, a origem dos diplóides e seus segregantes e os fatores extranucleares. O mesmo autor (1973 b) estudou a instabilidade de mitótica induzida por luz ultra-violeta no dermatófito Microsporium gypseum.

2.1.3. Instabilidade em Aspergillus nidulans

O estudo da instabilidade genética em A. nidulans, pode ser dividido em duas fases bem distintas. Na primeira fase os casos de instabilidade, verificadas principalmente em linhagens diplóides, puderam ser explicadas através de permuta mitótica e não disjunção conduzindo à haploidização. Assim é que, ROPER em 1952 explicou o aparecimento de recombinantes mitóticos em linhagens diplóides de A. nidulans, através do processo de permuta mitótica. Esses estudos foram continuados por PONTECORVO e col. (1954) que sugeriram como responsáveis pelo fenômeno dois mecanismos: a distribuição irregular dos cromossomos na mitose e a permuta mitótica. Análises genéticas baseadas na recombinação mitótica foram ainda realizadas por PONTECORVO & KÄFER (1958).

KÄFER (1960) descreveu o fenômeno da recombinação mitótica em linhagens diplóides através da haploidização, onde ocorrem perdas sucessivas de cromossomos, atingindo o estado haplóide. Em 1961, a mesma autora, descreveu o fenômeno da aneuploidia, onde esse estado é obtido por um processo de não disjunção mitótica, havendo perdas sucessivas de cromossomos.

POLLARD e col. (1968) estudaram os efeitos exercidos pelas aberrações cromossômicas na não disjunção mitótica e meiótica. Em cruzamentos entre linhagens normais, a taxa de não disjunção meiótica é muito baixa, aumentando consideravelmente quando são envolvidas linhagens com aberrações cromossômicas. Verificaram que o efeito da translocação foi

mais pronunciado e apresentou um efeito sinérgico quando as duas linhagens cruzadas apresentavam aberrações.

Outros tipos de instabilidade foram explicados por JINKS (1966), como devidos à presença de fatores citoplasmáticos.

A segunda fase de estudos sobre instabilidade em A. nidulans teve início com o trabalho de BAINBRIDGE & ROPER (1966) que descreveram os efeitos causados por uma duplicação cromossômica. Estudando os fatores genéticos responsáveis pela alteração da morfologia no A. nidulans, verificaram na progênie de pais morfologicamente normais, um variante que apresentava taxa de crescimento reduzida. Esse variante foi denominado "crinkled" e carregava uma duplicação cromossômica resultante de uma translocação não recíproca em um dos pais. Essas colônias "crinkled" eram instáveis mitoticamente e produziam setores que se aproximavam do normal, quanto à morfologia e taxa de crescimento. Esses setores surgiam devido a perdas de partes variáveis do segmento em duplicata. Ainda BAINBRIDGE (1970) descreveu uma linhagem de A. nidulans que apresentava uma translocação envolvendo os cromossomos III e VIII. Um segmento do grupo de ligação III carregando várias marcas foi translocado para o grupo de ligação VIII. Os pontos de quebra e ligação foram mapeados pela detecção de ligação entre o tipo "crinkled" e marcas genéticas na região de quebra. Também BALL (1966, 1967) verificou que as translocações cromossômicas causam muitas vezes instabilidade vegetativa. Estudando linhagens que haviam sofrido reversão para o gene meth₁ que condiciona deficiência nutricional para metionina, encontrou tipos que não mais requeriam esse aminoácido e além disso, apresentavam instabilidade vegetativa. A análise genética mostrou a presença de uma translocação não-recíproca entre os cromossomos III e V. Os dados indicavam também que o local onde ocorreu a translocação era a região responsável pela supressão e instabilidade.

Para explicar o fenômeno da instabilidade, NGA & ROPER (1966) sugeriram vários mecanismos, entre eles: perda terminal, mutação, permuta mitótica e permuta desigual entre cromatídeos irmãos durante a mitose. Se apenas um mecanismo fosse o responsável pela instabilidade, os autores sugeriram que possivelmente era a permuta desigual entre cromatídeos irmãos a responsável pela mesma. Continuando seus trabalhos com linhagens duplicadas de A. nidulans, NGA & ROPER (1968) verificaram que essas linhagens apresentam uma morfologia alterada, taxa de crescimento reduzida e instabilidade mitótica, produzindo setores melhorados e deteriorados. Sugeriram o aparecimento de setores melhorados como sendo devido a perdas em tamanhos variados do segmento em duplicata. Os setores deteriorados, que são altamente instáveis, surgem provavelmente devido a novas duplicações em tandem. Explicaram ainda o aparecimento de setores melhorados e deteriorados, através de um processo de permuta mitótica entre os segmentos em duplicata podendo ocorrer, ou por permuta desigual entre cromatídeos irmãos, ou permuta em alça intra-cromossômica.

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

ROPER & NGA (1969) continuando seus estudos com a instabilidade mitótica, mostraram que deleções nos segmentos em duplicata em linhagens haplóides e diplóides, podem produzir respectivamente, hipohaplóides e hipodiplóides.

AZEVEDO (1970, 1971) e AZEVEDO & ROPER (1970) verificaram o aparecimento de variantes melhorados e deteriorados em linhagens duplicadas. Estudando os variantes deteriorados, os autores observaram que eles podem ser mais, ou menos instáveis. Os primeiros apresentaram uma mutação no segmento em duplicata e os segundos em outros grupos de ligação. Foi proposto que a deterioração e o aumento da instabilidade são resultantes de duplicações em tandem no segmento duplicado e a transposição do determinante para regiões não duplicadas, reduzem a instabilidade. Analisaram vários deteriorados que foram localizados em todos os grupos de ligação do A. nidulans.

Em relação à aplicação dos estudos realizados sobre a instabilidade genética nos fungos industriais, BALL & AZEVEDO (1974) apresentam uma revisão onde eles mostram a importância dos mesmos para a obtenção de linhagens mais produtivas e para evitar a sua degeneração. A estabilização da linhagem pode ser realizada através de alterações genéticas ou controle do ambiente de crescimento.

2.1.4. O efeito de agentes físicos e químicos sobre a instabilidade em Aspergillus nidulans

Foram realizados alguns trabalhos sobre a ação de certos agentes físicos e químicos na instabilidade mitótica do A. nidulans. Assim, COOKE e col. (1970) realizaram estudos sobre a instabilidade em linhagens duplicadas utilizando o azul de tripan adicionado ao meio de cultura sólido. Verificaram que esta droga aumenta ainda mais a instabilidade em linhagens duplicadas. Ainda ROPER e col. (1972), verificaram os efeitos exercidos pela cafeína em linhagens duplicadas de A. nidulans. A cafeína aumenta a frequência de deleções dos segmentos duplicados, sem alterar as proporções dos diferentes tipos de deleções. Uma possível

explicação para o fenômeno é que a cafeína estimula o mecanismo que em linhagens não balanceadas, produz erros de replicação conduzindo a deleções.

AZEVEDO (1973) realizou estudos com uma linhagem duplicada do A. nidulans que produzia em média 3,2 setores por colônia e selecionou após irradiação com luz ultra-violeta, dois variantes. Um deles sendo mais estável que a linhagem original, produzia em média menor número de setores e o outro, mais instável, produzia grande número de setores por colônia. Analisando geneticamente esses variantes, o autor verificou que o mais instável apresentava uma translocação, responsável pelo aumento da instabilidade. O variante mais estável, apresentou um determinante de estabilidade localizado no grupo de ligação VIII, que reduzia o número de setores melhorados.

LEE & NGA (1973) tratando uma linhagem duplicada (duplicação do cromossomo I) com o 7,8,12 trimetilbenzeno antraceno, obtiveram uma linhagem que apresentava além da duplicação do cromossomo I, uma translocação VI-VIII. Essa linhagem produzia grande quantidade de peritécios quando cultivada em meio vegetativo. Foram obtidos segregantes mitóticos, resultantes da haploidização do diplóide, carregando a translocação VI-VIII mas não a duplicação I, os quais apresentavam um crescimento vegetativo com uma alta produção de peritécios. Através de análises mitótica e meiótica, verificaram a presença de uma pequena duplicação na translocação VI-VIII, responsável pelo fenótipo alta produção de peritécios.

Ainda sobre a ação de mutagênicos em linhagens de A. nidulans, ROSATO (1973) estudou os efeitos da acriflavina e metano-sulfonato de etila sobre a instabilidade mitótica em várias linhagens. Verificou a ação da acriflavina na possível eliminação de material genético extra das linhagens deterioradas, com o intuito de obter variantes melhorados. No

entanto, a acriflavina não se mostrou eficiente na produção desses derivados. Em relação ao metano-sulfonato de etila, ele se mostrou eficiente na indução de instabilidade, apenas em linhagens duplicadas.

2.2. Genes supressores

O fenômeno da supressão gênica é amplamente conhecido e descrito nos mais diversos organismos vivos, apesar de ser mais frequentemente estudado em microrganismos. Revisões sobre o assunto podem ser encontradas em YANOFSKY & ST. LAWRENCE (1960); BRENNER & BECKWITH (1965); GORINI & BECKWITH (1966); SADGOPAL (1968); GORINI (1970) e MIRANDA FILHO (1972). Uma revisão bem recente sobre os supressores em geral foi apresentada por HARTMAN & ROTH (1973) onde os autores classificam a supressão em intragênica e intergênica. Na supressão intragênica, as mutações ocorrem através de mudanças na sequência dos pares de bases do DNA, podendo ser devido a uma adição ou deleção de um ou mais pares de bases, ou substituição das mesmas. Na supressão intergênica as mutações supressoras ocorrem fora do gene responsável pela mutação primária, afetando a estrutura de uma segunda unidade funcional do material genético.

Com relação a supressores de mutantes morfológicos, o assunto é relativamente pouco explorado, daí a dificuldade em se encontrar trabalhos diretamente relacionados com a presente pesquisa. Relacionado aos organismos superiores, pode-se citar o trabalho de JAIN (1966) que trabalhando com mutantes para pigmentação ("yellow virescent" e "light green") em cevada, verificou que a reversão dos mutantes para o tipo selvagem era devida a supressores localizados em um loco diferente da mutação original. Os mutantes apresentavam apenas 15% do conteúdo clorofílico no em relação ao tipo selvagem, enquanto que os indivíduos com reversão apresentavam 65%.

Em microrganismos, MORGAN (1961, 1966), estudando linhagens de Coprinus lagopus possuindo o gene pur que afeta a síntese de compostos aromáticos e lhe dá uma pigmentação púrpura, verificou a existência de instabilidade que era dada pela supressão do gene pur devido a mutações recessivas em outros genes.

AZEVEDO (1971) trabalhando com um variante deteriorado do fungo A. nidulans, observou o aparecimento de um setor melhorado de coloração verde. Através de análise genética mostrou ter havido uma translocação do grupo de ligação II para o V, originando então uma deleção no grupo de ligação II. Essa deleção foi a responsável pela supressão parcial do determinante de deterioração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Símbolos e fenótipos dos mutantes usados

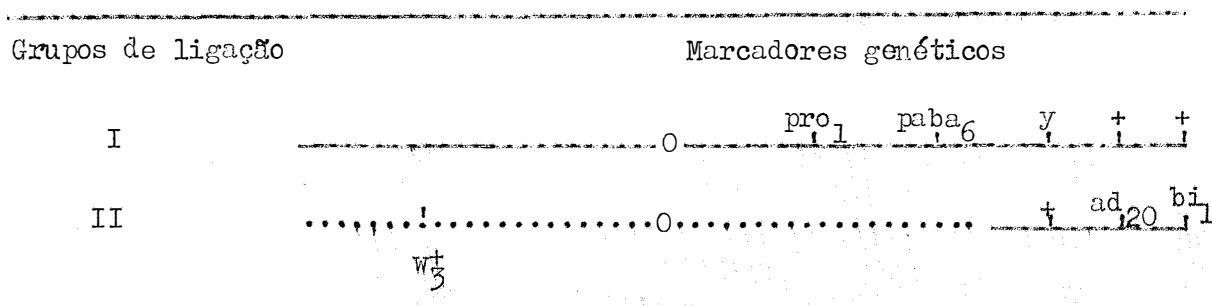
<u>Símbolos</u>	<u>Fenótipos</u>
<u>ad</u> ₂₀	requerimento para adenina
<u>bi</u> ₁	requerimento para biotina
<u>fac</u> ₃₀₃	incapaz de crescer em meio contendo acetato como única fonte de carbono
<u>gal</u> ₁	incapaz de crescer em meio contendo galactose como única fonte de carbono
<u>nic</u> ₈	requerimento para ácido nicotínico
<u>paba</u> ₆	requerimento para ácido p-aminobenzóico
<u>pro</u> ₁	requerimento para prolina
<u>pyro</u> ₄	requerimento para piridoxina
<u>ribo</u> ₂	requerimento para riboflavina
<u>s</u> ₃	requerimento para tiosulfato
<u>su</u> ₁ <u>ad</u> ₂₀	supressor do mutante <u>ad</u> ₂₀
<u>su</u> ₁ <u>v</u> ₃₇	supressor de <u>v</u> ₃₇
<u>su</u> ₂ <u>v</u> ₃₇	supressor de <u>v</u> ₃₇
<u>su</u> ₃ <u>v</u> ₃₇	supressor de <u>v</u> ₃₇
<u>su</u> ₁ <u>v</u> ₄₀	supressor de <u>v</u> ₄₀
<u>su</u> ₁ <u>v</u> ₄₁	supressor de <u>v</u> ₄₁

<u>Símbolos</u>	<u>Fenótipos</u>
$\underline{su}_2 \underline{v}_{41}$	supressor de \underline{v}_{41}
$\underline{su}_3 \underline{v}_{41}$	supressor de \underline{v}_{41}
$\underline{su}_1 \underline{v}_{43}$	supressor de \underline{v}_{43}
$\underline{v}_{35}, \underline{v}_{36}, \underline{v}_{37}, \underline{v}_{38}, \underline{v}_{39},$ $\underline{v}_{40}, \underline{v}_{41}, \underline{v}_{42}, \underline{v}_{43}, \underline{v}_{44}, \underline{v}_{45}$	determinantes de deterioração
$v_{35}, v_{36}, v_{37}, v_{38}, v_{39},$ $v_{40}, v_{41}, v_{42}, v_{43}, v_{44}, v_{45}$	variantes deteriorados
y	conídeos amarelos
y^+	conídeos verdes
w_3	conídeos brancos
w_3^+	conídeos coloridos

3.2. Linhagens utilizadas

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

Figura 1. Marcadores genéticos da linhagem A



Os centrômetros estão designados por O. Os fenótipos determinados pelos genes podem ser encontrados no item 3,1.

_____ grupo de ligação I

..... grupo de ligação II

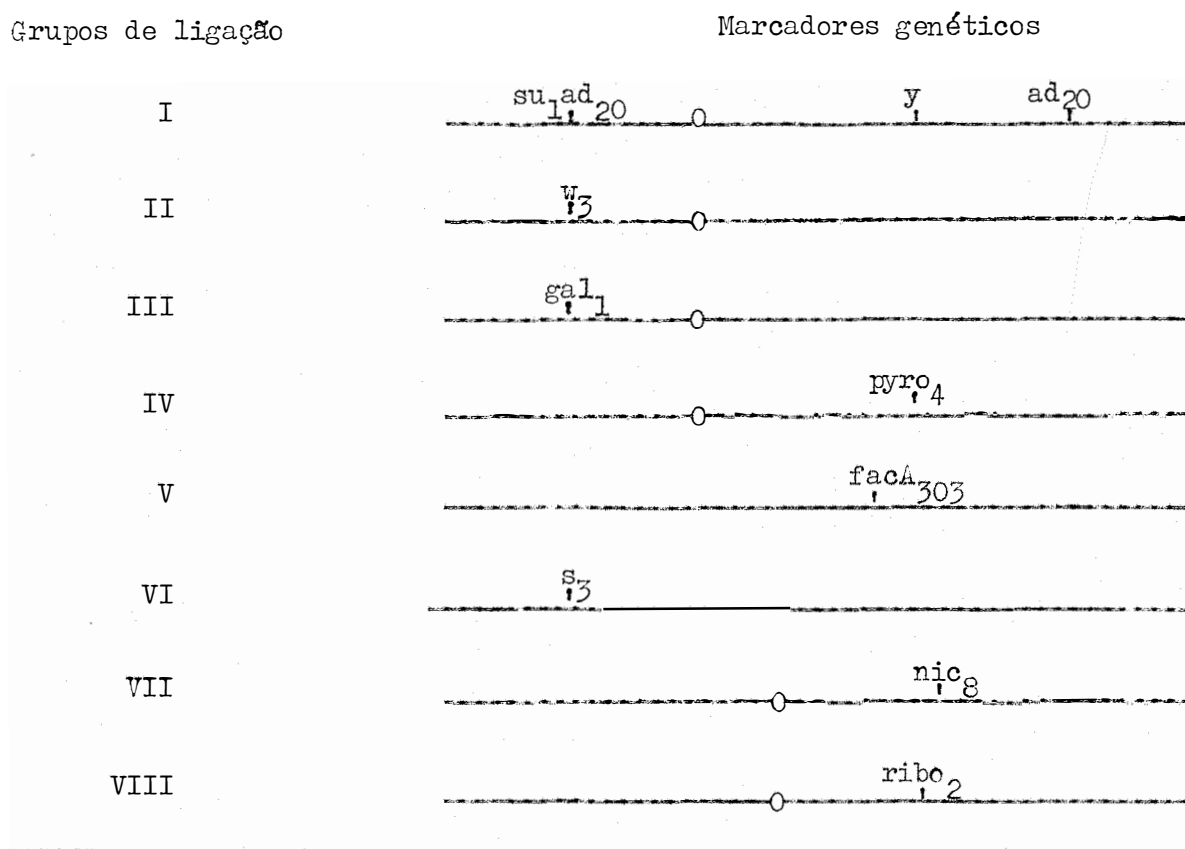
Obs.: as distâncias não estão em escala no mapa.

b. Linhagem pro₁, peba₆, y (não duplicada)

c. Linhagem MSE (Master Strain E de McCULLY & FORBES, 1965)

que apresenta marcadores genéticos em todos os grupos de ligação (Figura 2).

Figura 2. Marcadores genéticos da linhagem MSE



Os centrômeros estão designados por O. Os fenótipos dos marcadores genéticos podem ser encontrados no item 3.1.

Obs.; As distâncias não estão em escala no mapa.

d. Variantes deteriorados utilizados para os estudos de re

versão: V₃₇, V₄₀, V₄₁, V₄₃.

As três primeiras linhagens são originárias dos estoques da Universidade de Glasgow, Escócia e os variantes deteriorados que foram utilizados para o estudo de reversões, foram obtidos por nós a partir da linhagem A, no Setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em Piracicaba.

3.3. Meios de Cultura e Soluções Usadas

3.3.1. Meio Mínimo (PONTECORVO e col., 1953)

NaNO_3	6,0 gramas
KH_2PO_4	1,5 gramas
KCl	0,5 gramas
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 gramas
FeSO_4	traços
ZnSO_4	traços
Glicose	10,0 gramas
Ágar	15,0 gramas
Água destilada	1 litro

pH ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1N

3.3.2. Meio Completo (PONTECORVO e col., 1953)

Adiciona-se ao Meio Mínimo

Peptona	2,0 gramas
Caseína hidrolisada	1,5 gramas
Extrato de leveduras	0,5 gramas
Solução de vitaminas	1,0 mililitro
Ácido nucleico de leveduras	2,5 mililitros

pH ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1N

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

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

pH ajustado para 6,1 com NaOH 4% ou HCl 1N.

3.3.4. Meio Mínimo mais galactose

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

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

3.3.5. Solução de vitaminas

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

A solução é esterilizada em vapor fluente por 3 dias consecutivos e guardada em frasco escuro no refrigerador, sob clorofórmio.

3.3.6. Solução salina

Prepara-se uma solução de cloreto de sódio 0,89%, dissolvendo-se o sal em água destilada. Coloca-se 9,0 ml da solução em frascos e autoclava-se.

3.3.7. Solução de tween

Adiciona-se tween 80 à água destilada numa concentração de 0,1% (V/V). Coloca-se 2,5 ml da solução em tubos de ensaio, autoclava-se e conserva-se em refrigerador.

3.3.8. Meio mínimo líquido + 2% de meio completo

Adiciona-se ao meio mínimo comum 2% de meio completo, distribui-se em tubos com 2,5 ml e conserva-se em refrigerador.

3.3.9. Solução de p-fluorfenilalanina (pFA)

Prepara-se uma solução de p-fluorfenilalanina 1%, dissolvendo-se o mesmo em água destilada. Esteriliza-se a solução em banho-maria por 15 minutos e conserva-se em refrigerador a 4°C.

3.3.10. Suplementos adicionados ao meio mínimo

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

3.3.11. Placas de análise

Para a determinação dos requisitos nutricionais das colônias analisadas, utilizaram-se placas de Petri com meio completo, com meio mínimo, com meio mínimo mais todos os requerimentos envolvidos no cruzamento e com meio mínimo mais todos os requerimentos exceto o que está sob análise. Utilizaram-se ainda uma placa com meio galactose e outra com meio acetato mais todos os requerimentos.

3.4. Esterilização e temperatura usadas

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

3.5. Obtenção de setores deteriorados espontaneamente, a partir das linhagens A e pro₁, paba₆, X

Conídios de ambas as linhagens foram suspensos em solução de tween e efetuou-se a contagem dos mesmos através do uso de hemátimetro. Após diluições apropriadas em solução salina, os conídios foram semeados em placas contendo meio completo, as quais ficaram incubadas em estufa por 24 horas. Microcolônias monospóricas foram transferidas, uma a uma, para o centro de placas de Petri contendo meio completo, as quais permaneceram incubadas por 7 dias. Após esse período, os setores melhorados e deteriorados foram contados e foi medida a distância do centro da colônia ao ponto de origem de cada setor. Os setores deteriorados foram isolados em placas com meio completo e posteriormente estocados em tubos de ensaio em refrigerador.

3.6. Obtenção de colônias deterioradas após tratamento com luz ultra-violeta

Uma suspensão de aproximadamente $2,0 \times 10^7$ conídios, foi diluída de 1:10 em solução de salina, colocada em placa de Petri esterilizada e irradiada por 1, 2, 4 e 8 minutos com luz ultra-violeta (2.537 \AA). No tempo zero foi tirada uma alíquota de 1 ml da suspensão de conídios a ser irradiada e foram preparadas várias diluições consecutivas e semeadas com repetições em placas com meio completo. Após a irradiação de 1 minuto, repetiu-se o processo, o mesmo acontecendo após 2, 4 e 8 minutos. Decorridos 3 dias de incubação, foram contadas as colônias e foi estimada a porcentagem de sobrevivência relativa à suspensão não irradiada, bem como o número de colônias deterioradas. Microcolônias foram transferidas uma a uma para placas contendo meio completo e após 6-7 dias de incubação, foram contados o número de setores melhorados e deteriorados, bem como foi

medida a distância do centro da colônia ao ponto de origem dos setores.

3.7. Obtenção de setores deteriorados induzidos por DNA exógeno

Duas linhagens, uma duplicada (linhagem A) e outra sem duplicação (pro₁, paba₆, Y) foram usadas. A 1,5 ml da solução de DNA extraído da Escherichia coli (segundo o método descrito por MARMUR, 1961) de concentração 140 µg/ml, adicionou-se 0,5 ml de uma suspensão de conídios (1×10^7 conídios por ml). Incubou-se à temperatura ambiente por 8 horas, após o que semearam-se os conídios em meio completo em diluições apropriadas. As placas foram incubadas por 24 horas; após esse período de tempo, microcolônias foram transferidas uma a uma para placas contendo meio completo. Após 6-7 dias, foi contado o número de setores melhorados e deteriorados e medida a distância do centro da colônia ao ponto de emergência do setor.

Foi feito um controle que diferia do tratamento acima, pela substituição da solução de DNA por igual quantidade de solução salina-citrato diluída.

3.8. Obtenção de reversões

3.8.1. Reversão espontânea

Conídios de alguns variantes deteriorados foram suspensos em tween a uma concentração de aproximadamente 10^6 conídios por mililitro. Após diluições apropriadas em salina, os conídios foram semeados em placas contendo meio completo e efetuou-se a contagem do número de colônias por placa, bem como o número de colônias que sofreram reversão. Estas últimas distinguem-se pela coloração verde e aspecto semelhante ao da linhagem A. As reversões foram inoculadas em tubos contendo meio

completo inclinado e estocadas em refrigerador para a posterior análise.

3.8.2. Reversão induzida pela luz ultra-violeta

Suspensões de conídios das linhagens deterioradas foram tratadas com luz ultra-violeta por 2 minutos e semeadas em diluições apropriadas em placas contendo meio completo para a obtenção de colônias isoladas. Incubou-se por 3-4 dias. Em seguida, foi efetuada a contagem do número de colônias sobreviventes por placa, bem como o número de colônias que sofreram reversão. Estas últimas foram inoculadas em tubos contendo meio completo inclinado e estocadas em refrigerador.

3.9. Técnicas de Análise Genética

3.9.1. Obtenção de heterocários

Utilizou-se o mesmo método descrito por PONTECORVO e col. (1953). Conídios de ambas linhagens, MSE e deteriorada, que requerem diferentes fatores de crescimento, foram colocados em 2,5 ml de meio mínimo líquido suplementado com 2% de meio completo líquido, o que permitiu apenas pequena germinação dos conídios. Após 3-4 dias de incubação, formou-se uma película na superfície do meio, a qual transferida para placa contendo meio mínimo, originou setores heterocarióticos que continham núcleos geneticamente diferentes na mesma hifa, o que permitiu o crescimento.

Para a análise das reversões, obteve-se o heterocário como mencionado, a partir do cruzamento da linhagem MSE e a colônia em estudo, que sofreu a reversão.

3.9.2. Análise mitótica

Esta análise foi realizada através do ciclo parassexual, segundo o método descrito por ROOPER (1952). Após ter-se obtido o heterocáριο este foi transferido para meio mínimo onde houve formação de setores heterocarióticos. A maioria dos conídios formados são haplóides e não conseguem se desenvolver em meio mínimo. Entretanto, há formação de conídios diplóides heterozigotos em porcentagem muito baixa, devido à fusão rara de núcleos haplóides, que são capazes de crescer em meio mínimo. Semeando uma suspensão de cerca de 10^7 conídios por ml, em meio mínimo, obtiveram-se colônias diplóides heterozigotas.

Os diplóides assim obtidos foram induzidos à haploidização pelo método da p-fluorfenilalanina (pFA) que tem a propriedade de inibir o crescimento de setores diplóides, mas permite o crescimento de setores haplóides que surgem como segregantes. Segundo KÄFER (1961), a haploidização ocorre espontaneamente através da aneuploidia com perda sucessiva de cromossomos. A técnica consiste em adicionar ao meio completo quantidades variáveis da solução de pFA, dependendo do cruzamento envolvido. No presente trabalho, adicionou-se a 200 ml de meio de cultura, 1,5 ml da solução a 1% de pFA, o que corresponde aproximadamente a 0,15 ml da solução por placa com 20 ml de meio de cultura.

Os conídios diplóides foram inoculados em 4 pontos das placas e após 8-9 dias de incubação, surgiram setores haplóides brancos, amarelos, verdes e deteriorados. Estes foram purificados em meio completo e a seguir inoculados um a um em 26 pontos fixos numa placa de meio completo. Esta placa serviu como placa mestra que foi replicada através de um replicador de níquel-cromo para as placas de análise.

A seguir, efetuaram-se as leituras, após 24, 48 e 72 horas de incubação.

3.9.3. Análise meiótica

Esta análise baseia-se no ciclo sexual do fungo, através da análise de ascósporos produzidos em peritécios, segundo o método descrito por PONTECORVO e col. (1953). A análise exige a ocorrência de peritécios híbridos contendo ascósporos segregantes, resultantes da meiose de zigotos formados pela cariogamia de núcleos geneticamente diferentes.

Para se obter os peritécios, incubou-se a placa de meio mínimo contendo pedaços do heterocário, vedada com fita celulósica, por 9-10 dias em estufa. Após esse período, os maiores peritécios foram isolados e rolados em meio mínimo sólido, para retirar os conídios ocasionalmente aderentes, bem como, as células de Hülle. A seguir, os peritécios foram transferidos com um estilete de metal para tubos de ensaio contendo 2,5 ml da solução de tween, onde foram esmagados contra as paredes dos mesmos. Com as mesmas pipetas utilizadas para o esmagamento dos peritécios, as paredes dos tubos foram lavadas, suspendendo os ascósporos na solução. Semeou-se 0,1 ml de cada suspensão de ascósporos em placas contendo meio completo e conservaram-se as suspensões restantes em refrigerador, a 4°C. Incubaram-se as placas em estufa por 2-3 dias e verificou-se se os peritécios eram híbridos. Os não híbridos foram descartados.

Um dos peritécios híbridos foi escolhido e os ascósporos foram semeados em 4-5 placas contendo meio completo. Após 3 a 4 dias, contaram-se as colônias normais (brancas, amarelas e verdes) e deterioradas.

Uma placa mestra foi preparada com colônias brancas, outra com amarelas e verdes e duas com deterioradas. Após 3 dias de incubação, as placas mestras foram replicadas para as placas de análise.

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

creceram.

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

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

onde

C = valor de ligação

R = número de colônias recombinantes

T = número total de colônias analisadas

O desvio padrão foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

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

onde

p = frequência de recombinantes

N = número total de ascósporos

3.9.4. Análise genética das reversões

Para verificar a natureza da reversão, se devido a supressores ou verdadeira, as colônias com reversão foram cruzadas com a linhagem MSE e peritécios foram obtidos, pelo método descrito no item 3.9.3.

No caso de uma reversão devido a supressor, este foi localizado no grupo de ligação através da análise mitótica, descrita no item 3.9.2. A distância entre o supressor e uma determinada marca genética foi feita através da análise meiótica.

3.9.5. Testes de alelismo

No caso dos supressores de diferentes deteriorados estarem localizados no mesmo grupo de ligação, testes de alelismo foram realizados. Para tal, cruzamentos específicos foram feitos entre as duas colônias que possuem os diferentes determinantes de deterioração, os genes supressores em estudo, bem como, diferentes requerimentos nutricionais.

Através da análise dos ascósporos resultantes do ciclo sexual, verificou-se se os supressores envolvidos no cruzamento foram ou não alelos.

4. RESULTADOS

Para maior facilidade de apresentação, os resultados se acham sub-divididos nos seguintes tópicos, obedecendo-se a ordem de obtenção dos dados.

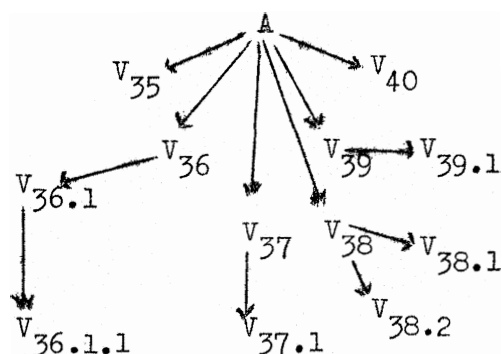
4.1. Obtenção espontânea de setores deteriorados e melhorados e análise do seu número e emergência

O Quadro 1 apresenta o número de setores obtidos espontaneamente a partir de 56 colônias da linhagem duplicada A. Enquanto 106 setores melhorados e deteriorados foram produzidos em colônias dessa linhagem, o controle (linhagem pro₁, paba₆, v não duplicada) não produziu setores de espécie alguma em 80 colônias observadas. Os 6 setores deteriorados foram numerados de V₃₅ a V₄₀ obedecendo-se a nomenclatura adotada por AZEVEDO (1971) e ROSATO (1973). O Gráfico 1 mostra o pedigree destes setores obtidos espontaneamente e seus derivativos, bem como apresenta a descrição sumária das principais características dos setores obtidos. A Figura 3 mostra um dos deteriorados obtidos.

Quadro 1. Número de setores obtidos espontaneamente

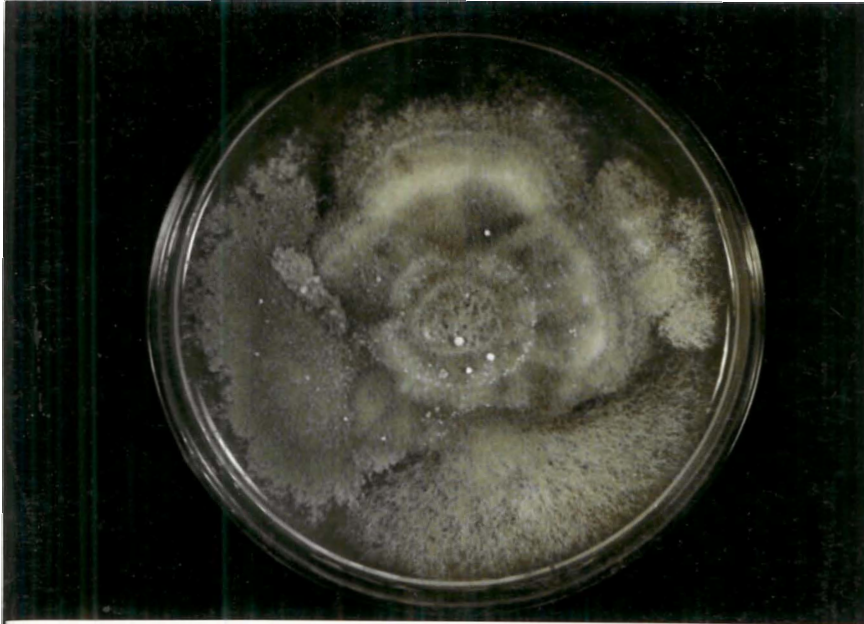
Linhagens	Colônias analisadas	Setores obtidos				
		amar.	verd.	deter.	total	média/col
A	56	96	4	6	106	1,9
<u>pro</u> ₁ , <u>paba</u> ₆ , <u>y</u>	80	0	0	0	0	0,0

Gráfico 1. Pedigree dos setores deteriorados isolados espontaneamente



- V₃₅ - micélio marron claro e conidiação escassa
- V₃₆ - micélio marron claro e conidiação escassa
- V_{36.1} - micélio amarelo claro e conidiação bem escassa
- V_{36.1.1} - micélio amarelo claro e conidiação bem escassa
- V₃₇ - micélio marron e conidiação média
- V_{37.1} - micélio marron claro e conidiação média
- V₃₈ - micélio marron escuro e conidiação média
- V_{38.1} - micélio marron claro e conidiação escassa
- V_{38.2} - micélio marron claro e conidiação escassa
- V₃₉ - micélio marron claro e conidiação média
- V_{39.1} - micélio marron claro e conidiação média
- V₄₀ - micélio marron bem claro e conidiação bem escassa

Figura 3. Variante deteriorado $V_{36.1}$ e seu derivativo $V_{36.1.1}$



O Quadro 2 indica a distância do centro da colônia ao ponto de emergência dos setores obtidos espontaneamente, pela linhagem A.

Quadro 2. Distância do centro da colônia ao ponto de emergência de setores deteriorados e melhorados obtidos espontaneamente

Distâncias (cm)	Nº de setores		
	deteriorados	amarelos	verdes
0,00 - 0,50	0	5	0
0,51 - 1,00	0	11	1
1,01 - 1,50	1	10	0
1,51 - 2,00	1	11	1
2,01 - 2,50	1	26	1
2,51 - 3,00	2	21	1
3,01 - 3,50	0	10	0
3,51 - 4,00	1	2	0
Total	6	96	4

A análise do ponto de origem dos setores (Quadro 2) dá uma idéia do tempo em que a instabilidade se manifesta. Esses dados são importantes na comparação com os tratamentos com luz ultra-violeta (Quadro 4) e DNA exógeno (Quadro 6), o que permite verificar a ação desses agentes não só quanto ao número de setores produzidos, como também, em relação ao tempo de produção dessa instabilidade.

4.2. Obtenção de setores deteriorados e melhorados induzidos por luz ultra-violeta e análise do seu número e emergência.

O Quadro 3 mostra o número de setores obtidos após tratamento das linhagens A e pro₁, paba₆, y com luz ultra-violeta. A partir de 64 colônias da linhagem A foram obtidos 101 setores, sendo 93 deles melhorados e 8 deteriorados, enquanto que, nenhum setor foi produzido por 30 colônias da linhagem pro₁, paba₆, y. O Quadro 4, indica a distância do centro da colônia ao ponto de origem dos setores produzidos pela linhagem A.

Quadro 3. Número de setores obtidos após tratamento com luz ultra-violeta

Linhagens	Colônias analisadas	Setores obtidos				
		amar.	verd.	deter.	total	média/col.
A	64	49	44	8	101	1,6
<u>pro₁, paba₆, y</u>	30	0	0	0	0	0,0

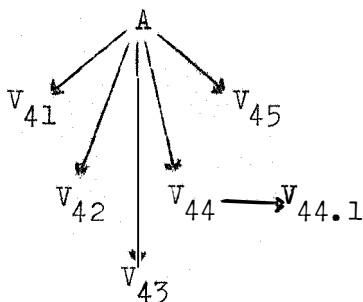
Quadro 4. Distância do centro da colônia ao ponto de emergência de setores deteriorados e melhorados após tratamento com luz ultra-violeta

Distâncias (cm)	Nº de setores		
	deteriorados	amarelos	verdes
0,00 - 0,50	1	1	1
0,51 - 1,00	0	0	3
1,01 - 1,50	0	2	2
1,51 - 2,00	1	3	3
2,01 - 2,50	3	11	9
2,51 - 3,00	2	6	16
3,01 - 3,50	1	15	7
3,51 - 4,00	0	11	3
Total	8	49	44

4.3. Obtenção de colônias deterioradas após tratamento da linhagem A, com luz ultra-violeta

Em todos os tratamentos foram obtidos deteriorados, sendo eles mais frequentes quando os conídios foram irradiados com 4 e 8 minutos. Para a análise genética foram selecionadas as colônias resultantes do tratamento com 4 minutos de irradiação (5% de sobrevivência), numerados de V_{41} a V_{45} . O Gráfico 2, mostra o pedigree das colônias deterioradas obtidas após tratamento com luz ultra-violeta, bem como descreve a morfologia dessas colônias.

Gráfico 2. Pedigree das colônias deterioradas obtidas após tratamento com luz ultra-violeta



- V₄₁ - micélio marron claro e conidiação média
 V₄₂ - micélio marron escuro e conidiação média
 V₄₃ - micélio marron claro e conidiação média
 V₄₄ - micélio marron escuro e conidiação média
 V_{44.1} - micélio marron claro e conidiação escassa
 V₄₅ - micélio marron claro e conidiação média

4.4. Obtenção de setores deteriorados e melhorados induzidos por DNA exógeno e análise do seu número e emergência

O Quadro 5 apresenta o número de setores produzidos pela linhagem A duplicada e pro₁, paba₆, y não duplicada, após o tratamento com DNA exógeno. Em 97 colônias da linhagem A tratada, foram produzidos 150 setores melhorados e 20 deteriorados, enquanto que a partir de 90 colônias tratadas da linhagem pro₁, paba₆, y, nenhum setor foi obtido. A linhagem A controle, produziu 111 setores melhorados e 6 setores deteriorados, a partir de 90 colônias. Ainda, a média de setores melhorados por colônia na linhagem A tratada foi de 1,54, enquanto que no controle foi de 1,23. A média de setores deteriorados por colônia no material tratado foi de 0,206 e no controle de 0,066. O Quadro 6 mostra o tempo de emergência dos setores produzidos pela linhagem A tratada e controle, a partir do ponto de

emergência dos mesmos em relação ao centro da colônia.

Quadro 5. Número de setores induzidos pelo DNA exógeno

Linhagens	Colônias analisadas	Setores obtidos				
		amar.	verd.	det.	total	média/col.
A tratada	97	120	30	20	170	1,7
A controle	90	92	19	6	117	1,3
<u>pro₁, paba₆, y</u>	90	0	0	0	0	0,0

Quadro 6. Distância do centro da colônia ao ponto de emergência de setores deteriorados e melhorados, obtidos após tratamento com o DNA exógeno

Distâncias (cm)	Nº de Setores					
	deteriorados		amarelos		verdes	
	tratamento	controle	trat.	contr.	trat.	contr.
0,00 - 0,50	0	0	0	0	0	0
0,51 - 1,00	0	0	0	0	2	0
1,01 - 1,50	1	1	3	2	5	2
1,51 - 2,00	3	0	13	8	3	2
2,01 - 2,50	4	1	24	16	6	8
2,51 - 3,00	8	4	32	27	5	5
3,01 - 3,50	4	0	33	22	6	2
3,51 - 4,00	0	0	14	16	3	0
4,01 - 4,50	0	0	1	1	0	0
Total	20	6	120	92	30	19

Os setores deteriorados obtidos após tratamento com o DNA exógeno não foram submetidos a uma análise genética.

4.5. Comparação entre a instabilidade espontânea e induzida por luz ultra-violeta e DNA exógeno

Os Gráficos 3, 4, 5 e 6 apresentam respectivamente, as porcentagens de setores amarelos, verdes, deteriorados e totais de setores obtidos espontaneamente e induzidos por luz ultra-violeta e DNA exógeno, em relação ao seu tempo de emergência. As porcentagens de setores espontâneos apresentadas nos gráficos a seguir, correspondem à soma dos setores espontâneos com os obtidos da linhagem A usada como controle do tratamento com DNA exógeno.

Gráfico 3. Porcentagem de setores amarelos obtidos espontaneamente e induzidos por luz ultra-violeta e DNA exógeno em relação às distâncias do ponto de emergência dos setores ao centro das colônias.

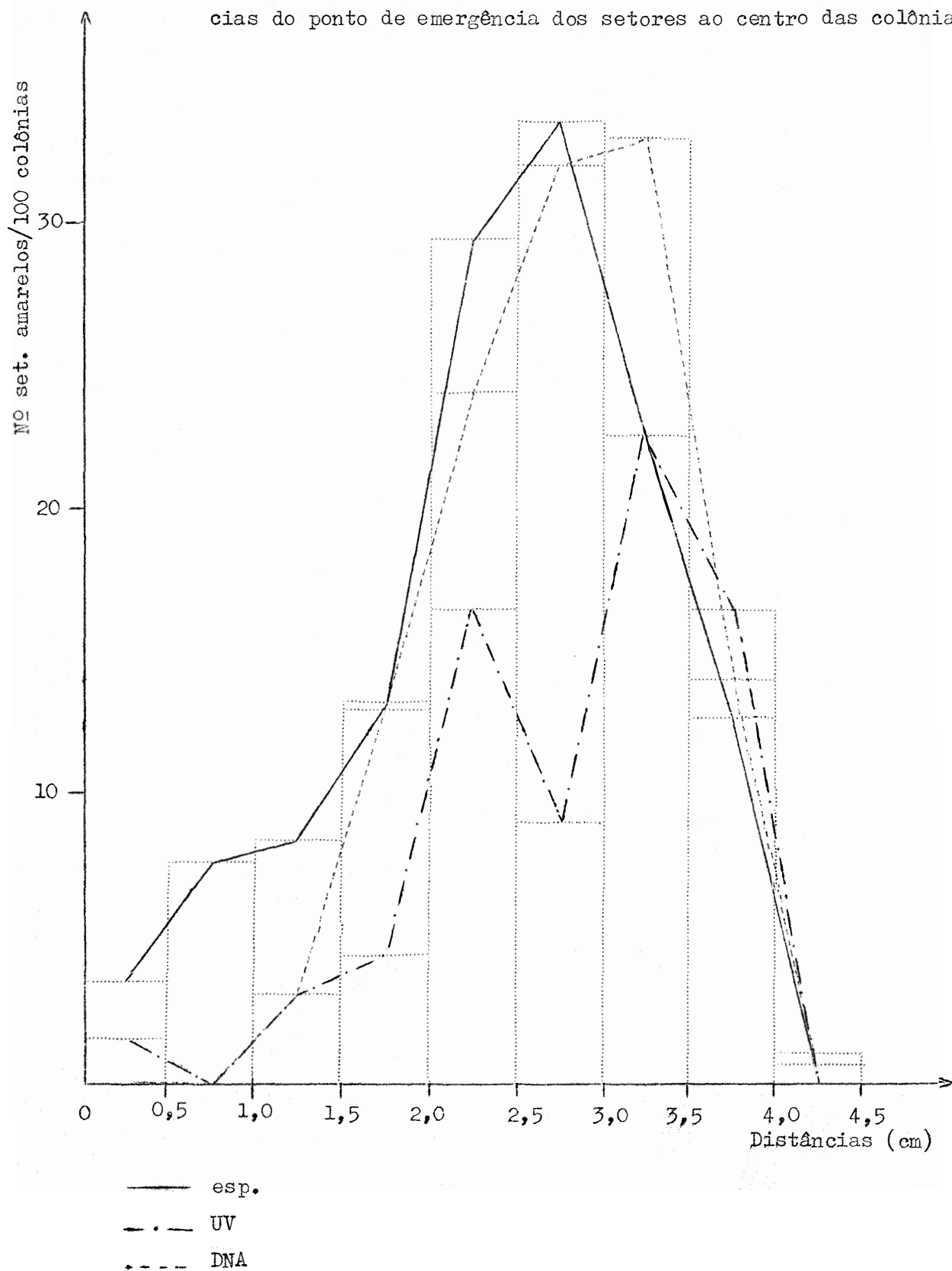


Gráfico 4. Porcentagem de setores verdes obtidos espontaneamente e induzidos por luz ultra-violeta e DNA exógeno em relação às distâncias do ponto de emergência dos setores ao centro das colônias.

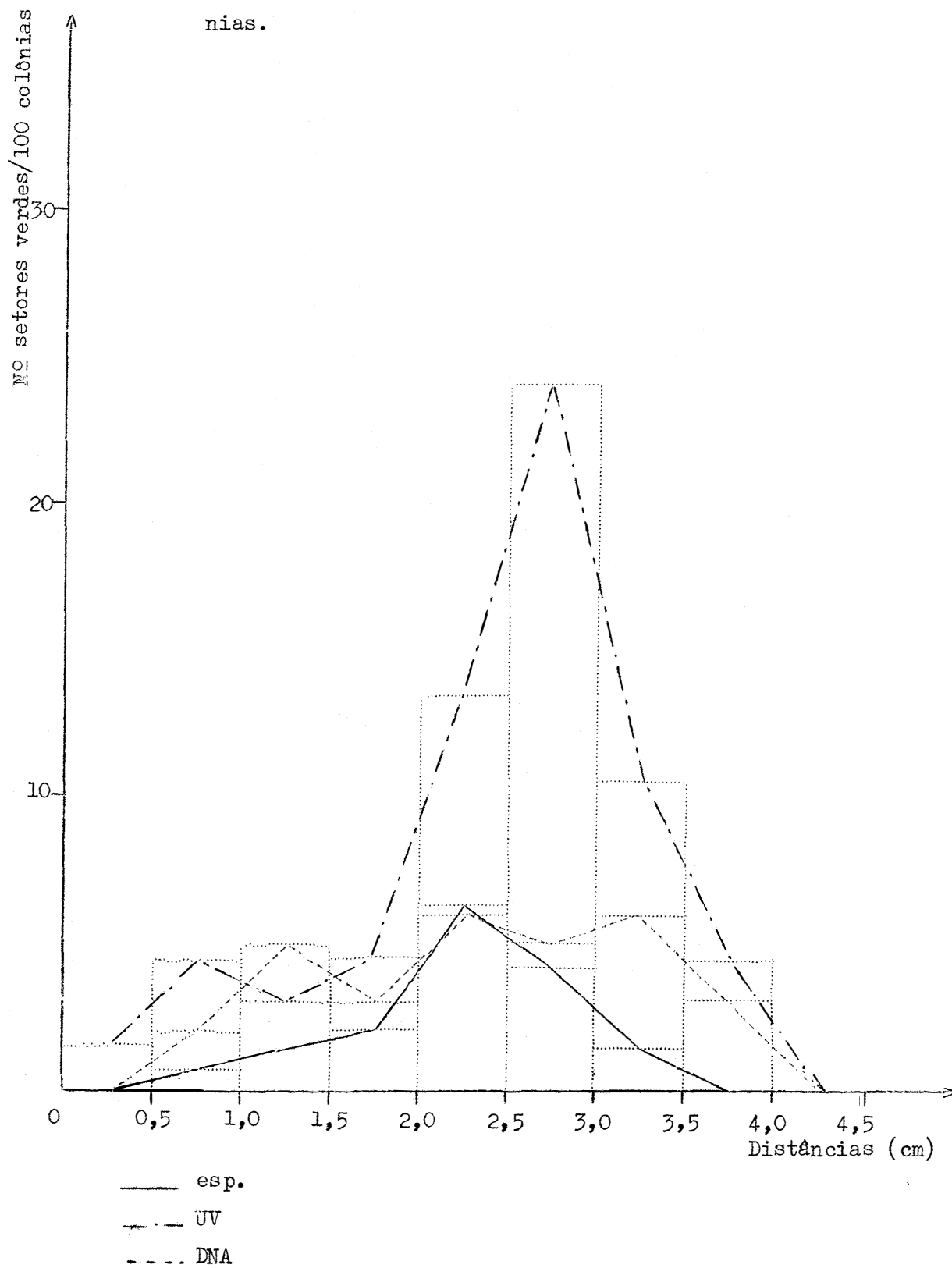


Gráfico 5. Porcentagem de setores deteriorados obtidos espontaneamente e induzidos por luz ultra-violeta e DNA exógeno em relação às distâncias do ponto de emergência dos setores ao centro das colônias

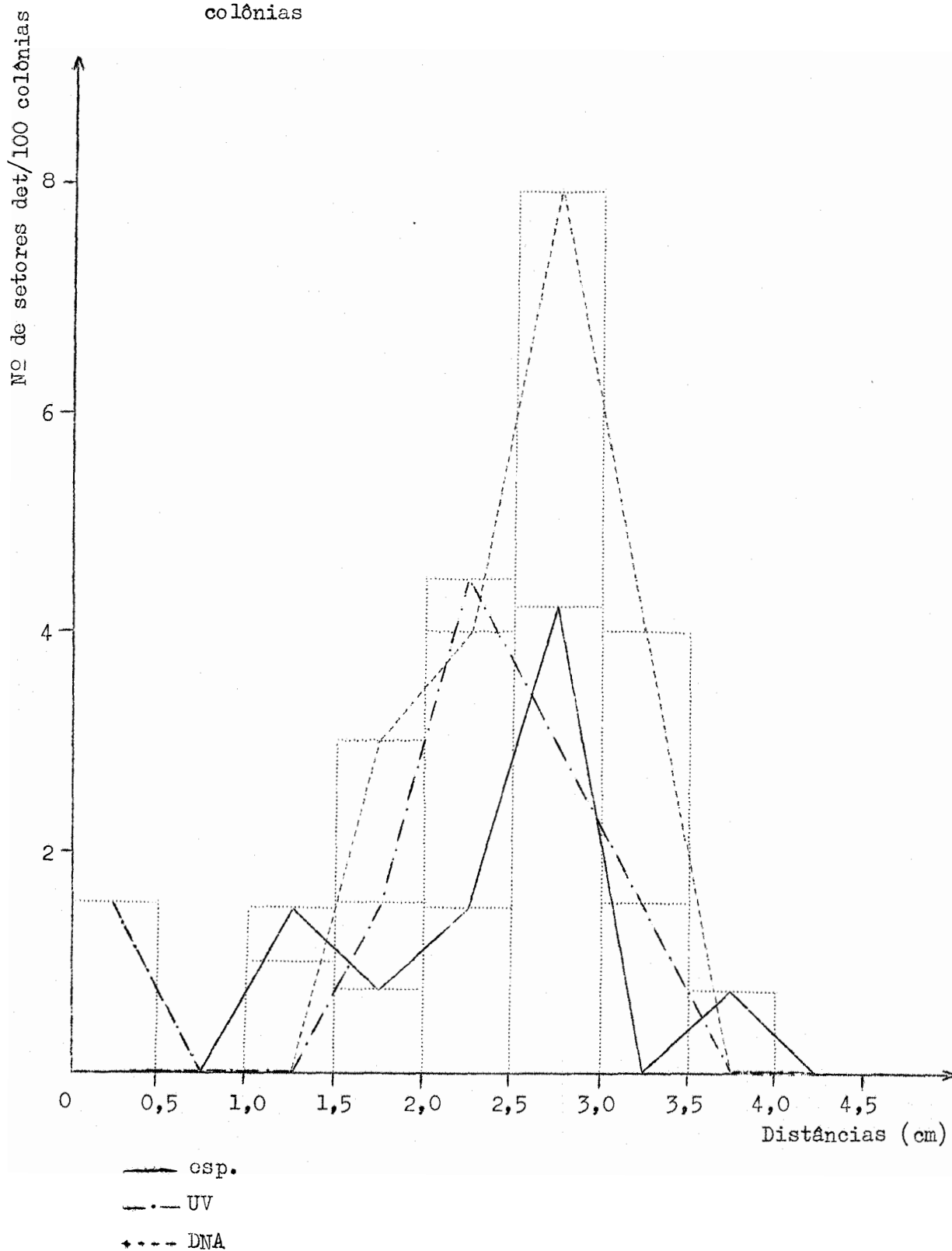
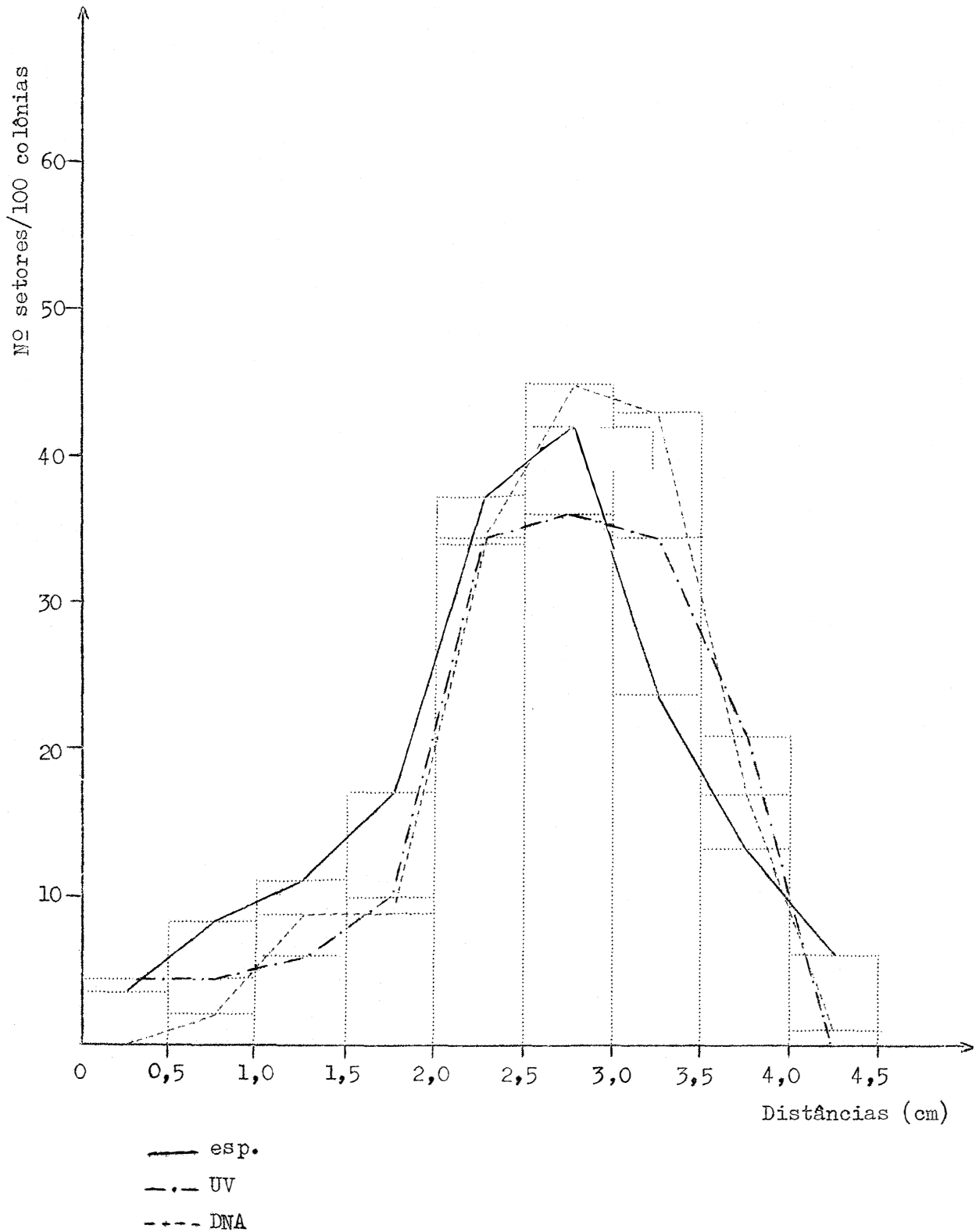


Gráfico 6. Porcentagem de setores obtidos espontaneamente e induzidos por luz ultra-violeta e DNA exógeno em relação às distâncias do ponto de emergência dos setores ao centro das colônias.



4.6. Análise genética dos deteriorados obtidos espontaneamente

Para efeito de ilustração, será apresentada a análise genética mitótica e meiótica de um dos determinantes de deterioração analisados (V_{36}), bem como seus derivativos (Quadros 7 a 12). As análises genéticas dos outros determinantes de deterioração e de seus derivativos (V_{35} , V_{37} , V_{38} e V_{40}) estão apresentadas no apêndice (Quadros A-1 a A-16).

Quadro 7. Análise mitótica do V_{36}

Grupos de ligação	Marcadores	Haplóides V_{36} // MSE	
		Setores deteriorados	Setores não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	0	20
	pro paba	0	0
II	w ⁺	0	0
	w	0	20
III	gal ⁺	0	14
	gal	0	6
IV	pyro ⁺	0	10
	pyro	0	10
V	fac ⁺	0	11
	fac	0	9
VI	s ⁺	0	14
	s	0	6
VII	nic ⁺	0	11
	nic	0	9
VIII	ribo ⁺	0	9
	ribo	0	11

Observando-se o Quadro 7, pode-se concluir que o determinante de deterioração v_{36} localiza-se no grupo de ligação I, ou no grupo de ligação II, fato este melhor evidenciado pela análise meiótica (Quadro 8), cujos valores mostram a ligação do determinante genético com a marca pro_1 .

Quadro 8. Análise meiótica do V_{36}

V_{36} X MSE			
Grupo de ligação	Marcadores	Colônias	
		deterioradas	não deterioradas
I	pro^+	(25)	52
	pro	27	(0)
	$paba^+$	(31)	41
	paba	21	(11)

$$\text{Valor de } C_{\frac{pro_1-v_{36}}{1-36}} = \frac{25}{104} \times 100 = 24,04 \pm 4,24\%$$

$$C_{\frac{paba_6-v_{36}}{6-36}} = \frac{42}{104} \times 100 = 40,38 \pm 4,80\%$$

As análises mitóticas e meióticas dos derivativos de 1ª e 2ª ordem: $V_{36.1}$ e $V_{36.1.1}$ estão nos Quadros 9 a 12.

Quadro 9. Análise mitótica do V_{36.1}

Haplóides V _{36.1} // MSE				
Grupos de ligação	Marcadores	Setores		
		deteriorados	não deteriorados	
I	pro ⁺ paba ⁺	0	4	
	pro paba	1	7	
II	w ⁺	1	2	
	w	0	9	
III	gal ⁺	1	7	
	gal	0	4	
IV	pyro ⁺	1	0	
	pyro	0	11	
V	fac ⁺	1	4	
	fac	0	7	
VI	s ⁺	0	6	
	s	1	5	
VII	nic ⁺	1	9	
	nic	0	2	
VIII	ribo ⁺	1	5	
	ribo	0	6	

Analisando-se o Quadro 9, pode-se verificar que o determinante de deterioração localiza-se no grupo de ligação IV, pois todos os setores deteriorados foram pyro⁺ e os normais pyro.

Quadro 10. Análise meiótica do $v_{36.1}$

$v_{36.1} \times \text{MSE}$				
Grupo de ligação	Marcador	Colônias		
		deterioradas	não deterioradas	
IV	pyro ⁺	19	14	
	pyro	22	20	

$$C \text{ pyro}_4 - v_{36.1} = \frac{36}{75} \times 100 = 48,00 \pm 5,74\%$$

A análise meiótica acima apresentada, mostra não ligação genética do $v_{36.1}$ com a marca pyro_4 .

Quadro 11. Análise mitótica do $V_{36.1.1}$

Haplóides $V_{36.1.1}$ // MSE				
Grupos de ligação	Marcadores	Setores		
		deteriorados	não deteriorados	
I	pro ⁺ paba ⁺	0	17	
	pro paba	0	0	
II	w ⁺	0	0	
	w	0	17	
III	gal ⁺	0	3	
	gal	0	14	
IV	pyro ⁺	0	3	
	pyro	0	14	
V	fac ⁺	0	9	
	fac	0	8	
VI	s ⁺	0	3	
	s	0	14	
VII	nic ⁺	0	6	
	nic	0	11	
VIII	ribo ⁺	0	8	
	ribo	0	9	

Pode-se verificar pelo Quadro 11 que o determinante de deterioração pode estar localizado no grupo de ligação I ou no grupo de ligação II.

Quadro 12. Análise meiótica do $V_{36.1.1}$

Grupo de ligação	Marcadores	$V_{36.1.1}$ X MSE	
		Colônias deterioradas	Colônias não deterioradas
I	pro ⁺	33	38
	pro	2	10
	paba ⁺	34	44
	paba	1	4

$$C_{\text{pro}_1 - V_{36.1.1}} = \frac{43}{83} \times 100 = 51,81 \pm 5,48\%$$

$$C_{\text{paba}_6 - V_{36.1.1}} = \frac{38}{83} \times 100 = 45,78 \pm 5,48\%$$

O determinante genético $V_{36.1.1}$ não se acha ligado às marcas pro₁ e paba₆.

4.7. Análise genética dos deteriorados obtidos após tratamento com luz ultra-violeta

Como exemplo, será apresentado a análise genética mitótica e meiótica apenas do V_{41} (Quadros 13 e 14). As análises dos demais variantes obtidos com luz ultra-violeta, encontram-se no apêndice (Quadros A-17 a A-25).

Quadro 13. Análise mitótica do V_{41}

Haplóides V_{41} // MSE				
Grupos de ligação	Marcadores	Setores		
		deteriorados	não deteriorados	
I	pro ⁺ paba ⁺	0	12	
	pro paba	0	0	
II	w ⁺	0	4	
	w	0	8	
III	gal ⁺	0	11	
	gal	0	1	
IV	pyro ⁺	0	5	
	pyro	0	7	
V	fac ⁺	0	10	
	fac	0	2	
VI	s ⁺	0	4	
	s	0	8	
VII	nic ⁺	0	6	
	nic	0	6	
VIII	ribo ⁺	0	8	
	ribo	0	4	

Analisando-se o Quadro 13, conclui-se que o determinante de deterioração do variante estudado, localiza-se no grupo de ligação I.

Quadro 14. Análise meiótica do V_{41}

MSE X V_{41}			
Grupo de ligação	Marcadores	Colônias	
		deterioradas	não deterioradas
I	pro ⁺	24	30
	pro	21	21
	paba ⁺	24	32
	paba	21	19

$$C \frac{\text{pro}_1 - v_{41}}{96} = \frac{45}{96} \times 100 = 46,80 \pm 5,07\%$$

$$C \frac{\text{paba}_6 - v_{41}}{96} = \frac{43}{96} \times 100 = 44,70 \pm 5,05\%$$

$$\text{Distância entre } \frac{\text{pro}_1 - \text{paba}_6}{96} = \frac{10}{96} \times 100 = 10,40 \pm 3,06\%$$

O determinante de deterioração v_{41} não se acha geneticamente ligado às marcas pro_1 e paba_6 .

A seguir, será apresentado o Quadro 15 contendo o número de segregantes meióticos de todos os cruzamentos realizados envolvendo os variantes deteriorados. Uma análise estatística foi realizada para a verificação do nível de significância de cada resultado.

Quadro 15. Segregação meiótica obtida de cruzamentos envolvendo linhagens normais X linhagens com os determinantes de deterioração

Cruzamentos	Segregantes		Total	χ^2 ⁺
	normais	deteriorados		
V ₃₆ X MSE	71	45	116	5,82*
V ₃₅ X MSE	49	49	98	0,00 n.s.
V ₃₇ X MSE	102	95	197	0,24 n.s.
V ₃₈ X MSE	185	130	315	8,32**
V ₃₉ X MSE	41	37	78	0,20 n.s.
V ₄₀ X MSE	177	187	364	0,26 n.s.
V _{36.1} X MSE	57	77	134	2,98 n.s.
V _{36.1.1} X MSE	113	27	140	52,82**
V _{37.1} X MSE	53	47	100	0,18 n.s.
V _{38.2} X MSE	55	49	104	0,17 n.s.
V _{39.1} X MSE	60	52	112	0,28 n.s.
V ₄₁ X MSE	51	45	96	0,18 n.s.
V ₄₃ X MSE	105	157	262	10,32**
V _{44.1} X MSE	38	46	84	0,38 n.s.
V ₄₅ X MSE	55	49	104	0,17 n.s.

n.s. = não significativo

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

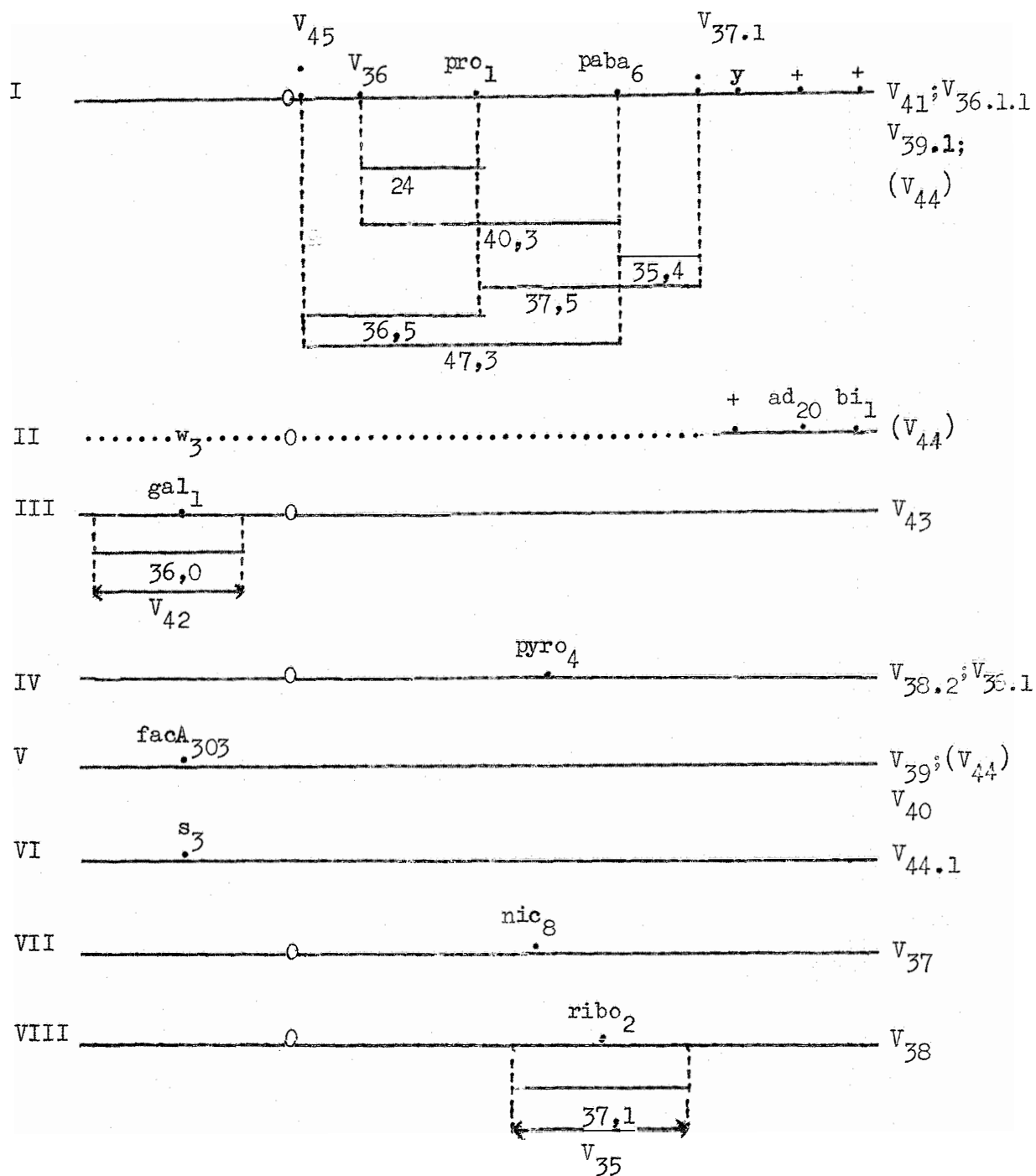
+ = valores de χ^2 , considerando a proporção de 1:1.

A origem de cada variante deteriorado analisado, bem como, a localização dos determinantes nos diferentes grupos de ligação, podem ser vistos no Quadro 16 e Gráfico 7.

Quadro 16. Localização dos determinantes de deterioração nos grupos de ligação do A. nidulans

Variante deteriorado	origem	grupos de ligação
V ₃₅	espontânea	VIII
V ₃₆	"	I
V _{36.1}	"	IV
V _{36.1.1}	"	I
V ₃₇	"	VII
V _{37.1}	"	I
V ₃₈	"	VIII
V _{38.2}	"	IV
V ₃₉	"	V
V _{39.1}	"	I
V ₄₀	"	V
V ₄₁	ultra-violeta	I
V ₄₂	"	III
V ₄₃	"	III
V ₄₄	"	I, II e V
V _{44.1}	"	VI
V ₄₅	"	I

Gráfico 7. Localização dos determinantes de deterioração



Observações; O = centrômero

Na extremidade dos cromossomos: deteriorados cujas distâncias não são conhecidas

↔ qualquer dos lados

(V₄₄) = o determinante de deterioração pode estar localizado em um dos três grupos de ligação.

As distâncias não estão em escala no mapa.

4.8. Obtenção das reversões

Dois variantes deteriorados obtidos espontaneamente (V_{37} e V_{40}) e dois por tratamento com luz ultra-violeta (V_{41} e V_{43}) foram utilizados para a verificação da frequência de reversão espontânea e induzida por luz ultra-violeta. Os Quadros 17 e 18 apresentam o número e frequência de reversões obtidas. Verifica-se que estas frequências são relativamente elevadas tanto para as reversões espontâneas como para as induzidas.

Quadro 17. Frequência de reversões espontâneas

Deteriorados	Nº colônias analisadas	Nº reversões obtidas	Frequência reversões
V_{37}	8.098	7	1:1.157
V_{40}	5.545	4	1:1.386
V_{41}	5.990	4	1:1.497
V_{43}	5.370	7	1: 767

Quadro 18. Frequência de reversões após tratamento com luz ultra-violeta

Deteriorados	Nº colônias analisadas	Nº reversões obtidas	Frequência reversões
V ₃₇	3.551	4	1: 887
V ₄₀	3.483	5	1: 696
V ₄₁	6.290	12	1: 524
V ₄₃	4.080	6	1: 680

4.9. Estudo das reversões

Foram escolhidas ao acaso algumas das reversões obtidas espontaneamente e induzidas por luz ultra-violeta, para o estudo da natureza genética do fenômeno envolvido, como apresentado nos tópicos seguintes.

4.9.1. Análise genética das reversões obtidas espontaneamente

Das reversões espontâneas obtidas, 5 foram analisadas geneticamente. Estas serão designadas: reversão 1 do V₃₇, reversão 2 do V₃₇, reversão 1 do V₄₀, reversão 1 do V₄₁ e reversão 1 do V₄₃. Os Quadros 19 e 20 apresentam os resultados obtidos através da análise genética de uma das reversões estudadas (reversão 1 do V₃₇). As análises das demais reversões encontram-se nos Quadros A-26 a A-33 do Apêndice.

Quadro 19. Análise mitótica da reversão 1 do V_{37}

Haplóides reversão 1 do V_{37} // MSE				
Grupos de ligação	Marcadores	Setores		
		deteriorados	não deteriorados	
I	pro ⁺ paba ⁺	9	10	
	pro paba	3	1	
II	w ⁺	3	6	
	w	9	5	
III	gal ⁺	4	4	
	gal	8	7	
IV	pyro ⁺	0	8	
	pyro	12	3	
V	fac ⁺	3	6	
	fac	9	5	
VI	s ⁺	9	6	
	s	3	5	
VII	nic ⁺	12	4	
	nic	0	7	
VIII	ribo ⁺	6	6	
	ribo	6	5	

Pelos resultados apresentados no Quadro 19, pode-se verificar que o supressor do determinante de deterioração v_{37} localiza-se no grupo de ligação IV, pois, todos os setores deteriorados foram pyro. Os deteriorados pyro⁺ possuíam também o gene supressor, apresentando-se portanto de fenótipo normal.

Quadro 20. Análise meiótica da reversão 1 do V₃₇

Reversão 1 do V ₃₇ X MSE		
Grupo de ligação	Marcador	Colônias deterioradas
IV	pyro ⁺	58
	pyro	37

$$C \frac{\text{pyro}_4}{\text{su}_{1-37}} = \frac{58}{95} \times 100 = 61,05 \pm 5,00\%$$

Assim sendo, o su₁₋₃₇ não se acha geneticamente ligado ao gene pyro₄.

4.9.2. Análise genética das reversões induzidas por luz ultra-violeta

Das reversões induzidas por luz ultra-violeta, 4 foram analisadas geneticamente. Estas serão designadas: reversão 3 do V₃₇, reversão 2 do V₄₀, reversão 2 do V₄₁ e reversão 3 do V₄₁. Os Quadros 21 e 22 mostram respectivamente, a análise mitótica da reversão 2 do V₄₁ e os segregantes meióticos do cruzamento envolvendo a reversão 2 do V₄₀, que se trata de uma reversão verdadeira. As análises das demais reversões encontram-se nos Quadros A-34 e A-35 do Apêndice.

Quadro 21. Análise mitótica da reversão 2 do V_{41}

Haplóides reversão 2 V_{41} // MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		deteriorados	não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	0	2
	pro paba	0	4
II	w ⁺	0	3
	w	0	3
III	gal ⁺	0	2
	gal	0	4
IV	pyro ⁺	0	1
	pyro	0	5
V	fac ⁺	0	3
	fac	0	3
VI	s ⁺	0	3
	s	0	3
VII	nic ⁺	0	5
	nic	0	1
VIII	ribo ⁺	0	3
	ribo	0	3

Pelos resultados apresentados no Quadro 21, pode-se concluir que existe um supressor do determinante de deterioração (\underline{su}_{2-41}^v) localizado no mesmo grupo de ligação que o determinante de deterioração \underline{v}_{41} , ou seja, no grupo de ligação I. A análise meiótica no presente caso não foi conduzida.

Quadro 22. Segregantes meióticos do cruzamento reversão 2 do V_{40} X MSE

Amarelos	Branco	Verdes	Deteriorados
53	47	75	0

O Quadro 22 apresenta a segregação meiótica ocorrida no cruzamento envolvendo a linhagem MSE e a reversão 2 do V_{40} . Pelos resultados apresentados neste Quadro, verifica-se que deve ter ocorrido uma reversão verdadeira, (Fig. 4) pois, houve ausência total de colônias deterioradas em 175 segregantes analisados. A Figura 5 mostra um caso de reversão devido a supressores.

Figura 4. Reversão verdadeira do variante deteriorado V_{40}

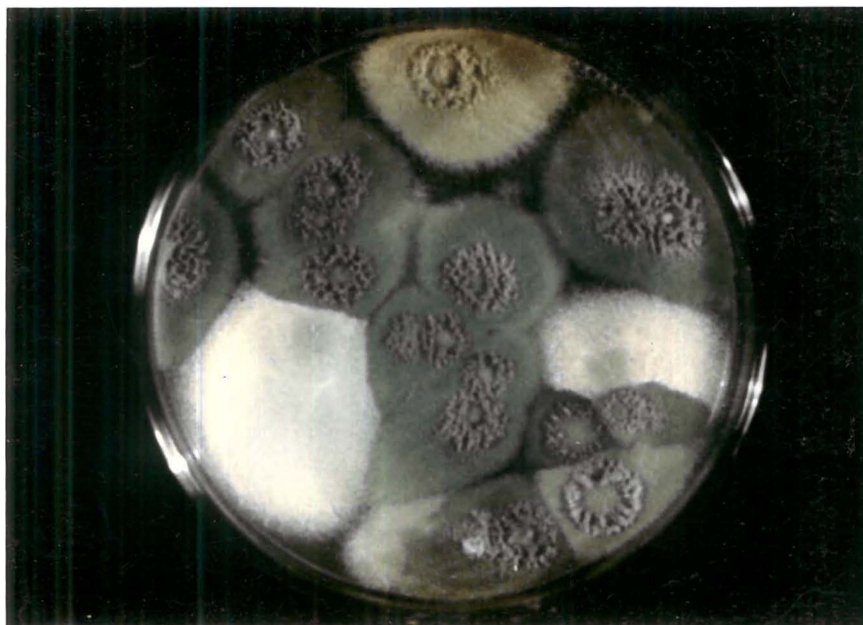


Figura 5. Reversão devido a supressores do variante deteriorado V_{37}

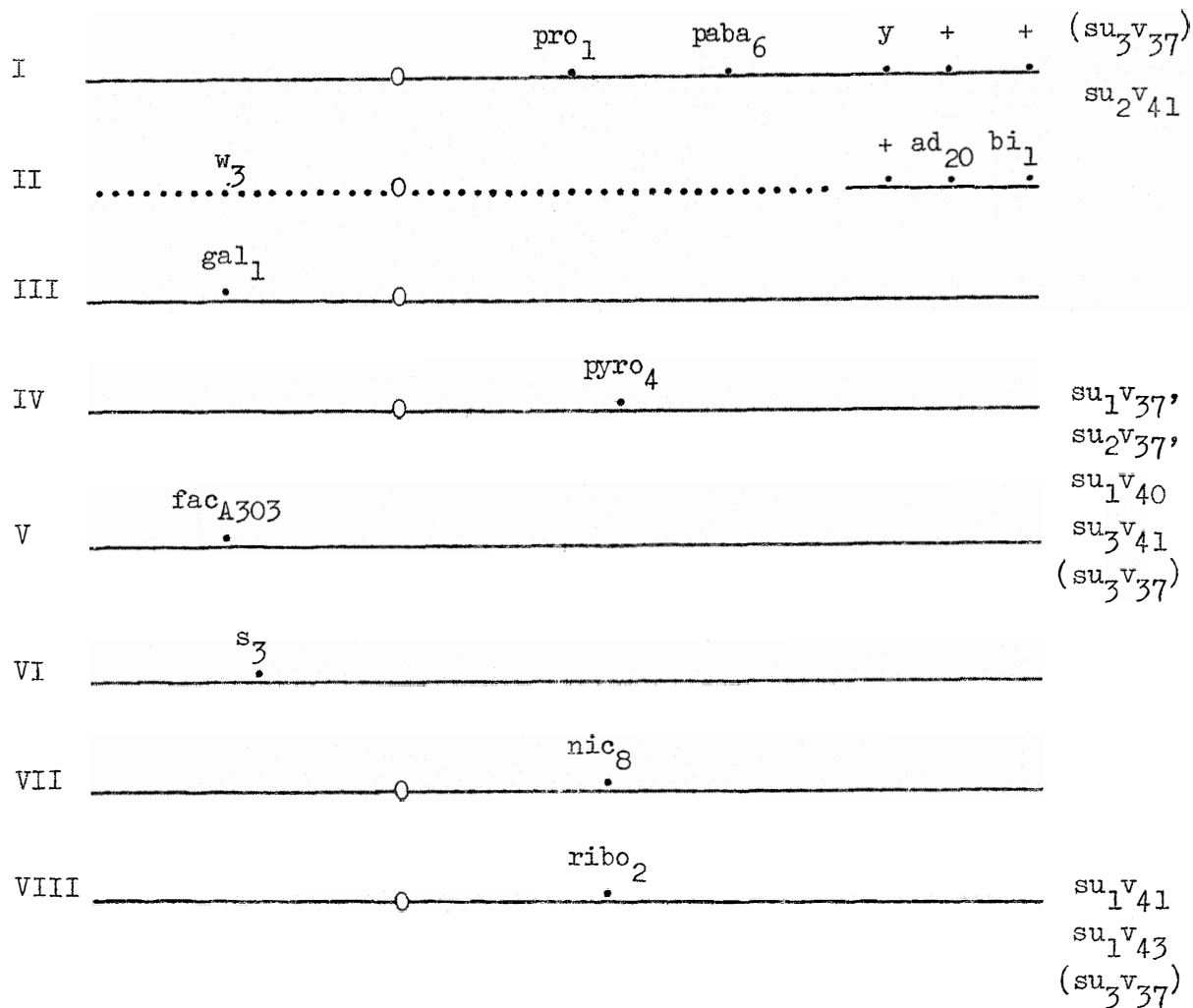


São apresentados no Quadro 23 e Gráfico 8, as origens e as localizações dos supressores responsáveis pelas reversões analisadas, bem como a origem da reversão verdadeira estudada.

Quadro 23. Localização dos supressores nos grupos de ligação do A. nidulans

Reversões	Origem	Grupo de ligação
$\frac{su_v}{1-37}$	espontânea	IV
$\frac{su_v}{2-37}$	espontânea	IV
$\frac{su_v}{3-37}$	ultra-violeta	I, V e VIII
$\frac{su_v}{1-40}$	espontânea	IV
reversão 2 do V_{40}	ultra-violeta	reversão verdadeira
$\frac{su_v}{1-41}$	espontânea	VIII
$\frac{su_v}{2-41}$	ultra-violeta	I
$\frac{su_v}{3-41}$	ultra-violeta	V
$\frac{su_v}{1-43}$	espontânea	VIII

Gráfico 8. Localização dos supressores nos grupos de ligação do *A. nidulans*



Observações: O = centrômero

Na extremidade dos cromossomos: supressores cujas distâncias não são conhecidas

(su₃^v₃₇) = o supressor pode estar localizado em um dos três grupos de ligação

As distâncias não estão em escala no mapa.

4.9.3. Testes de alelismo

Conforme indicado no Quadro 23, certos supressores localizaram-se nos mesmos grupos de ligação. Assim, \underline{su}_1v_{37} , \underline{su}_2v_{37} e \underline{su}_1v_{40} localizaram-se no grupo de ligação IV; os supressores \underline{su}_1v_{41} e \underline{su}_1v_{43} localizaram-se no grupo de ligação VIII. Com a finalidade de verificar se os supressores localizados no mesmo grupo de ligação eram alelos ou não, foi conduzido um teste de alelismo através dos seguintes cruzamentos:

- a) reversão 2 do V_{37} X segregante mitótico da reversão 1 do V_{37} de genótipo $\underline{gal}_1; \underline{pyro}_4; \underline{nic}_8; \underline{ribo}_2; \underline{su}_1v_{37}; v_{37}$.
- b) reversão 1 do V_{40} X segregante mitótico da reversão 1 do V_{37} de genótipo $\underline{gal}_1; \underline{pyro}_4; \underline{nic}_8; \underline{ribo}_2; \underline{su}_1v_{37}; v_{37}$.
- c) reversão 1 do V_{43} X segregante mitótico da reversão 1 do V_{41} de genótipo $\underline{pro}_1; \underline{paba}_6; \underline{gal}_1; \underline{ribo}_2; \underline{su}_1v_{41}; v_{41}$.

Como pode ser visto pelo Quadro 24, \underline{su}_1v_{37} e \underline{su}_2v_{37} são alelos, uma vez que só ocorreram segregantes não deteriorados (Figura 6). Por outro lado, \underline{su}_1v_{40} e \underline{su}_1v_{37} não são alelos, pois, segregantes normais e deteriorados ocorreram a partir desse cruzamento. Também pela mesma razão, \underline{su}_1v_{43} e \underline{su}_1v_{41} não são alelos (Figura 7).

Quadro 24. Segregantes meióticos resultantes de cruzamentos envolvendo su pressores localizados no mesmo grupo de ligação

Cruzamentos	Número de segregantes			
	amarelos	verdes	brancos	deteriorados
<u>su</u> ₂ <u>v</u> ₃₇ X <u>su</u> ₁ <u>v</u> ₃₇	51	70	0	0
<u>su</u> ₁ <u>v</u> ₄₀ X <u>su</u> ₁ <u>v</u> ₃₇	28	18	12	54
<u>su</u> ₁ <u>v</u> ₄₃ X <u>su</u> ₁ <u>v</u> ₄₁	39	6	55	85

Figura 6. Genes supressores alelos

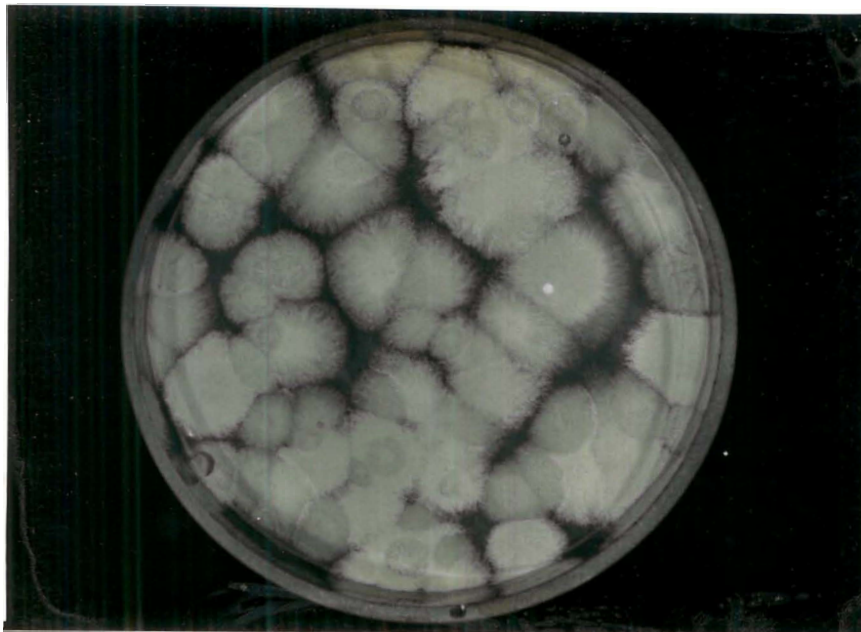
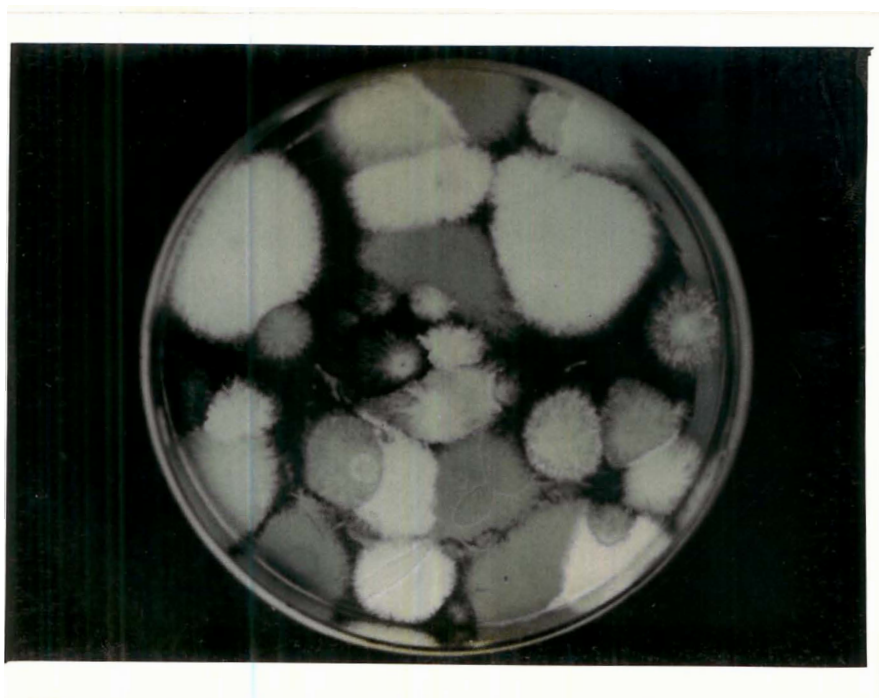


Figura 7. Genes supressores não alelos



5. DISCUSSÃO

Para maior facilidade de apresentação, a discussão será dividida em sub-ítem obedecendo a mesma ordem adotada no capítulo 4 (Resultados).

5.1. Observação da instabilidade mitótica espontânea e induzida

Segundo NGA & ROPER (1968), AZEVEDO & ROPER (1970) e AZEVEDO (1971), a duplicação cromossômica é a responsável pela instabilidade mitótica. Resultados concordantes foram obtidos no presente trabalho, como se pode observar pelos Quadros 1, 3 e 5, onde nenhum setor foi obtido a partir da linhagem haplóide usada como controle. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura tratam da instabilidade espontânea; no entanto algumas pesquisas foram realizadas utilizando-se mutagênicos. Assim, COOKE e col. (1970) realizaram estudos sobre a instabilidade induzida pelo azul de tripan, ROPER e col. (1972) com a cafeína e ROSATO (1973) com a acriflavina e o metano-sulfonato de etila. Outros agentes, contudo, devem ser pesquisados quanto à sua ação sobre a instabilidade. Com esse intuito, nesse trabalho foram utilizados a luz ultra-violeta e o DNA exógeno, cujos efeitos podem ser observados nos Quadros 2, 4 e 6 e no Gráfico 6. Como observado, esses mutagênicos não aumentam o número de setores em geral, embora se verifique que certos tipos de setores aparecem com maior frequência segundo o mutagênico utilizado. Assim, quanto à produção de setores

melhorados amarelos, visualiza-se no Gráfico 3 que ambos, luz ultra-violeta e DNA exógeno, não se mostraram eficientes com relação ao aumento de produção desses setores. O mesmo não ocorreu em relação à produção de setores verdes, pois, maior número deles foi obtido mediante a ação da luz ultra-violeta (Gráfico 4). Como mencionado na literatura, sabe-se que esses setores surgem devido a deleções em um dos segmentos em duplicata. Uma possível explicação para o aparecimento dessas deleções é aquela dada por ROPER e col. (1972), quando utilizou a cafeína como mutagênico. Assim, este fenômeno chamado de não-conformidade mitótica, pode ser explicado por erros nos sítios envolvidos na síntese de DNA que surgem devido à competição entre os segmentos homólogos. Um mutagênico qualquer, capaz de alterar a taxa de síntese de DNA ou sua iniciação, poderia afetar a frequência desses erros. Uma outra alternativa seria de que os mutagênicos poderiam reduzir a frequência dos reparos de lesões espontâneas do DNA, favorecendo o aparecimento das deleções.

Os resultados obtidos no presente trabalho com relação aos efeitos da luz ultra-violeta sobre a instabilidade revelaram, que ao contrário da cafeína, apenas um dos segmentos em duplicata foi preferencialmente alterado. Isso poderia indicar que a luz ultra-violeta deve agir de modo semelhante, porém inverso ao do azul de tripan (COOKE e col., 1970), isto é, induzindo deleções no grupo de ligação I ou seja, no segmento não translocado.

Quanto aos efeitos do DNA exógeno, vários trabalhos realizados em diferentes organismos dão indicações de que esse DNA pode atuar como um agente mutagênico. Assim em bactérias (TAYLOR, 1963; SHAPIRO, 1969; SHIMADA e col., 1973) e Drosophila (GERSHENSON, 1965), constataram esse efeito mutagênico do DNA. Resultados concordantes foram obtidos, neste trabalho, onde o DNA exógeno mostrou-se eficiente na produção de setores

deteriorados em linhagens duplicadas de A. nidulans, como se pode verificar no Quadro 6 e Gráfico 5. NGA & ROPER (1968) sugerem como responsáveis pelo aparecimento de setores deteriorados, as novas duplicações em tandem, sendo portanto, o fenômeno dependente da presença de material genético em excesso. Neste caso, pode-se pensar num mecanismo tal, em que o DNA exógeno penetraria nas regiões lesadas do DNA, passando a fazer parte dele e originando adições de material genético. Com relação a estes aspectos, futuros estudos poderão ser conduzidos, utilizando-se o DNA do próprio A. nidulans e DNA de outros organismos, incluindo-se DNA de fungos filamentosos, leveduras e inclusive de mamíferos. Também uma análise genética dos setores deteriorados induzidos por DNA, bem como, testes de alelismo entre eles e com outros deteriorados já analisados, poderão esclarecer melhor o fenômeno. Poderá ser verificada também, a ação do DNA no fenômeno da não-disjunção mitótica, já que no presente trabalho, alguns dissômicos foram obtidos através do uso desse mutagênico.

Em relação ao tempo de produção da instabilidade, todos os tratamentos comportaram-se de modo semelhante, não havendo portanto, alteração no período de emergência dos setores quando utilizaram-se os mutagênicos. Isso indica que tanto ultra-violeta como DNA não retardaram nem anteciparam o aparecimento desses setores.

5.2. Análise genética dos variantes deteriorados obtidos

AZEVEDO & ROPER (1970) e AZEVEDO (1971) verificaram que os determinantes de deterioração localizam-se em todos os grupos de ligação, sendo esses dados confirmados pelos resultados apresentados no Quadro 16 e Gráfico 7 deste trabalho. Os mesmos autores verificaram ainda que determinantes de deterioração podem sofrer transposições em A. nidulans. Aliás, dados sobre o fenômeno de transposição de material genético foram também

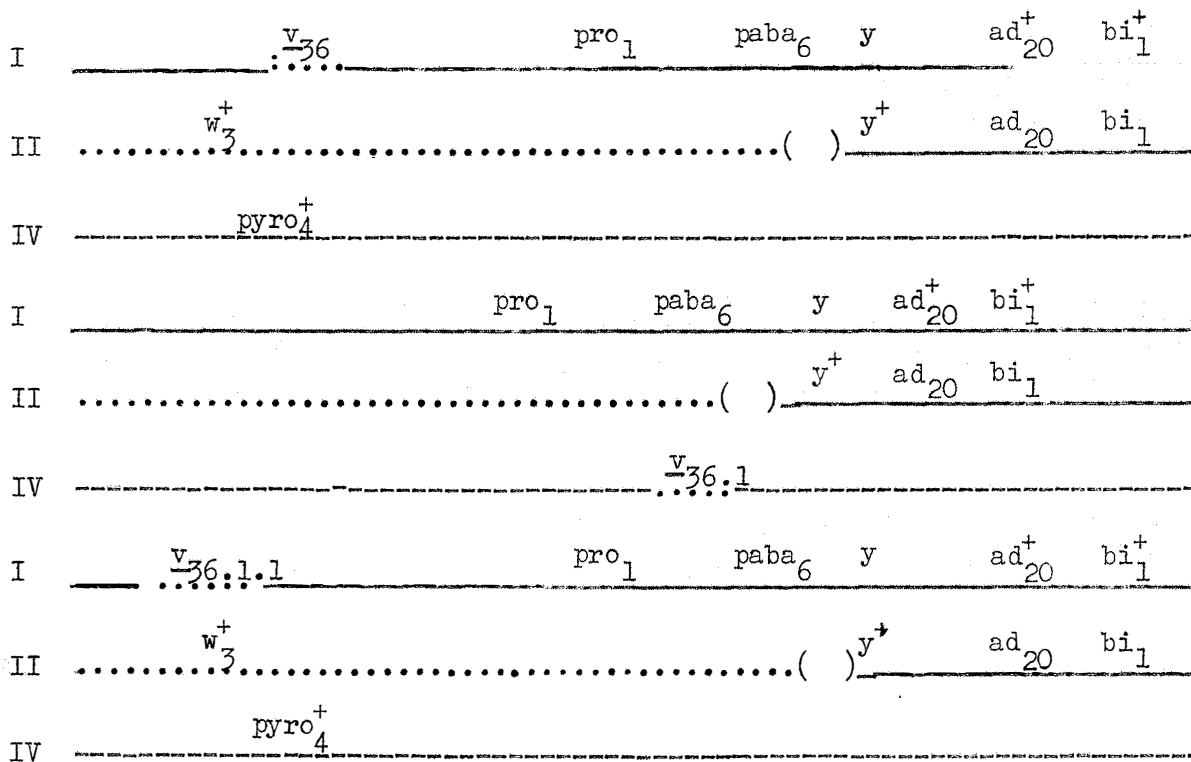
documentados em milho (McCLINTOCK, 1951; 1953; 1955; 1956), em bactéria (DAWSON & SMITH-KEARY, 1963) e em Drosophila (GREEN, 1969). Neste trabalho, um caso típico de transposição de material genético é o encontrado no V_{36} . Através da análise mitótica, o determinante de deterioração desse variante foi localizado no grupo de ligação I ou no grupo de ligação II, pois, todos os setores normais foram $\underline{pro}^+ \underline{paba}^+$ e nenhum setor normal \underline{w}^+ foi obtido. Através da análise meiótica, confirmou-se que o determinante de deterioração está localizado no grupo de ligação I, pois, se encontra ligado ao gene \underline{pro}_1 (Quadro 8). Neste caso, para se explicar o não aparecimento de setores deteriorados, bem como, o não aparecimento de setores normais $\underline{pro} \underline{paba}$ e \underline{w}^+ , pode-se pensar na possibilidade de ter ocorrido uma translocação de um segmento do grupo de ligação II para o grupo de ligação I, sendo esse fenômeno, o responsável pelo fenótipo deteriorado. Assim, o grupo de ligação I ficaria com um segmento cromossômico adicional sendo inibido pelo \underline{pFA} e o grupo de ligação II ficaria com uma deleção, causando assim, letalidade. Pode-se acrescentar também, que o determinante de deterioração pode envolver apenas um segmento do grupo de ligação II original ou além de um segmento do grupo de ligação II original, envolver também parte do segmento duplicado e translocado, produzindo um hipohaplóide como já descrito por ROPER & WGA (1969).

Alterações morfológicas associadas à translocação não recíproca já foram mencionadas por vários pesquisadores em A. nidulans. Assim, BALL (1967) descreveu reversão de linhagens \underline{meth}_1 para \underline{meth}_1^+ , sendo o ponto de quebra da translocação não recíproca responsável pelo fenótipo alterado. Também CLUTTERBUCK (1970) estudou uma linhagem com variegação modificada que apresentava um segmento do grupo de ligação VIII translocado para o grupo de ligação III. Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho, onde a transposição de material genético pôde ser evidenciada pela análise mitótica do derivativo $V_{36.1}$ (Quadro 9). Neste caso,

o determinante de deterioração localiza-se no grupo de ligação IV, sendo que no V_{36} sua localização é no grupo de ligação I. Possivelmente aquele segmento do grupo de ligação II translocado para o grupo de ligação I no V_{36} , foi transposto para o grupo de ligação IV, ocasionando o fenótipo alterado. Novamente, pode-se evidenciar a transposição desse determinante pela análise do derivativo de segunda ordem $V_{36.1.1}$. Sua análise mitótica mostrou estar o determinante de deterioração localizado no grupo de ligação I ou no grupo de ligação II (Quadro 11). Razões mencionadas a seguir, sugerem ainda a possibilidade de ter ocorrido uma transposição do determinante de deterioração do grupo de ligação IV ($V_{36.1}$) para o grupo de ligação I. A análise meiótica deste variante, mostrou não ligação do determinante às marcas pro₁ e paba₆, indicando que possivelmente, o local onde se ligou o determinante neste deteriorado não é o mesmo que aquele do V_{36} . O motivo do não aparecimento de setores deteriorados e de setores normais pro paba e w⁺, fica assim novamente explicado. Algum fenômeno semelhante deve estar envolvido nos variantes V_{36} e $V_{36.1.1}$, podendo-se verificar ser o número de segregantes meióticos deteriorados bem menor que o número de normais, em ambos os casos, indicando que uma das classes do deteriorado é inviável (Quadro 15).

Embora essa hipótese com relação a origem dos variantes V_{36} , $V_{36.1}$ e $V_{36.1.1}$ seja um tanto especulativa, outros tipos de testes genéticos incluindo testes de alelismo, poderão dar uma melhor idéia a respeito dos fenômenos envolvidos. A Figura 8 mostra as possíveis transposições que podem ter ocorrido.

Figura 8. Esquema representativo dos prováveis genótipos dos variantes de-
teriorados V_{36} , $V_{36.1}$ e $V_{36.1.1}$



Observ.; () significa deleção no grupo de ligação II. A po-
sição da deleção, bem como, dos determinantes de
deterioração, são hipotéticas. Os marcadores não
estão em escala.

	Grupo de ligação I
	" " " II
	" " " IV

Outros casos de transposição de material genético podem ser
apresentados. Assim, o determinante de deterioração do V_{37} localizou-se
no grupo de ligação VII, enquanto que no derivativo $V_{37.1}$ no grupo de li-
gação I. Caso semelhante pode ser citado, o V_{38} , cujo determinante locali-
zou-se no grupo de ligação VIII, enquanto que o seu derivativo $V_{38.2}$, lo-
calizou-se no grupo de ligação IV.

Segundo os pesquisadores AZEVEDO & ROPER (1970) e AZEVEDO (1971), os grupos de ligação I e II estão sempre envolvidos na deterioração. Dados concordantes foram obtidos, como pode ser observado no Quadro 16. Contudo, no caso do deteriorado V_{38} , o seu determinante de deterioração localizou-se no grupo de ligação VIII, enquanto que no derivativo $V_{38.2}$ no grupo de ligação IV, mostrando não estarem envolvidos os grupos de ligação I e II. Entretanto, foi obtido um outro derivativo $V_{38.1}$, cuja análise mitótica não foi possível, devido à não haploidização em pFA. Pode-se pensar na possibilidade do determinante deste derivativo estar localizado em um dos grupos de ligação I ou II.

Em quase todos os casos, a segregação meiótica foi de 1:1, comportando-se os determinantes de deterioração como genes simples (Quadro 15). Alguns deles segregaram na proporção de 2:1, mostrando a inviabilidade de uma classe de deteriorados. Desvios maiores na segregação, sugerem a presença de translocações.

Pesquisas futuras podem ser realizadas com os deteriorados localizados nos mesmos grupos de ligação, utilizando-se os testes de alelismo. Esses testes poderão ser realizados entre os variantes obtidos e analisados, bem como, com variantes anteriormente obtidos por outros pesquisadores (AZEVEDO, 1971 e ROSATO, 1973).

5.3. Frequência de reversões

A frequência de reversões mostrou-se relativamente alta (Quadros 18 e 19), indicando que possivelmente, vários supressores estão presentes no genoma para um mesmo morfológico. Isto pode ser verdadeiro, uma vez que supressores do mesmo determinante de deterioração foram localizados em diferentes grupos de ligação, como se observa pelo Quadro 23 deste trabalho. O porque da provável existência desses supressores, deve

ainda ser estudado. Contudo, algumas evidências quanto ao comportamento destes genes já foram apresentadas, como por AZEVEDO (1971), O autor verificou que os determinantes de deterioração localizam-se preferencialmente em regiões próximas aos centrômeros que são também as regiões onde ocorre maior frequência de permuta mitótica. Como é sabido, permuta mitótica em Drosophila ocorre em regiões heterocromáticas (STERN, 1936) donde pode-se inferir que isso também seja verdadeiro para o A. nidulans, ou seja, que as regiões próximas aos centrômeros sejam heterocromáticas. Poderia assim, ser suposta a possibilidade dos supressores exercerem algum papel sobre os genes localizados nessas regiões, suprimindo-as totalmente, inclusive o deteriorado aí encontrado.

Para explicar o fenômeno da supressão do morfológico, seria razoável imaginar um sistema regulatório em cascata, semelhante àquele apresentado por PONTECORVO (1963), MIRANDA FILHO (1972) e MIRANDA FILHO & AZEVEDO (1974) o qual envolve dois ou mais repressores produzidos por genes reguladores da ação gênica.

Nas linhagens selvagens, um dos repressores (repressor 2) tem a capacidade de interagir com o gene estrutural, impedindo-o de produzir o mRNA que conduz à síntese de proteínas. O outro repressor (repressor 1) interfere com a ação do repressor 2, impedindo-o de agir, havendo portanto, atividade normal dos genes estruturais. Uma mutação no gene Regulador 1 (R_1), produz um repressor 1 inativo que não interfere no gene Regulador 2 (R_2). Assim, o Regulador 2 produz o repressor 2 que impede a produção de mRNA pelo gene estrutural, alterando a morfologia da linhagem. Uma mutação no Regulador 2, impede-o de produzir o repressor 2, havendo portanto transcrição normal do mRNA e conseqüentemente produção das enzimas. Segundo este modelo, poderia-se supor que o determinante de deterioração fosse uma mutação ocorrida no gene Regulador 1. Assim, a não

produção do repressor 1 faria com que o gene Regulador 2 produzisse seu repressor impedindo a manifestação do gene estrutural e isto resultaria em um genótipo deteriorado. Mutação no Regulador 2 causaria a volta ao genótipo normal. Isso poderia explicar o modo de ação de todos os supressores envolvidos no presente trabalho.

Vários trabalhos poderão ser realizados futuramente, verificando por exemplo a especificidade dos supressores, bem como, a instabilidade das linhagens com reversões. Seria conveniente obter maior número de reversões de cada deteriorado e se proceder testes de alelismo entre elas, como se discute a seguir.

5.4, Análise genética das reversões

A maioria das reversões analisadas foram devidas a supressores. Um exemplo típico é a reversão do V_{37} dada pelo $su_{1V_{37}}$ localizado no grupo de ligação IV. Os dados apresentados no Quadro 19, mostram que todos os segregantes mitóticos deteriorados foram pyro e que os normais foram pyro ou pyro⁺. Entre os setores normais pyro⁺, encontram-se deteriorados cuja deterioração foi suprimida pelo gene supressor. Pode-se verificar ainda, a presença do determinante de deterioração no grupo de ligação VII, como era de se esperar em virtude deste gene já ter sido mapeado neste grupo de ligação. Um outro exemplo, é a reversão 2 do V_{41} (Quadro 21), induzida por luz ultra-violeta e devido a supressores. Nenhum segregante mitótico deteriorado foi obtido, indicando que o $su_{2V_{41}}$ localiza-se no mesmo grupo de ligação que o determinante de deterioração. No entanto, a segregação meiótica revelou que não se trata de reversão verdadeira e sim de supressão, uma vez que segregantes deteriorados foram obtidos. Um terceiro exemplo, trata-se de uma reversão verdadeira (Quadro 22), caso diferente daqueles anteriormente discutidos. Neste, tem-se por característica o

não aparecimento de segregantes deteriorados.

Os cruzamentos e os testes de alelismo realizados com supressores de diferentes morfológicos localizados no mesmo grupo de ligação, parecem indicar, a especificidade dos mesmos, uma vez que cada supressor só é efetivo na supressão de um dado determinante de deterioração. No entanto, um maior número de análises daria uma melhor idéia do fenômeno.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se estudar os variantes deteriorados que ocorrem espontaneamente ou através de indução, em uma linhagem com duplicação cromossômica no fungo Aspergillus nidulans. Também foi estudada a reversão espontânea e induzida dos determinantes de deterioração obtidos. Para isso, foi utilizada uma linhagem que apresenta duplicação do grupo de ligação I translocada para o grupo de ligação II. 17 setores deteriorados e seus derivativos obtidos espontaneamente e através do uso de ultra-violeta e DNA exógeno, foram estudados e analisados geneticamente. Dos resultados obtidos, as seguintes conclusões puderam ser tiradas:

a) Confirmou-se novamente que a duplicação cromossômica é a responsável pela instabilidade mitótica, pois a linhagem sem duplicação cromossômica não produziu setores enquanto que, a linhagem duplicada produziu uma média de 1,9 setores por colônia.

b) Luz ultra-violeta e DNA exógeno não alteraram a frequência total de setores (1,6 setores em média por colônia após tratamento com ultra-violeta e 1,7 em média por colônia após tratamento com DNA exógeno).

c) Luz ultra-violeta aumentou a frequência de setores verdes, provavelmente induzindo preferencialmente deleções no segmento duplicado não translocado.

d) DNA exógeno aumentou a frequência de setores deteriorados (0,206 setores/colônia tratada em comparação com 0,066 no controle), indicando que a presença de material genético em excesso é a responsável pela deterioração ou que o DNA comportou-se como um agente mutagênico no caso.

e) A análise genética demonstrou que os determinantes de deterioração na maioria dos casos comportaram-se como genes simples e estão localizados em quase todos os grupos de ligação.

f) Em alguns setores deteriorados e seus derivativos analisados geneticamente, postulou-se transposição de material genético de um grupo de ligação para outro, à semelhança do que já tinha sido observado por outros autores.

g) Uma alta frequência de reversão (variando de 1 em 524 a 1 em 1497) ocorreu em todos os variantes deteriorados analisados nesse sentido. Das 9 reversões analisadas, 8 delas mostraram que o mecanismo de reversão é devido a genes supressores e apenas uma foi devida a reversão verdadeira.

h) Comprovou-se em dois casos que existe mais de um supressor para o mesmo determinante de deterioração, podendo os mesmos localizarem-se em grupos de ligação diferentes.

i) A semelhança do que aconteceu para os determinantes de deterioração, os supressores localizaram-se em quase todos os grupos de ligação.

j) Supressores de diferentes deteriorados localizados no mesmo grupo de ligação, não foram alelos, indicando uma possível especificidade de ação. Um possível mecanismo para explicar o modo de ação dos supressores foi postulado com base no sistema de regulação em cascata.

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present research was carried out to study the deteriorated variants which arise spontaneously or through induction in a strain of the fungus Aspergillus nidulans, with a chromosomal duplication. It was also studied the spontaneous and induce reversion of the deterioration determinants obtained. The used strain presented a duplication of linkage group I translocated to linkage group II. 17 deteriorated sectors and derivatives spontaneously obtained or induced by ultra-violet light and exogenous DNA, were studied and genetically analysed. From the obtained results the following conclusions can be drawn:

a) Chromosomal duplication is the responsible for the mitotic instability, since the control strain without duplication did produce no Sectors; the duplicated strain produced in average 1,9 sectors per colony.

b) Ultra-violet light and exogenous DNA were not effective regarding the alteration of the total number of sectors produced by the duplication strain. (A mean of 1,6 sectors per colony produced after ultra-violet treatment and a mean of 1,7 sectors per colony after DNA treatment).

c) Ultra-violet light did increase the frequency of green sectors possibly inducing preferential deletions in the duplicated non translocated segment.

d) Exogenous DNA did increase the frequency of deteriorated sectors (0,206 sectors per colony, compared with 0,066 sectors per colony in the control). This could indicate that the presence of genetic material in excess is the responsible for the deterioration or, that the DNA behaved as a mutagenic agent.

e) Genetic analysis have shown that the determinants of deterioration behaved in most cases as single genes and were located in almost all linkage groups.

f) In some deteriorated sectors and derivatives which were genetically analysed, it was postulated transposition of genetic material from one linkage group to another in the same way that have been already suggested by other authors.

g) A high frequency of reversion, varying from 1 in 594 colonies to 1 in 1497 colonies did occur in all deteriorated variants studied. From 9 reversions analysed, 8 did show that the mechanism of reversion was due to suppressor genes and only one was due to a true reversion.

h) It was shown that in two analysed cases there are more than one suppressor for the same determinant of deterioration. They can be located in different linkage groups.

i) As occurred for the location of the determinants of deterioration, also the suppressors were located in almost all linkage groups.

j) Suppressors of distinct determinants of deterioration located in the same linkage group were not alleles. This could indicate that each suppressor is specific for each determinant. It was postulated a possible mechanism based in the cascade regulation system to explain the mode of action of the suppressors.

8. BIBLIOGRAFIA CITADA

- APIRION, D. A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in micro-organisms. Nature, London, 195: 959-961, 1962.
- AZEVEDO, J.L. Mitotic non-conformity in Aspergillus nidulans: Derivatives from deteriorated variants. Aspergillus News Letter, 11: 21, 1970.
- AZEVEDO, J.L. Mitotic non-conformity in Aspergillus nidulans. England, University of Sheffield, 1971. 240 p. (Ph.D.-Thesis).
- AZEVEDO, J.L. Instability at mitosis in Aspergillus nidulans. Genetics Supplement, 74: 14, 1973.
- AZEVEDO, J.L. & ROPER, J.A. Mitotic non-conformity in Aspergillus: successive and transposable genetic changes. Genetical Research, Cambridge, 16: 79-93, 1970.
- BAINBRIDGE, B.W. Genetic analysis of an unequal chromosomal translocation in Aspergillus nidulans. Genetical Research, Cambridge, 15: 317-326, 1970.
- BAINBRIDGE, B.W. & ROPER, J.A. Observations on the effects of a chromosome duplication in Aspergillus nidulans. Journal of General Microbiology, 42: 417-424, 1966.
- BALL, C. Instability associated with chromosome translocation in Aspergillus nidulans. Heredity, 21: 531, 1966.

- BALL, C. Chromosome instability related to gene suppression in Aspergillus nidulans. Genetical Research, Cambridge, 10: 173-183, 1967.
- BALL, C. & AZEVEDO, J.L. Genetic instability in parasexual fungi. Proceedings of the 2nd International Industrial Microorganisms Congress. Academic Press, N.Y. (no prelo), 1974.
- BARNETT, W.E. & DE SERRES, F.J. Fixed genetic instability in Neurospora crassa. Genetics, Princeton, 48: 717-723, 1963.
- BRENNER, S. & BECKWITH, J.R. Ochre mutants, a new class of suppressible nonsense mutants. Journal Molecular Biology, 13: 629-637, 1965.
- BURNS, J.A. & GERSTEL, D.U. Flower color variegation and instability of a block of heterochromatin in Nicotiana. Genetics, Princeton, 57: 155-167, 1967.
- CLUTTERBUCK, A.J. A variegated position effect in Aspergillus nidulans. Genetical Research, Cambridge, 16: 303-316, 1970.
- COOKE, P.; ROPER, J.A. & WATMOUGH, W. Trypan blue induced deletions in duplication strains of Aspergillus nidulans. Nature, London, 226: 276-277, 1970.
- DAWSON, G.W.P. & SMITH-KEARY, P.F. Episomic control of mutation in Salmonella typhimurium. Heredity, 18: 1-20, 1963.
- DEMEREĆ, M. Frequency of spontaneous mutations in certain stocks of Drosophila melanogaster. Genetics, Princeton, 22: 469-478, 1937.
- GERSHENSON, S. Induction of lethal mutations in Drosophila melanogaster by DNA. Genetical Research, Cambridge, 6: 157-162, 1965.
- GOLDSTEIN, A. & SMOOT, J.S. A strain of Escherichia coli with an unusually high rate of auxotrophic mutation, Journal of Bacteriology, 70: 588-595, 1955.

- GORINI, L. Informational suppression. Annual Review of Genetics, 4: 107-134, 1970.
- GORINI, L. & BECKWITH, J.R. Suppression. Annual Review of Microbiology, 20: 401-422, 1966.
- GREEN, M.M. The genetics of a mutable gene at the white locus of Drosophila melanogaster. Genetics, Princeton, 56: 467-482, 1967.
- GREEN, M.M. Controlling elements mediated transpositions of the white gene in Drosophila melanogaster. Genetics, Princeton, 61: 429-441, 1969.
- GREENBLATT, I.M. Transposition and replication of Modulator in maize. Genetics, Princeton, 53: 361-369, 1966.
- GREENBLATT, I.M. The mechanism of Modulator transposition in maize. Genetics, Princeton, 58: 585-597, 1968.
- GREENBLATT, I.M. & BRINK, R.A. Twin mutations in medium variegated pericarp maize. Genetics, Princeton, 47: 489-501, 1962.
- GREENBLATT, I.M. & BRINK, R.A. Transpositions of Modulator in maize into divided and undivided chromosome segments. Nature, London, 197: 412-413, 1963.
- HARTMAN, P.E. & ROTH, J.R. Mechanisms of suppression. Advances in Genetics, 17: 1-105, 1973.
- JAIN, M.L. Biochemical definition of yellow virescent and light-green suppressor mutations in barley. Genetics, Princeton, 54: 813-818, 1966.
- JINKS, J.L. Extranuclear inheritance. The Fungi, Vol II (Ainsworth, G. C. & Sussman, A.S., Edts): 619-660, 1966.

- KÄFER, E. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in Aspergillus nidulans. Nature, London, 186: 619-620, 1960.
- KÄFER, E. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of Aspergillus nidulans. Genetics, Princeton, 46: 1581-1609, 1961.
- LEE, Y.T. & NGA, B.H. Meiotic segregation behavior of translocation haploids in Aspergillus nidulans. Genetics Supplement, 74: 153-154, 1973.
- LENHART, K. Vegetative instability in fungi. I. The mechanisms of vegetative instability in Ascomycetes. Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, 65: 75-81, 1973a.
- LENHART, K. Vegetative instability in fungi. II. Vegetative instability in mutants of Microsporum gypseum. Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, 65: 83-98, 1973 b.
- MARMUR, J.A. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. Journal Molecular Biology, 3: 208-218, 1961.
- McCLINTOCK, B. Chromosome organization and genic expression. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 16: 13-47, 1951.
- McCLINTOCK, B. Induction of instability at selected loci in maize. Genetics, Princeton, 38: 579-599, 1953.
- McCLINTOCK, B. Intranuclear systems controlling gene action and mutation. Brookhaven Symposia Biology, 8: 58-71, 1955.
- McCLINTOCK, B. Controlling elements and the gene. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 21: 197-216, 1956.
- McCULLY, K.S. & FORBES, E. The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of Aspergillus nidulans for assigning genes to linkage groups. Genetical Research, Cambridge, 6: 352-359, 1965.

- MIRANDA FILHO, J.B. Supressores do mutante nic 8 em Aspergillus nidulans.
Dissertação apresentada à ESALQ/USP para obtenção do título de Mestre,
83 p. Piracicaba, SP, 1972.
- MIRANDA FILHO, J.B. & AZEVEDO, J.L. Nicotinic acid suppressors in
Aspergillus nidulans. Experientia, 30: 356-358, 1974.
- MORGAN, D.H. Recombination and complementation between suppressor genes
in Coprinus lagopus. Heredity, 16: 239, 1961.
- MORGAN, D.H. Suppression of "purple" in Coprinus lagopus: an anomalous
genetic situation. Genetical Research, Cambridge, 7: 195-206, 1966.
- NEWMAYER, D. Somatic instability in Neurospora resulting from a
pericentric inversion. Genetics, Princeton, 52: 462-463, 1965.
- NEWMAYER, D. & TAYLOR, C.W. A pericentric inversion in Neurospora with
unstable duplication progeny. Genetics, Princeton, 56: 771-791, 1967.
- NGA, B.H. & ROPER, J.A. A chromosomal process giving rise to vegetative
instability in Aspergillus nidulans. Heredity, 21: 530-531, 1966.
- NGA, B.H. & ROPER, J.A. Quantitative intrachromosomal changes arising at
mitosis in Aspergillus nidulans. Genetics, Princeton, 58: 193-209,
1968.
- NGA, B.H. & ROPER, J.A. A system generating spontaneous intrachromosomal
changes at mitosis in Aspergillus nidulans. Genetical Research, Cam-
bridge, 14: 63-70, 1969.
- POLLARD, D.R.; KÄFER, E. & JOHNSTON, M.T. Influence of chromosomal
aberrations on meiotic and mitotic nondisjunction in Aspergillus
nidulans. Genetics, Princeton, 60: 743-757, 1968.
- PONTECORVO, G. Microbial genetics: retrospect and prospect. Proceedings
of the Royal Society (Série B), 158: 1-23, 1963.

- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; McDONALD, K.D. & BUFTON, A.W.
J. The genetics of Aspergillus nidulans. Advances in Genetics, 5:
141-238, 1953.
- PONTECORVO, G.; TARR GLOOR, E. & FORBES, E. Analysis of mitotic
recombination in Aspergillus nidulans. Journal of Genetics, 52: 226-
237, 1954.
- PONTECORVO, G. & KÄFER, E. Genetic analysis based on mitotic
recombination. Advances in Genetics, 9: 71-104, 1958.
- ROPER, J.A. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi.
Experientia, 8: 14-15, 1952.
- ROPER, J.A. & NGA, B.H. Mitotic non-conformity in Aspergillus nidulans:
the production of hypodiploid and hypohaploid nuclei. Genetical Research,
Cambridge, 14: 127-136, 1969.
- ROPER, J.A.; PALMER, H.M. & WATMOUGH, W.A. Mitotic non-conformity in
Aspergillus nidulans. The effects of caffeine. Molecular General
Genetics, 118: 125-133, 1972.
- ROSATO, Y.B. Efeitos do etil-metano-sulfonato e acriflavina na instabili-
dade mitótica em Aspergillus nidulans. Dissertação apresentada à ESALQ/
USP, para obtenção do título de Mestre, 74 p. Piracicaba, SP, 1973.
- SADGOPAL, A. The genetic code after the excitement. Advances in Genetics,
14: 325-404, 1968.
- SHAPIRO, J.A. Mutations caused by the insertion of genetic material into
the galactose operon of Escherichia coli. Journal of Molecular Biology,
40: 93-105, 1969.
- SHIMADA, K.; WEISBERG, K. & GOTTESMAN, M. Escherichia coli mutants
produced by the insertion of bacteriophage DNA. Genetics Supplement,
73: 81-83, 1973.

STERN, C. Somatic crossing-over and segregation in Drosophila melanogaster.
Genetics, Princeton, 21: 625-730, 1936.

TAYLOR, A.L. Bacteriophage-induced mutation in Escherichia coli.
Proceedings of National Academy of Science, U.S.A., 50: 1043-1051, 1963.

TREFFERS, H.P.; SPINELLI, V. & BELSER, N.O. A factor (or mutator gene)
influencing mutation rates in Escherichia coli. Proceedings of
National Academy of Science, U.S.A., 40: 1064-1071, 1954.

YANOFFSKY, C. & ST. LAWRENCE, P. Gene action. Annual Review of Microbiology,
14: 311-340, 1960.

A P Ê N D I C E

Quadro A-1. Análise mitótica do V_{35}

Haplóides V_{35} //MSE				
Grupos de ligação	Marcadores	Setores		
		deteriorados	não deteriorados	
I	pro ⁺ paba ⁺	2	11	
	pro paba	1	2	
II	w ⁺	3	2	
	w	0	11	
III	gal ⁺	1	5	
	gal	2	8	
IV	pyro ⁺	2	9	
	pyro	1	4	
V	fac ⁺	3	12	
	fac	0	1	
VI	s ⁺	2	8	
	s	1	5	
VII	nic ⁺	2	11	
	nic	1	2	
VIII	ribo ⁺	3	0	
	ribo	0	13	

O determinante genético do V_{35} localiza-se no grupo de ligação VIII.

Quadro A-2. Análise mitótica do V_{37}

Haplóides V_{37} // MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		deteriorados	não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	0	13
	pro paba	0	3
II	w ⁺	0	6
	w	0	10
III	gal ⁺	0	9
	gal	0	7
IV	pyro ⁺	0	9
	pyro	0	7
V	fac ⁺	0	9
	fac	0	7
VI	s ⁺	0	16
	s	0	0
VII	nic ⁺	0	0
	nic	0	16
VIII	ribo ⁺	0	7
	ribo	0	9

O determinante genético do V_{37} localiza-se no grupo de ligação VII.

Quadro A-3. Análise mitótica do V_{38}

Haplóides V_{38} // MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		deteriorados	não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	7	7
	pro paba	0	0
II	w ⁺	4	0
	w	3	7
III	gal ⁺	6	2
	gal	1	5
IV	pyro ⁺	7	3
	pyro	0	4
V	fac ⁺	6	5
	fac	1	2
VI	s ⁺	5	5
	s	2	2
VII	nic ⁺	6	4
	nic	1	3
VIII	ribo ⁺	7	0
	ribo	0	7

O determinante genético do V_{38} localiza-se no grupo de ligação VIII.

Quadro A-4. Análise mitótica do V_{39}

Haplóides V_{39} // MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		deteriorados	não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	0	8
	pro paba	2	4
II	w ⁺	2	4
	w	0	8
III	gal ⁺	2	5
	gal	0	7
IV	pyro ⁺	2	6
	pyro	0	6
V	fac ⁺	2	0
	fac	0	12
VI	s ⁺	2	4
	s	0	8
VII	nic ⁺	2	7
	nic	0	5
VIII	ribo ⁺	1	5
	ribo	1	7

O determinante genético do V_{39} localiza-se no grupo de ligação V.

Quadro A-5. Análise mitótica do V_{40}

Haplóides V_{40} // MSE				
Grupos de ligação	Marcadores	Setores		
		deteriorados	não deteriorados	
I	pro ⁺ paba ⁺	0	5	
	pro paba	0	1	
II	w ⁺	0	0	
	w	0	6	
III	gal ⁺	0	3	
	gal	0	3	
IV	pyro ⁺	0	4	
	pyro	0	2	
V	fac ⁺	0	0	
	fac	0	6	
VI	s ⁺	0	3	
	s	0	3	
VII	nic ⁺	0	1	
	nic	0	5	
VIII	ribo ⁺	0	4	
	ribo	0	2	

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

Quadro A-6. Análise mitótica do $V_{37.1}$

Haplóides $V_{37.1}$ // MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		deteriorados	não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	0	14
	pro paba	5	0
II	w ⁺	2	8
	w	3	6
III	gal ⁺	0	10
		5	4
IV	pyro ⁺	1	10
	pyro	4	4
V	fac ⁺	0	11
	fac	5	3
VI	s ⁺	0	11
	s	5	3
VII	nic ⁺	0	11
	nic	5	3
VIII	ribo ⁺	1	12
	ribo	4	2

O determinante genético do $V_{37.1}$ localiza-se no grupo de ligação I.

Quadro A-7. Análise mitótica do $V_{38.2}$

Haplóides $V_{38.2}$ // MSE				
Grupos de ligação	Marcadores	Setores		
		deteriorados	não deteriorados	
I	pro ⁺ paba ⁺	6	8	
	pro paba	4	0	
II	w ⁺	9	0	
	w	1	8	
III	gal ⁺	6	4	
	gal	4	4	
IV	pyro ⁺	10	0	
	pyro	0	8	
V	fac ⁺	4	7	
	fac	6	1	
VI	s ⁺	9	3	
	s	1	5	
VII	nic ⁺	8	7	
	nic	2	1	
VIII	ribo ⁺	10	7	
	ribo	0	1	

O determinante genético do $V_{38.2}$ localiza-se no grupo de ligação IV.

Quadro A-8. Análise mitótica do $V_{39.1}$

Grupos de ligação	Marcadores	Haplóides $V_{39.1}$ // MSE	
		deteriorados	Setores não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	0	14
	pro paba	3	0
II	w ⁺	0	4
	w	3	10
III	gal ⁺	3	9
	gal	0	5
IV	pyro ⁺	1	10
	pyro	2	4
V	fac ⁺	1	4
	fac	2	10
VI	s ⁺	2	3
	s	1	11
VII	nic ⁺	1	7
	nic	2	7
VIII	ribo ⁺	2	3
	ribo	1	11

O determinante genético $V_{39.1}$ localiza-se no grupo de ligação I.

Quadro A-9. Análise meiótica do V_{35}

$V_{35} \times \text{MSE}$			
Grupo de ligação	Marcador	Colônias	
		deterioradas	não deterioradas
VIII	ribo ⁺	34	21
	ribo	15	27

$$C \frac{\text{ribo}_{2-v_{35}}}{97} = \frac{36}{97} \times 100 = 37,11 \pm 4,90\%$$
Quadro A-10. Análise meiótica do V_{37}

$V_{37} \times \text{MSE}$			
Grupo de ligação	Marcador	Colônias	
		deterioradas	não deterioradas
VIII	nic ⁺	16	10
	nic	22	35

$$C \frac{\text{nic}_{8-v_{37}}}{83} = \frac{32}{83} \times 100 = 38,55 \pm 5,39\%$$
Quadro A-11. Análise meiótica do V_{38}

$V_{38} \times \text{MSE}$			
Grupo de ligação	Marcador	Colônias	
		deterioradas	não deterioradas
VIII	ribo ⁺	32	32
	ribo	7	18

$$C \frac{\text{ribo}_{2-v_{38}}}{89} = \frac{39}{89} \times 100 = 43,82 \pm 5,29\%$$

Quadro A-12. Análise meiótica do V_{39}

V_{39} X MSE			
Grupo de ligação	Marcador	Colônias	
		deterioradas	não deterioradas
V	fac ⁺	27	25
	fac	22	26

$$C_{\text{fac-V}_{39}} = \frac{47}{100} \times 100 = 47,00 \pm 5,00\%$$

Quadro A-13. Análise meiótica do V_{40}

V_{40} X MSE			
Grupo de ligação	Marcador	Colônias	
		deterioradas	não deterioradas
III	gal ⁺	35	13
	gal	15	39

$$C_{\text{gal-I-V}_{40}} = \frac{28}{102} \times 100 = 27,45 \pm 4,47\%$$

Quadro A-14. Análise meiótica do $V_{37.1}$

MSE X $V_{37.1}$			
Grupo de ligação	Marcadores	Colônias	
		deterioradas	não deterioradas
I	pro ⁺	17	32
	pro	28	19
	paba ⁺	19	36
	paba	26	15

$$C_{\frac{\text{pro}_1 - \text{v}_{37.1}}{96}} = \frac{36}{96} \times 100 = 37,50 \pm 4,90\%$$

$$C_{\frac{\text{paba}_6 - \text{v}_{37.1}}{96}} = \frac{34}{96} \times 100 = 35,40 \pm 4,90\%$$

$$C_{\frac{\text{pro}_1 - \text{paba}_6}{96}} = \frac{14}{96} \times 100 = 14,50 \pm 3,61\%$$

Quadro A-15. Análise meiótica do $V_{38.2}$

MSE X $V_{38.2}$			
Grupo de ligação	Marcador	Colônias	
		deterioradas	não deterioradas
IV	pyro ⁺	30	39
	pyro	22	13

$$C_{\frac{\text{pyro}_4 - \text{v}_{38.2}}{104}} = \frac{61}{104} \times 100 = 58,60 \pm 4,80\%$$

Quadro A-16. Análise meiótica do $V_{39.1}$

$V_{39.1} \times \text{MSE}$			
Grupo de ligação	Marcadores	Colônias	
		deterioradas	não deterioradas
I	pro ⁺	22	30
	pro	30	22
	paba ⁺	28	34
	paba	24	18

$$C \frac{\text{pro}_1 - v_{39.1}}{104} = \frac{44}{104} \times 100 = 42,30 \pm 4,80\%$$

$$C \frac{\text{paba}_6 - v_{39.1}}{104} = \frac{46}{104} \times 100 = 44,20 \pm 4,90\%$$

$$C \frac{\text{pro}_1 - \text{paba}_6}{104} = \frac{18}{104} \times 100 = 17,00 \pm 3,74\%$$

Quadro A-17. Análise mitótica do V_{42}

Haplóides V_{42} // MSE			
Grupo de ligação	Marcadores	Setores	
		deteriorados	não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	0	16
	pro paba	0	10
II	w ⁺	0	0
	w	0	26
III	gal ⁺	0	0
	gal	0	26
IV	pyro ⁺	0	5
	pyro	0	21
V	fac ⁺	0	26
	fac	0	0
VI	s ⁺	0	26
	s	0	0
VII	nic ⁺	0	8
	nic	0	18
VIII	ribo ⁺	0	5
	ribo	0	21

O determinante genético do V_{42} está localizado no grupo de ligação II ou no III.

Quadro A-18. Análise mitótica do V_{43}

V_{43} // MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		deteriorados	não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	0	10
	pro paba	0	0
II	w ⁺	0	5
	w	0	5
III	gal ⁺	0	0
	gal	0	10
IV	pyro ⁺	0	7
	pyro	0	3
V	fac ⁺	0	1
	fac	0	9
VI	s ⁺	0	7
	s	0	3
VII	nic ⁺	0	6
	nic	0	4
VIII	ribo ⁺	0	9
	ribo	0	1

Neste caso, há uma translocação envolvendo os grupos de ligação I e III.

Quadro A-19. Análise mitótica do V_{44}

Haplóides V_{44} // MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		deteriorados	não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	0	22
	pro paba	0	0
II	w ⁺	0	0
	w	0	22
III	gal ⁺	0	5
	gal	0	17
IV	pyro ⁺	0	10
	pyro	0	12
V	fac ⁺	0	0
	fac	0	22
VI	s ⁺	0	6
	s	0	16
VII	nic ⁺	0	9
	nic	0	13
VIII	ribo ⁺	0	8
	ribo	0	14

Possivelmente, estejam envolvidos na deterioração do V_{44} , os grupos de ligação: I, II e V. Sua análise meiótica não foi realizada por ser muito difícil quando aberrações cromossômicas estão envolvidas.

Quadro A-20. Análise mitótica do V_{45}

Haplóides V_{45} // MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		deteriorados	não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	0	20
	pro paba	1	0
II	w ⁺	1	0
	w	0	20
III	gal ⁺	0	5
	gal	1	15
IV	pyro ⁺	1	6
	pyro	0	14
V	fac ⁺	0	13
	fac	1	7
VI	s ⁺	0	5
	s	1	15
VII	nic ⁺	1	6
	nic	0	14
VIII	ribo ⁺	0	7
	ribo	1	13

O determinante genético do V_{45} localiza-se no grupo de ligação I.

Quadro A-21. Análise mitótica do $V_{44.1}$

Haplóides $V_{44.1}$ // MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		deteriorados	não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	2	4
	pro paba	2	6
II	w ⁺	2	3
	w	2	7
III	gal ⁺	1	4
	gal	3	6
IV	pyro ⁺	0	5
	pyro	4	5
V	fac ⁺	0	3
	fac	4	7
VI	s ⁺	4	0
	s	0	10
VII	nic ⁺	2	4
	nic	2	6
VIII	ribo ⁺	2	4
	ribo	2	6

O determinante genético do $V_{44.1}$ localiza-se no grupo de ligação VI.

Quadro A-22. Análise meiótica do V_{42}

$V_{42} \times \text{MSE}$			
Grupos de ligação	Marcador	Colônias	
		deterioradas	não deterioradas
III	gal ⁺	20	5
	gal	30	42

$$C_{\text{gal}_1 - v_{42}} = \frac{35}{97} \times 100 = 36,00 \pm 4,90\%$$

Quadro A-23. Análise meiótica do V_{43}

$V_{43} \times \text{MSE}$			
Grupos de ligação	Marcadores	Colônias	
		deterioradas	não deterioradas
I	pro ⁺	25	25
	pro	26	24
	paba ⁺	23	22
	paba	28	27

$$C_{\text{pro}_1 - v_{43}} = \frac{49}{100} \times 100 = 49,00 \pm 5,00\%$$

$$C_{\text{paba}_6 - v_{43}} = \frac{50}{100} \times 100 = 50,00 \pm 5,00\%$$

$$C_{\text{pro}_1 - \text{paba}_6} = \frac{14}{100} \times 100 = 14,00 \pm 3,46\%$$

Quadro A-24. Análise meiótica do $V_{44.1}$

$V_{44.1} \times \text{MSE}$			
Grupos de ligação	Marcador	Colônias	
		deterioradas	não deterioradas
VI	s^+	31	28
	s	15	10

$$C_{s-v_{44.1}} = \frac{43}{84} \times 100 = 51,10 \pm 5,48\%$$

Quadro A-25. Análise meiótica do V_{45}

$V_{45} \times \text{MSE}$			
Grupo de ligação	Marcadores	Colônias	
		deterioradas	não deterioradas
I	pro^+	24	35
	pro	24	10
	$paba^+$	26	27
	paba	22	18

$$C_{pro_1-v_{45}} = \frac{34}{93} \times 100 = 36,50 \pm 5,00\%$$

$$C_{paba_6-v_{45}} = \frac{44}{93} \times 100 = 47,30 \pm 5,20\%$$

$$C_{pro_1-paba_6} = \frac{19}{93} \times 100 = 20,40 \pm 4,12\%$$

Quadro A-26. Análise mitótica da Reversão 2 do V_{37}

Reversão 2 V_{37} // MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		deteriorados	não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	4	5
	pro paba	4	1
II	w ⁺	+	3
	w	+	3
III	gal ⁺	5	1
	gal	3	5
IV	pyro ⁺	0	4
	pyro	8	2
V	fac ⁺	4	2
	fac	4	4
VI	s ⁺	6	3
	s	2	3
VII	nic ⁺	8	2
	nic	0	4
VIII	ribo ⁺	4	4
	ribo	4	2

(+) não foi possível distinguir a coloração dos confídios.

O $su_2 V_{37}$ localiza-se no grupo de ligação IV.

Quadro A-27. Análise meiótica da Reversão 2 do V_{37}

Reversão 2 V_{37} X MSE		
Grupo de ligação	Marcador	Colônias deterioradas
IV	pyro ⁺	45
	pyro	55

$$C_{\frac{su_2}{2} \frac{v_{37}}{4} - \frac{pyro}{4}} = \frac{45}{100} \times 100 = 45,00 \pm 4,97\%$$

Quadro A-28. Análise mitótica da Reversão 1 do V_{40}

Haplóides Reversão 1 V_{40} // MSE				
Grupos de ligação	Marcadores	Setores		
		deteriorados	não deteriorados	
I	pro ⁺ paba ⁺	3	1	
	pro paba	1	3	
II	w ⁺	1	2	
	w	3	2	
III	gal ⁺	1	1	
	gal	3	3	
IV	pyro ⁺	0	4	
	pyro	4	0	
V	fac ⁺	4	2	
	fac	0	2	
VI	s ⁺	2	1	
	s	2	3	
VII	nic ⁺	1	2	
	nic	3	2	
VIII	ribo ⁺	2	3	
	ribo	2	1	

O \underline{su}_1 v_{40} localiza-se no grupo de ligação IV.

Quadro A-29. Análise meiótica da Reversão 1 do V₄₀

Reversão 1 V ₄₀ X MSE		
Gruço de ligação	Marcador	Colônias deterioradas
IV	pyro ⁺	46
	pyro	49

$$C \frac{su_1}{V_{40}} - \frac{pyro_4}{95} = \frac{46}{95} \times 100 = 48,42 \pm 5,10\%$$

Quadro A-30. Análise mitótica da Reversão 1 do V_{41}

Haplóides Rev. 1 V_{41} // MSE			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		deteriorados	não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	0	2
	pro paba	2	3
II	w ⁺	0	2
	w	2	3
III	gal ⁺	2	3
	gal	0	2
IV	pyro ⁺	2	4
	pyro	0	1
V	fac ⁺	1	3
	fac	1	2
VI	s ⁺	1	4
	s	1	1
VII	nic ⁺	2	5
	nic	0	0
VIII	ribo ⁺	0	4
	ribo	2	1

O $su_1 v_{41}$ localiza-se no grupo de ligação VIII.

Quadro A-31. Análise meiótica da Reversão 1 do V₄₁

MSE X Reversão 1 V ₄₁		
Grupo de ligação	Marcador	Colônias deterioradas
VIII	ribo ⁺	22
	ribo	27

$$C_{\text{ribo}_{8^{-}V_{41}}} = \frac{22}{49} \times 100 = 44,90 \pm 7,07\%$$

Quadro A-32. Análise mitótica da Reversão 1 do V_{43}

Haplóides MSE // Reversão 1 do V_{43}				
Grupos de ligação	Marcadores	Setores		
		deteriorados	não deteriorados	
I	pro ⁺ paba ⁺	7	1	
	pro paba	0	0	
II	w ⁺	+	0	
	w	+	1	
III	gal ⁺	0	0	
	gal	7	1	
IV	pyro ⁺	2	1	
	pyro	5	0	
V	fac ⁺	3	0	
	fac	4	1	
VI	s ⁺	4	0	
	s	3	1	
VII	nic ⁺	2	1	
	nic	5	0	
VIII	ribo ⁺	0	0	
	ribo	7	1	

(+) não foi possível distinguir a coloração dos conídios.

O $su_1 V_{43}$ localiza-se no grupo de ligação VIII.

Quadro A-33. Análise meiótica da Reversão 1 do V_{43}

MSE X Reversão 1 do V_{43}		
Grupo de ligação	Marcador	Colônias deterioradas
VIII	ribo ⁺	67
	ribo	26

$$C \frac{su_1}{V_{43}} - \frac{ribo_2}{93} = \frac{67}{93} \times 100 = 72,04 \pm 4,69\%$$

Quadro A-34. Análise mitótica da Reversão 3 do V₃₇

Haplóides Reversão 3 V ₃₇ // MSE				
Grupos de ligação	Marcadores	Setores		
		deteriorados	não deteriorados	
I	pro ⁺ paba ⁺	8	8	
	pro paba	0	8	
II	w ⁺	+	10	
	w	+	6	
III	gal ⁺	5	4	
	gal	3	12	
IV	pyro ⁺	3	13	
	pyro	5	3	
V	fac ⁺	0	2	
	fac	8	14	
VI	s ⁺	6	13	
	s	2	3	
VII	nic ⁺	8	3	
	nic	0	13	
VIII	ribo ⁺	0	7	
	ribo	8	6	

(+) não foi possível distinguir a coloração do conídio.

Pelos resultados apresentados, pode-se verificar que os grupos de ligação I, V e VIII estão envolvidos na supressão, sendo portanto, difícil a realização da análise meiótica.

Quadro A-35. Análise mitótica da Reversão 3 do V_{41}

Haplóides MSE // Reversão 3 do V_{41}			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		deteriorados	não deteriorados
I	pro ⁺ paba ⁺	0	5
	pro paba	2	1
II	w ⁺	0	2
	w	2	4
III	gal ⁺	1	3
	gal	1	3
IV	pyro ⁺	2	1
	pyro	0	5
V	fac ⁺	0	2
	fac	2	4
VI	s ⁺	1	4
	s	1	2
VII	nic ⁺	1	3
	nic	1	3
VIII	ribo ⁺	2	4
	ribo	0	2

O \underline{su}_3 \underline{v}_{41} localiza-se no grupo de ligação V.