

YOKO BOMURA ROSATO

Licenciada em História Natural

EFEITOS DO ETIL-METANO-SULFONATO E ACRIFLAVINA
NA INSTABILIDADE MITÓTICA EM *Aspergillus nidulans*

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz» da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

P I R A C I C A B A

São Paulo - Brasil

1973

Ao meu marido

Às minhas filhas

A G R A D E C I M E N T O S

Desejamos expressar os nossos agradecimentos às pessoas que colaboraram para a realização deste trabalho, e em especial:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação e pelo estímulo concedido durante o decorrer deste trabalho; pela nossa iniciação na pesquisa científica.

Prof. Dr. Almiro Blumenschein, pelas facilidades concedidas na utilização dos recursos do Instituto de Genética e pelo contínuo interesse demonstrado na nossa formação científica.

Prof. Dr. José Theophilo do Amaral Gurgel, pela revisão cuidadosa do manuscrito e pelas sugestões apresentadas.

Sr. e Sra. Pedro Gervásio Faulin, pelos serviços técnicos; Srta. Angelina Spernega, pela datilografia e Prof^a Miriam Celi P. Foresti pelas correções do vernáculo.

Aos amigos.

Queremos agradecer também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de estudos concedida no Curso de Pós-Graduação na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", e à Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu pela oportunidade de aperfeiçoamento concedida.

Í N D I C E

	Página
1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	3
2.1. Referências gerais	3
2.1.1. Instabilidade em organismos superiores ..	3
2.1.2. Instabilidade em microrganismos	8
2.2. Referências específicas	9
3. Materiais e métodos	12
3.1. Símbolo e fenótipo dos mutantes	12
3.2. Linhagens utilizadas	13
3.3. Meios de cultura e soluções	15
3.3.1. Meio mínimo	15
3.3.2. Meio completo	15
3.3.3. Meio de galactose	15
3.3.4. Meio de acetato de amônia	15
3.3.5. Ácido nucleico de leveduras hidrolizado .	16
3.3.6. Solução de vitaminas	16
3.3.7. Solução salina	16
3.3.8. Solução de "tween"	17
3.3.9. Meio mínimo líquido + 2% de meio completo	17
3.4. Suplementos adicionados ao meio mínimo	17
3.5. Placas de análise	17
3.6. Semeadura e incubação	18
3.7. Curva de sobrevivência	18
3.7.1. Acriflavina	18
3.7.2. Etil-metano-sulfonato	19
3.8. Isolamento de derivados morfológicos	19
3.9. Produção de setores	20
3.10. Análise genética	20
3.10.1. Obtenção de heterocários	20
3.10.2. Análise mitótica	20
3.10.3. Análise meiótica	21
3.10.4. Cruzamento morfológico x morfológico ..	22

	Página
4. Resultados	23
4.1. Curva de sobrevivência	23
4.1.1. Acriflavina	23
4.1.2. Etil-metano-sulfonato	23
4.2. Isolamento de derivados morfológicos	25
4.2.1. Acriflavina	27
4.2.2. Etil-metano-sulfonato	28
4.3. Instabilidade mitótica através da produção de setores	33
4.4. Análise genética	34
4.4.1. Análise mitótica	34
4.4.2. Análise meiótica	46
4.4.3. Cruzamento de morfológico x morfológico .	49
5. Discussão	51
5.1. Mutagênicos	51
5.1.1. Acriflavina	51
5.1.2. Etil-metano-sulfonato	52
5.2. Linhagens N ₁ e N ₂	54
5.3. Linhagens deterioradas	55
5.4. Letais	60
6. Resumo e conclusões	62
7. Summary	64
8. Literatura citada	65

1. Introdução.

No fungo filamentosso Aspergillus nidulans ocorre o fenômeno de instabilidade vegetativa, descrito originalmente por Bainbridge e Roper (1966). Este fenômeno parece ser típico das linhagens apresentando duplicação cromossômica e nunca foi observado em linhagens haplóides normais. As linhagens duplicadas apresentam taxa de crescimento reduzida e morfologia típica, produzindo dois tipos principais de setores: melhorados e deteriorados.

Os setores melhorados foram estudados por Nga e Roper (1968) e originaram-se principalmente por deleções de tamanhos variados dos segmentos em duplicata. Isto levaria gradualmente a uma estabilização da linhagem, atingindo o estágio haplóide normal.

Os setores deteriorados foram inicialmente analisados por Nga e Roper (1968), Azevedo e Roper (1970) e principalmente por Azevedo (1971a). Caracterizam-se fenotipicamente pela coloração marrom púrpura, pela taxa de crescimento reduzida, pela escassez na produção de conídios e principalmente, pela instabilidade em vários graus, produzindo outros setores de morfologia alterada. Estes novos setores podem também ser melhorados ou mais deteriorados. Foi proposto que a deterioração e instabilidade resultam de novas duplicações em tandem; a transposição destes elementos para outras regiões do genoma reduziria a instabilidade.

Os fenômenos de instabilidade abrangem uma diversidade muito grande de organismos. Entretanto, há poucos exemplos onde é possível identificar e analisar os componentes genéticos associados aos mecanismos que controlam os processos de instabilidade. O uso do fungo Aspergillus nidulans para estudos desta natureza é bastante facilitado, pois ele apresenta muitas vantagens, conforme descreveram Pontecorvo e col. (1953). Além disso, é possível o isolamento e a análise individual dos diversos setores produzidos. A maior dificuldade reside na análise citogenética, pois seus cromossomos são muito pequenos e de difícil observação (Elliott, 1960).

Com o presente trabalho pretende-se testar o efeito de dois mutagênicos químicos: acriflavina e etil-

metano-sulfonato em diversas linhagens e analisar as alterações ocorridas nas mesmas. Foram utilizadas quatro linhagens deterioradas, uma haplóide normal e uma com duplicação cromossômica.

A escolha desses dois mutagênicos é atribuída à certas propriedades que lhe são características e de grande interesse no presente trabalho.

A acriflavina é reconhecidamente um mutagênico que induz mutações de ponto (Fishbein, 1970) e eliminação de elementos extra-cromossômicos (Hirota e Iijima, 1957). Esta segunda propriedade é de especial interesse, pois diversos autores (Taylor, 1963; Green, 1969; Peterson, 1970; Shimada e col., 1973) relacionam a ocorrência de instabilidade com a presença de elementos epissômicos do tipo fago temperado, ou com a existência de DNA genético extra no genoma (Azevedo, 1971a). Se estes elementos genéticos existem nas linhagens deterioradas de Aspergillus nidulans e são susceptíveis à eliminação por acriflavina, o fenômeno pode ser evidenciado através de uma melhoria geral no fenótipo.

O etil-metano-sulfonato é de ação mutagênica efetiva numa grande variedade de organismos, produzindo diversos tipos de mutações (Fishbein, 1970). Em eucariotos induz letais em ratos (Partington, 1968), camundongos (Ehling, 1968), Drosophila (Hochman, 1971) e quebras cromossômicas em camundongos (Cattanach e col., 1968). Seu mecanismo de ação ao nível molecular é melhor conhecido em procariotos. Em Neurospora crassa, Malling e Serres (1968) e Serres e col. (1971) verificaram que ocorre principalmente transição de pares de bases e deleções em menor grau. Além dessas propriedades, o etil-metano-sulfonato mostrou-se eficiente na indução de instabilidade em Schizosacharomyces (Nasim e Auerbach, 1967), produzindo colônias em mosaico. Desde que o etil-metano-sulfonato pode atuar induzindo instabilidade, o uso deste mutagênico é de interesse no presente trabalho, para obtenção de derivados com características de instabilidade.

2. Revisão da literatura.

Os casos de instabilidade somática são encontrados em diversas espécies, sendo que em algumas o fenômeno foi analisado com maiores detalhes. Para maior facilidade, a presente revisão será dividida em Referências gerais, com subdivisões abrangendo as principais espécies onde foram descritos os casos de instabilidade e em Referências específicas, onde se encontram somente os casos descritos em Aspergillus nidulans.

A terminologia empregada pelos diferentes autores é bastante diversa. Entretanto, como diz McClintock (1950): "os termos: genes mutáveis, genes instáveis, variação, mosaicism, loci mutáveis ou efeito de posição, foram designações diferentes, dadas a um mesmo fenômeno básico". Nesta revisão, esses diversos termos serão utilizados, de acordo com a denominação dada pelo autor.

2.1. Referências gerais.

Emerson (1914), foi o primeiro a sugerir a existência de genes instáveis. Atribuiu a variação da cor do pericarpo do milho a uma consequência da frequente mutação do gene P^{VV} para pericarpo incolor (P).

Estudos feitos por Demerec (1941) em Drosophila virilis levaram à conclusão de que a alta taxa de mutação dos genes instáveis era uma propriedade autônoma e inerente do próprio gene. Demerec verificou ainda que a mutabilidade dos genes "miniature" para asa era influenciada por fatores genéticos e ambientais.

Posteriormente, vários outros trabalhos foram publicados, atingindo organismos superiores e microrganismos.

2.1.1. Instabilidade em organismos superiores.

Rhoades (1941) descreveu a primeira situação em milho, onde um gene a_1 , altamente estável, com baixa taxa de mutação se tornava altamente instável em presença de um outro gene controlador chamado "Dotted" (dt), situado em cromossomo diferente. A ação mais provável de dt seria a alteração no ambiente celular, de forma que o gene a_1 se tornava

mutável. O gene a₁ sofria mutações para diferentes formas alélicas, sendo que alguns alelos não haviam sido descritos anteriormente. dt é específico na sua ação, não alterando a taxa de mutação de outros genes estáveis ou instáveis.

Entretanto, os estudos mais detalhados do ponto de vista citológico e genético sobre genes instáveis foram realizados por McClintock (1951, 1956 e 1965). Ela demonstrou que a alta mutabilidade de vários genes em milho era controlada por elementos genéticos independentes. O primeiro sistema de elementos controladores que identificou foi o Ac-Ds (Ac = ativador; Ds = dissociador) que se assemelha ao sistema de regulação gênica proposto por Jacob e Monod (1961). Assim, Ac seria o elemento regulador e Ds atuaria como operador. Ambos, Ac e Ds, podem se mover de uma posição para outra no complemento cromossômico. A inserção de Ds pode produzir uma alteração imediata na expressão gênica, com subsequente mudança de sua expressão em resposta a Ac. O controle das mutações durante o desenvolvimento da planta ou da semente deve-se apenas ao elemento Ac, ao qual responde Ds. Ac deve estar na sua fase ativa para Ds iniciar qualquer mudança na ação do gene, em cujo locus Ds está situado. A expressão alterada do gene variou desde o tipo completamente recessivo até o selvagem e essa modificação na expressão do gene foi associada a liberação do gene do controle do sistema. Foram também analisados alguns casos de loci autônomos. Esses não requerem nenhum ativador para sofrer mutação. Os alelos que surgem podem também ser instáveis, sofrendo novas mutações para níveis de expressão mais altos ou mais baixos.

Um outro sistema de controle foi examinado extensivamente por Peterson (1961) e McClintock (1956). Peterson designou o elemento regulador de "enhancer" (En) e McClintock de Spm e, posteriormente, verificaram que se tratava do mesmo elemento. A maior parte das conclusões do sistema Ac-Ds são válidas para Spm, sendo que este exhibe maior complexidade. Possui dois componentes: componente-1 (supressor), que regula diretamente a expressão do gene sob seu controle e o componente-2 (mutador), responsável pela transposição. Quando o supressor está na fase ativa, reprime a expressão do gene e quando na fase inativa, permite sua expressão. A resposta do operador ao componente-2 pode originar a expressão mutante do gene

que é liberado do controle, ou pode apenas alterar o tipo de resposta, provocando neste caso, as mudanças de estado. Em alguns destes estados alterados, o operador perde sua capacidade de resposta ao componente-2, ficando apenas sob controle do componente-1.

Outros casos de regulação gênica em milho foram registrados por Brink (1956) e Linden (1963,1964), que utilizaram o locus R e Coe (1959, 1961), que utilizou o locus B. A manifestação era registrada por tipos previsíveis de mudança na ação de um alelo associado a outro. Brink usou o termo paramutação e Coe chamou-o de conversão. Entretanto, em nenhum dos casos foi identificado um elemento controlador no locus gênico.

Brink (1960) propôs que a composição dos cromossomos era feita por duas substâncias: ortocromatina e paracromatina. Esta proposição está de acordo com as duas espécies de cromatina, eucromatina e heterocromatina que são reconhecíveis por critérios citológicos. A ortocromatina compreende o DNA, que codifica a formação das enzimas envolvidas nos processos de síntese proteica, sendo altamente diferenciada; a paracromatina condiciona os processos envolvidos na diferenciação funcional de muitos loci, em resposta ao ambiente celular. Pode ser alterada qualitativamente de acordo com o substrato celular que se forma durante a ontogenia.

Quanto ao mecanismo de transposição, Greenblatt (1966, 1968) sugeriu que o fenômeno deveria ocorrer durante a duplicação. Seus estudos foram baseados nas manchas gêneas que aparecem no grão de milho; usou o alelo variegado P^{VV} que possui o elemento transponível modulador (Mp), descrito inicialmente por Brink e Nilan (1952), correspondente ao elemento Ac, descrito por McClintock (Barclay e Brink, 1954). Os resultados obtidos por Greenblatt sugerem que a transposição ocorre somente quando o cromossomo e Mp estão se replicando, sendo que apenas a nova cópia de Mp é transposta. O sítio receptor não deve ter se replicado durante a transposição e assim, o Mp transposto pode replicar uma segunda vez. O modelo proposto é consistente com a duplicação semi-conservativa e bastante razoável, uma vez que a transposição requer excisão e integração de DNA, fenômenos que devem ser facilitados durante o período de

duplicação, quando o DNA está supostamente livre de seus componentes proteicos.

Rhoades e Dempsey (1973) atribuíram a formação de mosaico nas sementes de milho à perda de segmentos cromossômicos da série A, induzida pelos cromossomos B. A perda de cromatina foi restrita aos cromossomos que possuíam "knobs", sendo causada pela falha na replicação dos "knobs" heterocromáticos.

Um caso semelhante foi analisado por Burns e Gerstel (1967), que utilizaram híbridos de Nicotiana tabacum x Nicotiana glauca. A variegação nas flores foi associada à instabilidade de um segmento heterocromático. Este segmento poderia estar ligado com diferentes cromossomos, apresentando na extremidade distal uma região eucromática onde se localizava o alelo Co^V, que produzia coloração carmin. Nas divisões mitóticas poderiam ocorrer quebras do bloco de heterocromatina levando à perda de Co^V e, conseqüentemente, à variegação.

A variegação encontrada nas flores foi também analisada por Harrison e Fincham (1964) em Antirrhinum majus. Os alelos da série "pallida-recurrens" (pal^{rec}) mutam com alta frequência para o alelo dominante Pal, originando manchas nas flores. A frequência de manchas que aparecem é alterada por fatores ambientais e genéticos. Os fatores genéticos que controlam o grau de instabilidade não foram analisados, havendo indicações de que mais de um locus deve estar envolvido.

A influência de fatores ambientais, como a temperatura, foi analisada por Faberge e Beale (1942), em Portulaca e por Rhoades (1941), em milho. Nestes casos, foram registrados aumentos na frequência de mutação em temperaturas mais baixas. Fincham (1973) sugere que os fatores ambientais devem influir nos sistemas mutáveis através da regulação na transcrição gênica e não diretamente sobre os genes que apresentam alta mutabilidade.

A variegação nas flores é encontrada em diversas espécies vegetais e os casos estudados em Delphinium ajacis (Demerec, 1931; Dawson, 1955), Pharbitis (Imai e Tabuchi, 1938), Pelargonium (Imai, 1936), Gossypium (Harland, 1937) e Lathyrus (Imai e Iinuma, 1938) sugerem a existência de genes instáveis.

Em Drosophila, também foram registrados vários casos de instabilidade.

Demerec (1941) estudou o caráter "miniature" em Drosophila virilis e encontrou quatro genes instáveis, todos revertendo para o alelo selvagem (mudanças primárias) ou para qualquer outro alelo (mudanças secundárias). Ambos os tipos de mudanças são afetados por fatores genéticos estimulantes de mutabilidade, fatores estes específicos atuando apenas sobre os alelos determinantes de "miniature". As mudanças que ocorrem nestes genes não estão associadas a aberrações cromossômicas.

Schultz (1936) analisou o caráter "mottled" em Drosophila melanogaster e verificou que a variação estava relacionada com aberrações cromossômicas envolvendo heterocromatina.

Mampell (1945, 1946) especulou a possibilidade da heterocromatina estar envolvida nos processos de instabilidade. Trabalhou com um gene mutador em Drosophila pseudoobscura, que atua apenas nos machos, sendo as mutações representadas por deficiências genéticas ou inativação permanente. O mutador age em vários loci e é aparentemente infeccioso.

Green (1970) também analisou um gene mutador em Drosophila e que atua somente nas fêmeas. Este gene induz reversões numa alta frequência e, além disso, influencia os processos meióticos aumentando a não disjunção e diminuindo a ocorrência de permuta. Outros casos de genes mutadores em Drosophila são citados por Green (1973).

Além dos genes mutadores que produzem alta taxa de mutação, outros casos de instabilidade não devidos a mutadores foram analisados em Drosophila. Green (1967) descreveu instabilidade no locus "white" (w^c) de Drosophila melanogaster que apresentou mutação para diferentes estados alélicos, desde o selvagem até o branco. Os alelos derivados de w^c podem ser estáveis ou instáveis e neste último caso, estão envolvidas deficiências que incluem perda de w e loci adjacentes. Green (1969) descreveu também quatro transposições independentes e espontâneas de um segmento da região "white" para o cromossomo III. A análise genética da transposição envolve a existência de elementos controladores incorporados em cada segmento transposto. O fenômeno é relacionado à semelhança do que ocorre na indução da lisogenia por fagos temperados, em Escherichia coli. Duas conse

quências foram reconhecidas: reversão de w^c para w^+ , que seria equivalente à liberação do elemento controlador (virus?), dando portanto estabilidade; a transposição do elemento controlador associado ao segmento cromossômico seria equivalente à formação de fagos defectivos.

2.1.2. Instabilidade em microrganismos.

Entre os microrganismos, diversos casos de instabilidade foram também registrados.

Newcombe (1953) descreveu um padrão complexo de radiação induzindo instabilidade em Streptomyces. Há alteração na morfologia e algumas mutações podem ser instáveis ou estáveis. O autor sugere a possibilidade dos elementos controladores serem responsáveis pela instabilidade.

Em Escherichia coli, os primeiros casos de instabilidade foram registrados por Treffers e col. (1954), que detectaram uma alta taxa de mutação para resistência à estreptomicina e por Golstein e Smoot (1955) que descreveram uma linhagem com alta taxa de mutação para auxotrofia. Nesses casos a alta taxa de mutação era causada por genes mutadores. Em 1956, Skaar também registrou alta taxa de mutação para resistência à estreptomicina, mas localizou um fator dependente (Mut⁺), ligado ao locus L (leucina).

Genes mutadores têm sido bem estudados em Escherichia coli. Muitos foram mapeados e os produtos ou a falta de produtos desses genes causam mutações, variando desde simples mudanças de pares de bases até pequenas adições e deleções. Grande parte dos mutadores conhecidos estão envolvidos nos processos de replicação, recombinação e reparação de DNA (Cox, 1973).

Em leveduras foram também identificados genes mutadores em diversas linhagens sendo que, à semelhança de Escherichia coli, provocam transições, transversões e adições-deleções (von Borstel e col., 1973).

Smith-Keary (1958) encontrou em Salmonella typhimurium alguns derivados de linhagens dependentes de leucina (leu⁻), que revertiam para leu⁺ numa alta taxa. Dawson e Smith-Keary (1963) verificaram que a causa da instabilidade era ligada ao locus supressor de leucina (su leu^A). A origem

da instabilidade foi relacionada com a ligação de um elemento ao sítio su leu^A, sendo que a diminuição da instabilidade ocorre com a perda destes elementos controladores, ou com sua integração estável em algum sítio. Estes elementos podiam também sofrer transposição para outros sítios afins, provocando instabilidade deste locus e estabilização no locus original. Foi sugerida a denominação de "epissomos controladores" aos elementos que modificam a expressão fenotípica, aumentam a taxa de mutação e sofrem transposição.

Em Neurospora crassa, Barnett e Serres (1963) analisaram o primeiro caso de instabilidade. O sítio instável existe em duas formas alélicas, cada uma mutando para outra em alta frequência. Foi proposto que a contínua instabilidade era devido a mudanças de pares de bases do tipo transição.

Ainda em Neurospora crassa, Newmeyer (1965) e Newmeyer e Taylor (1967) descreveram casos de instabilidade resultantes de uma inversão pericêntrica. As progenies mostraram um crescimento inicial reduzido e eram fortemente pigmentadas. Após alguns dias de incubação, produziam setores que cresciam como o tipo selvagem. As progenies eram instáveis devido à existência de duplicações produzidas pela permuta na inversão. A inibição inicial no crescimento foi atribuída à heteroziguidade do locus para reação sexual. Os derivados semelhantes ao tipo selvagem eram homozigotos ou hemizigotos para o locus de reação sexual.

2.2. Referências específicas.

Os primeiros casos de instabilidade descritos em Aspergillus nidulans puderam ser explicados pelos mecanismos clássicos em genética. Assim, temos os casos de aneuploidia, descritos por Käfer (1961), onde, por não disjunção mitótica, há perda de cromossomos e conseqüente retorno ao estado haplóide normal. Em linhagens diplóides, pode ocorrer o fenômeno de haploidização descrito por Käfer (1960), onde, por um processo gradual, há perdas sucessivas de cromossomos, atingindo o estágio haplóide normal. Pode também ocorrer o fenômeno de permuta mitótica levando à formação de células mitóticas recombinantes (Roper, 1952).

O primeiro caso mais complexo de instabilidade foi relatado por Bainbridge e Roper (1966), quando estudavam os fatores genéticos que afetam a morfologia em Aspergillus nidulans. Observaram uma variante ainda não descrita, resultante do cruzamento de pais morfologicamente normais. Esta nova variante foi denominada "crinkled" e possuía uma duplicação de um segmento cromossômico como resultado de uma translocação não recíproca em um dos pais. As colônias "crinkled" apresentavam uma morfologia distinta, crescimento lento e eram instáveis, produzindo setores de vários tipos, que se assemelhavam ao normal. Estes setores eram resultantes da perda do segmento cromossômico em duplicata.

Nga e Roper (1968), utilizando linhagens duplicadas com marcadores genéticos mais favoráveis, contribuíram para melhor compreensão do fenômeno. Além das reversões totais ou parciais em direção ao tipo selvagem (melhorados), verificaram que se originavam também outros setores de morfologia alterada e que foram designados por deteriorados. A análise dos setores melhorados comprovou que a reversão era devido à perda preferencial do segmento duplicado translocado em vários graus e que a perda era muitas vezes intersticial. Com relação aos setores deteriorados, apenas dois foram analisados, dando indicações de duplicações em tandem. A perda e aparente ganho de material cromossômico ocorre provavelmente por um processo intra-cromossômico, desde que ambas as classes se originam sem evidências de permuta entre segmentos homólogos. Os autores propuseram dois mecanismos para explicar a origem simultânea das duas classes: permuta desigual entre cromatídios irmãos ou permuta numa alça intracromossômica.

Através do estudo de várias linhagens haplóides e diplóides, com e sem duplicação translocada, Nga e Roper (1969) concluíram que a instabilidade era provocada por um desequilíbrio cromossômico e que as deleções produzidas eram restritas quase exclusivamente aos segmentos que provocavam instabilidade. Propuseram o termo "não-conformidade mitótica" para este fenômeno de instabilidade.

Com relação às linhagens deterioradas, as maiores contribuições são provenientes dos trabalhos de Azevedo e Roper (1970) e Azevedo (1971a). Verificaram que a produ-

ção de setores deteriorados era característica das linhagens duplicadas, não sendo detectadas a partir de linhagens normais. Isto indicava que a duplicação tinha uma ação positiva na produção de setores deteriorados desconhecendo-se, entretanto, a sua forma de ação. A origem da deterioração morfológica e o grau de instabilidade foi tentativamente atribuída a novas duplicações em tandem. A transposição deste material genético extra para outras regiões do genoma resultaria em maior estabilidade, mas estes tipos estáveis eram muitas vezes mais instáveis que as linhagens duplicadas. Devia haver uma interação entre a mutação v e a duplicação, pois v sozinho não conferia instabilidade. Algumas linhagens mostraram acúmulo de mutações, produzindo alterações na morfologia e no grau de instabilidade. A contínua instabilidade poderia ser atribuída a uma interdependência entre cromossomos não homólogos na duplicação, sendo que mutação em um cromossomo poderia levar a uma mutação em uma região susceptível de outro. Isto facilitaria de certa forma as propostas transposições. Todos os grupos de ligação estão envolvidos com as mutações que determinam o caráter morfológico, havendo indicações de que há regiões de susceptibilidade particular a estas mudanças, principalmente nas regiões próximas ao centrômero.

3. Materiais e métodos.

3.1. Símbolo e fenótipos dos mutantes.

<u>Símbolo</u>	<u>Fenótipo</u>
<u>ad</u> ₂₀	requerimento para adenina
<u>bi</u> ₁	requerimento para biotina
<u>fac</u> ₃₀₃	não crescimento em meio com acetato como fonte de carbono
<u>gal</u> ₁	não crescimento em meio com galactose como fonte de carbono
<u>nic</u> ₈	requerimento para ácido nicotínico
<u>paba</u> ₆	requerimento para ácido p-amino benzóico
<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>v</u> ₃ , <u>v</u> ₅ , <u>v</u> ₈ , <u>v</u> ₉ e <u>v</u> ₁₀	elementos responsáveis por deterioração (morfologia alterada)
<u>y</u>	conídios amarelos
<u>w</u> ₃	conídios brancos

A origem e descrição dos mutantes podem ser encontrados em Dorn (1967) e Azevedo e Roper (1970) e Azevedo (1971a).

3.2. Linhagens utilizadas.

a. Linhagem MSE ("Master Strain E"): possui um marcador genético em cada um dos oito grupos de ligação (McCully e Forbes, 1965) como se observa na Figura 1.

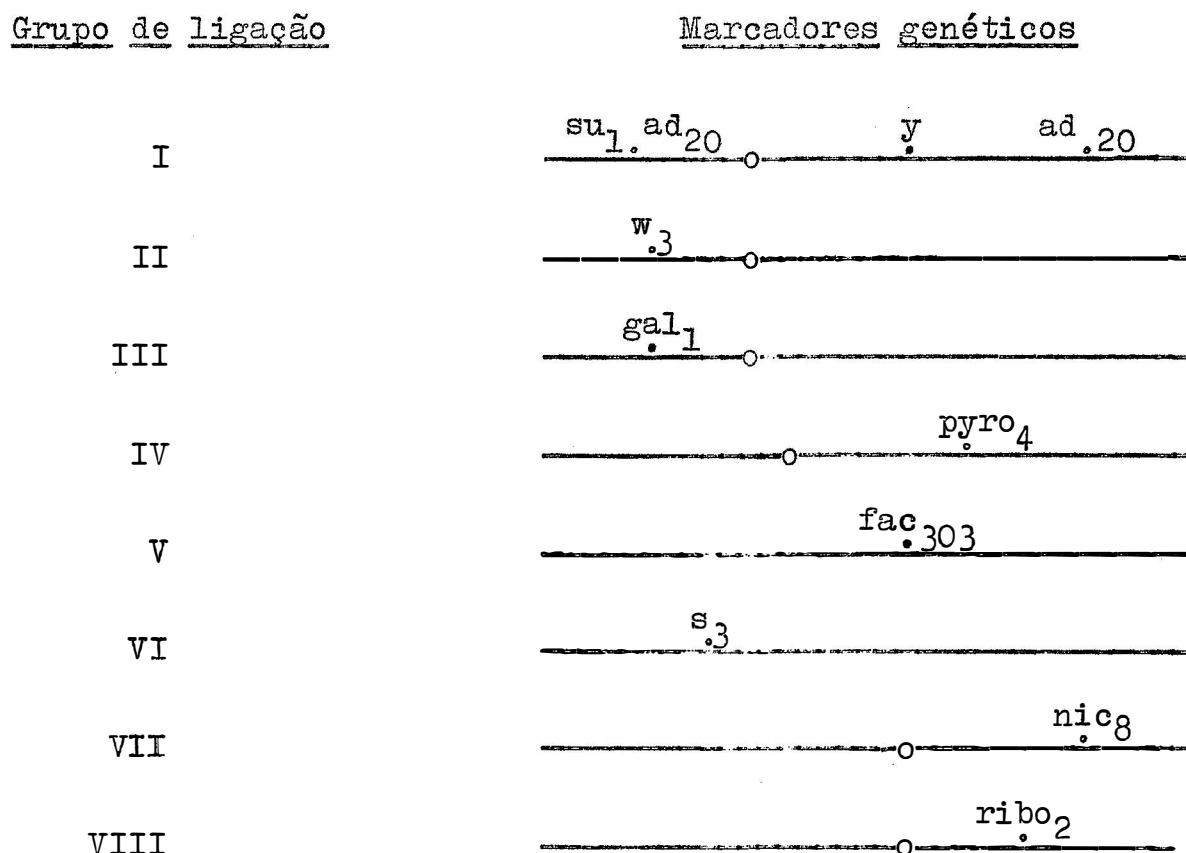


Figura 1: Marcadores genéticos da linhagem MSE. Os centrômeros estão designados por o. As distâncias dos marcadores não estão em escala no mapa. Os fenótipos determinados pelos genes podem ser encontrados no item 3.1.

b. Linhagem A: possui uma duplicação do grupo de ligação I translocada para o grupo de ligação II (Nga e Roper, 1968), como se observa na Figura 2.

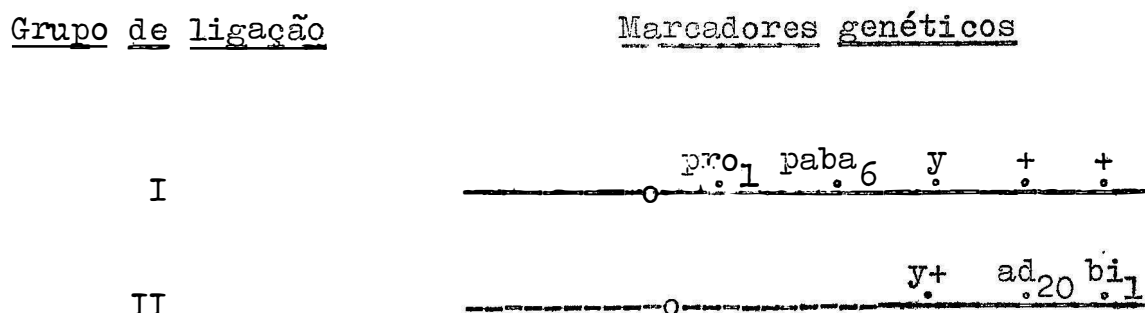


Figura 2: Marcadores genéticos da linhagem A. Os centrômeros estão designados por o. As distâncias dos marcadores não estão em escala no mapa. Os fenótipos determinados pelos genes podem ser encontrados no item 3.1.

- c. Linhagem N: pro₁; paba₆; y
- d. Linhagem V3: pro₁; paba₆; v₃
- e. Linhagem V5: pro₁; paba₆; v₅
- f. Linhagem V8: pro₁; paba₆; v₈
- g. Linhagem V9: pro₁; paba₆; v₉
- h. Linhagem V10: pro₁; paba₆; v₁₀

As linhagens V5, V8, V9 e V10 possuem uma duplicação do grupo de ligação I e translocada para o II, à semelhança da linhagem A (Figura 2). A linhagem V3 possui uma duplicação do grupo de ligação I translocada para o II, diferindo da linhagem A no tocante aos marcadores genéticos. No grupo de ligação I encontram-se os marcadores genéticos: pro₁; paba₆; ad₂₀; bi₁ e no segmento duplicado translocado: y. Todas essas linhagens foram obtidas por Azevedo e Roper (1970) e Azevedo (1971a).

As linhagens utilizadas foram obtidas da coleção existente no Setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

3.3. Meios de cultura e soluções.

3.3.1. Meio mínimo (Pontecorvo e col., 1953).

Nitrato de sódio	6,00 gramas
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,52 gramas
Cloreto de potássio	0,52 gramas
Fosfato dihidrogenado de potássio	1,52 gramas
Sulfato de ferro	traços
Sulfato de zinco	traços
Dextrose	10,00 gramas
Ágar	20,00 gramas
Água	1 litro
pH ajustado para 6,8 com hidróxido de sódio 4% ou HCl 1N	

3.3.2. Meio completo (Pontecorvo e col., 1953).

Adiciona-se ao meio mínimo:

Peptona (Fischer)	2 gramas
Caseína hidrolizada (Oxoid)	1,5 gramas
Extrato de leveduras (Oxoid)	0,5 gramas
Ácido nucleico de leveduras hidrolizado	2,5 ml (item 3.3.5.)
Solução de vitaminas	1 ml (item 3.3.6.)
pH ajustado para 6,8 com hidróxido de sódio 4% ou HCl 1N	

3.3.3. Meio de galactose.

Preparado da mesma forma que o meio mínimo, substituindo-se a dextrose por galactose. O pH é ajustado para 6,0.

3.3.4. Meio de acetato de amônia (Apirion, 1962).

Acetato de amônia	12 gramas
Cloreto de	2,0 gramas
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,5 gramas
Fosfato dihidrogenado de potássio	3,0 gramas
Sulfato de ferro	traços
Sulfato de zinco	traços
Ágar	15,0 gramas
Água	1 litro
pH ajustado para 6,1 com hidróxido de sódio 4%	

Autoclavagem.

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave à pressão de 1 atmosfera durante 15 minutos e mantidos a temperatura ambiente. O mesmo processo de esterilização foi utilizado para solução "tween" e salina.

3.3.5. Ácido nucleico de leveduras hidrolizado.

Ácido nucleico de leveduras	2 gramas em 15 ml de solução normal de ácido clorídrico
Ácido nucleico de leveduras	2 gramas em 15 ml de solução normal de hidróxido de sódio

Aquecem-se as duas soluções por 20 minutos em banho-maria. A seguir são misturadas e o pH é ajustado para 6,0. Filtra-se em seguida, completando o volume para 40 ml. A solução é guardada no refrigerador, sob clorofórmio.

3.3.6. Solução de vitaminas.

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

A solução é parcialmente esterilizada em banho-maria por 15 minutos e guardada em frasco escuro no refrigerador, sob clorofórmio.

3.3.7. Solução salina.

Prepara-se uma solução de cloreto de sódio 0,9% em água destilada. São colocados 9 ml da solução em frascos, autoclavados e mantidos à temperatura ambiente.

3.3.8. Solução de "tween".

Adiciona-se "tween" 80 à água destilada em uma concentração de 0,1% (v/v). 2,5 ml da solução são colocados em tubos, autoclavados e mantidos no refrigerador.

3.3.9. Meio mínimo líquido + 2% de meio completo.

Ao meio mínimo, sem adição de ágar, adicionam-se 2% de meio completo (sem ágar). Colocam-se 2,5 ml da solução em tubos que são autoclavados e mantidos no refrigerador.

3.4. Suplementos adicionados ao meio mínimo.

<u>Substância</u>	<u>Concentração</u>
Ácido p-aminobenzóico	0,7 mcg/ml
Ácido nicotínico	0,05 mcg/ml
Adenina	70 mcg/ml
p-fluorfenilalanina	35 mcg/ml
Piridoxina	0,05 mcg/ml
Prolina	50 mcg/ml
Riboflavina	0,05 mcg/ml
Tiosulfato de sódio	200 mcg/ml

3.5. Placas de análise.

Durante todo o trabalho foram utilizadas placas de Petri com 9 cm de diâmetro, 2 cm de altura e papel de filtro sob a tampa para absorção da umidade. A quantidade de meio de cultura por placa variou de 20 a 30 ml.

O tipo de meio de cultura utilizado sofreu variações dependendo da finalidade da análise, podendo ser meio completo, meio mínimo ou meio mínimo suplementado.

Para a determinação dos requerimentos nutricionais de segregantes mitóticos ou meióticos, foram utilizadas placas de meio mínimo suplementadas com os requerimentos envolvidos nos cruzamentos, exceto aquele sob análise.

3.6. Semeadura e incubação.

Para obtenção de colônias isoladas, os conídios foram transferidos através de um fio de platina para solução de "tween", e agitados vigorosamente. Isso provoca ruptura das cadeias. Foi semeado 0,1 ml da suspensão de conídios em cada placa e com um espalhador de vidro flambado foram dispersos sobre o meio de cultura. Para obtenção de pequeno número de colônias por placa, foram feitas diluições adequadas em solução salina.

As placas mestras para análise genética foram preparadas, inoculando-se os segregantes em 26 pontos de disposição 1 + 5 x 5, marcados no fundo da placa. A transferência destas 26 colônias para outros meios de cultura foi feita por intermédio de um replicador de 26 pontas.

Durante todo o experimento, a temperatura de incubação foi de 37°C, exceto nos casos que serão assinalados.

3.7. Curva de sobrevivência.

Foi determinada a curva de sobrevivência para as 6 linhagens utilizadas no presente trabalho, com o uso de dois mutagênicos químicos: acriflavina e etil-metano-sulfonato. Tal determinação foi efetuada para obter o tempo e a concentração eficiente para produzir cerca de 10% de sobrevivência.

Todas as linhagens receberam isoladamente o mesmo tratamento.

Os conídios foram transferidos por uma alça de platina para 4 ml de solução de "tween". Sua concentração foi estimada por meio de um hemocitômetro. A suspensão de conídios foi dividida em quatro tubos, sendo utilizados três para tratamento e um para testemunha.

A partir de uma solução 0,02% (v/v) de acriflavina, foram retiradas alíquotas de 0,05, 0,1 e 0,2 ml e colocadas, isoladamente, nos tubos contendo a suspensão de conídios, resultando as concentrações de 10, 20 e 40 mcg/ml, respectivamente.

tivamente. Os conídios ficaram expostos à ação mutagênica de acriflavina durante 24 horas, à temperatura de 37°C. Decorrido este tempo, a suspensão foi diluída em solução salina e amostras de 0,1 ml foram semeadas em placas com meio completo. Após três dias de incubação, foram feitas as contagens de colônias sobreviventes. A suspensão de conídios sem o tratamento, foi tomada como testemunha e considerada ao nível de 100% de sobrevivência.

3.7.2. Etil-metano-sulfonato (EMS).

O tratamento foi o mesmo para todas as linhagens testadas.

Foi preparada uma suspensão de conídios em 2,0 ml de "tween" e a densidade estimada em um hemocitômetro. A suspensão foi dividida em duas porções de 1 ml. Em uma, foram adicionados 2 ml de uma solução de EMS 2%, dando uma concentração aproximada de 1,33% (v/v). Após 2, 4 e 6 horas de tratamento, à temperatura de 28°C, foram retiradas amostras de 0,1 ml e semeadas em placas com meio completo. Diluições adequadas foram efetuadas para diminuir a concentração do mutagênico e possibilitando também a formação de colônias isoladas. Após três dias de incubação, foram feitas as contagens das colônias sobreviventes. A outra porção de conídios não sofreu tratamento com o mutagênico e foi considerada como testemunha com o nível de 100% de sobrevivência.

3.8. Isolamento de derivados morfológicos.

O processo de isolamento de derivados morfológicos foi o mesmo para todas as linhagens, independentemente do mutagênico utilizado.

Adotou-se o limite de 10% de sobrevivência que permitiu o aparecimento de um grande número de colônias de morfologia alterada.

As linhagens foram tratadas isoladamente com acriflavina e etil-metano-sulfonato, mas em amostragem maior. O número de colônias por placa manteve-se ao redor de trinta, procurando-se assim isolar colônias puras. Os diferentes derivados receberam a numeração de acordo com a ordem de isolamento e prosseguindo a nomenclatura adotada por Azevedo (1971a).

3.9. Produção de setores.

A instabilidade dos derivados morfológicos pode ser observada através da produção de setores. Os conídios das linhagens são inoculados centralmente em placas com meio completo e mantidos na estufa durante sete dias. Decorrido este tempo, a contagem dos setores pode ser efetuada. Estes são reconhecidos pela morfologia alterada e(ou) pela taxa de crescimento geralmente maior que a da linhagem original. Para cada linhagem foram utilizadas dez placas.

3.10. Análise genética.

3.10.1. Obtenção de heterocários.

Para obtenção de heterocários, procedeu-se de acordo com a técnica descrita por Pontecorvo e col. (1953). Conídios de duas linhagens com diferentes requisitos nutricionais foram colocados, em proporções aproximadamente iguais, em 2,5 ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo. Após três dias de incubação, formou-se uma película na superfície do meio de cultura. A película foi recortada e transferida para placas com meio mínimo sólido. Após uma semana de incubação, formaram-se os setores heterocarióticos, com núcleos geneticamente diferentes na mesma hifa, que conseguem se desenvolver em meio mínimo.

Os heterocários para análise genética foram obtidos a partir dos cruzamentos dos mutantes morfológicos derivados das linhagens A, N, V3, V5, V8 e V9, com a linhagem testadora MSE.

3.10.2. Análise mitótica.

A análise mitótica foi efetuada através do ciclo parasssexual, de acordo com a técnica descrita por Roper (1952). Obtém-se o heterocário, ao qual é permitido crescer em meio mínimo. Formam-se conídios que, por serem haplóides, não se desenvolvem. Entretanto, na hifa heterocariótica pode haver uma fusão de núcleos haplóides, formando-se núcleos diplóides heterozigotos. Estes originam conídios diplóides, capazes de crescer em meio mínimo. Semeando-se grande quantidade de conídios em placas com meio mínimo, é possível o isolamento de

tais diplóides.

O reconhecimento dos diplóides foi feito através da coloração verde ou amarela (no caso de N x MSE), pelo crescimento em meio mínimo e pelo tamanho dos conídios. A medição dos conídios foi feita ao microscópio com ocular graduada, tomando-se cadeias de quatro ou cinco conídios, em lâminas com lisol diluído (1:10) que favorece a manutenção dos conídios em cadeia (Pontecorvo e col., 1954). Os diplóides obtidos foram purificados e conservados em estoque com meio mínimo inclinado.

A indução para haploidização foi feita com p-fluorfenilalanina (pFA) que inibe o crescimento de diplóides, permitindo o crescimento de setores haplóides (Morpurgo, 1961). Segundo Käfer (1961), a haploidização ocorre através de aneuploidia com perdas sucessivas de cromossomos.

Os diplóides são inoculados em quatro pontos isolados nas placas com meio completo mais pFA. São incubados durante 7-10 dias e com a formação dos setores haplóides, procede-se a isolamento e purificação.

Os segregantes haplóides são inoculados individualmente em placas mestras e posteriormente replicadas para as placas de análise.

3.10.3. Análise meiótica.

A análise meiótica foi efetuada de acordo com a técnica descrita por Pontecorvo e col. (1953).

O heterocário obtido dos diversos cruzamentos é transferido para placas com meio mínimo sólido e vedadas com fita celulósica, procedimento que favorece a formação de cleistotécios. Após 8-10 dias de incubação, formam-se os cleistotécios maduros que são isolados por intermédio de um fio de platina, rolados na superfície de ágar, a fim de livrá-los das células de Hülle e conídios aderentes. Procurou-se sempre isolar os cleistotécios maiores, pois há uma correlação entre tamanho e cleistotécio híbrido (Baracho e col., 1970). Cleistotécios limpos são transferidos para uma solução salina e rompidos na parede do tubo com auxílio de uma pipeta. Os ascospores são liberados e alíquotas dessa suspensão são sementeadas em pequena quantidade em meio completo para comprovação do seu estado híbrido.

Somente os de origem híbrida são utilizados para análise.

Os segregantes meióticos que se obtém, são inoculados individualmente para placas mestras e, após três dias de incubação, podem ser transferidos para placas de análise.

Para verificar o tipo de segregação do caráter sob análise, faz-se amostragem casual de ascósporos e os segregantes meióticos são classificados em duas categorias principais: normais, que apresentam coloração de conídios branca, amarela e verde, e deteriorados, que apresentam a coloração marrom púrpura em vários graus.

3.10.4. Cruzamento morfológico x morfológico.

Este cruzamento foi feito a fim de verificar a ligação da mutação com outros determinantes de deterioração mapeados no mesmo grupo de ligação.

A técnica consiste em obter um heterocáριο entre as duas linhagens que possuem os determinantes de deterioração no mesmo grupo de ligação e que tenham requisitos nutricionais diferentes. A análise de ascósporos de cleistotécios híbridos fornece evidências das relações de ligação entre os determinantes de deterioração.

4. Resultados.

4.1. Curva de sobrevivência.

4.1.1. Acriflavina.

Suspensões de conídios das linhagens N, A, V3, V5, V8 e V9, submetidas às doses de 10, 20 e 40 mcg/ml de acriflavina durante 24 horas, forneceram os resultados apresentados na Tabela I.

Tabela I - Porcentagem de conídios sobreviventes das linhagens tratadas com acriflavina.

Concentração de acriflavina	L i n h a g e n s					
	N	A	V3	V5	V8	V9
0mcg/ml	100	100	100	100	100	100
10mcg/ml	23,910	10,910	11,714	9,250	12,360	10,240
20mcg/ml	3,020	1,285	0,566	0,485	0,660	0,806
40mcg/ml	0,075	0,785	0,010	0,010	0,100	0,098

Com os dados da Tabela I foi construído o gráfico da Figura 3.

4.1.2. Etil-metano-sulfonato.

Suspensões de conídios das linhagens N, A, V3, V5, V8 e V9, submetidas ao tratamento com EMS 1,33% em diferentes tempos forneceram os dados apresentados na Tabela II.

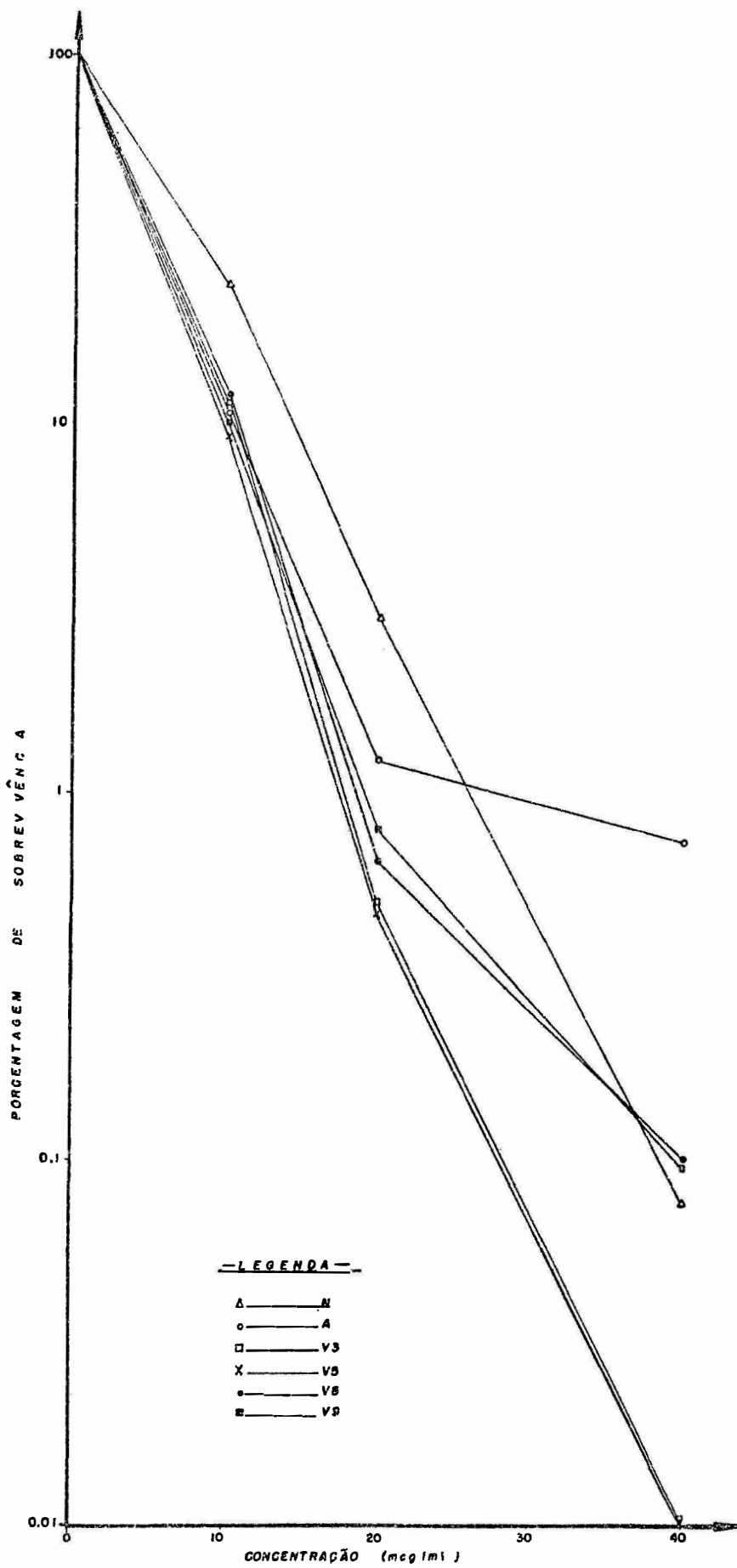


FIGURA 3: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA À AGRIFLAVINA (24 HORAS DE TRATAMENTO)

Tabela II - Porcentagem de conídios sobreviventes nas linhagens tratadas com EMS.

Tempo (horas)	L i n h a g e n s					
	N	A	V3	V5	V8	V9
0	100	100	100	100	100	100
2	29,00	- *	15,88	20,98	35,33	28,10
4	10,00	12,00	10,14	14,52	14,00	13,50
6	6,50	8,00	8,82	6,13	7,33	8,00

* Não observado.

A partir dos dados da Tabela II foi construído o gráfico da Figura 4.

4.2. Isolamento de derivados morfológicos.

Com o uso dos mutagênicos químicos foram obtidos diversos tipos de derivados morfológicos, que foram classificados em: deteriorados: quando a coloração dos conídios era mais avermelhada do que o tipo original e(ou) a taxa de cres cimento era visivelmente reduzida; melhorados: quando a coloração dos conídios era normal (branco, amarelo ou verde) e finalmente, quando não identificáveis em nenhuma dessas categorias, foram enquadrados em diversos.

Nas Tabelas III e IV são apresentadas as porcentagens dos diversos derivados morfológicos obtidos com acriflavina e EMS.

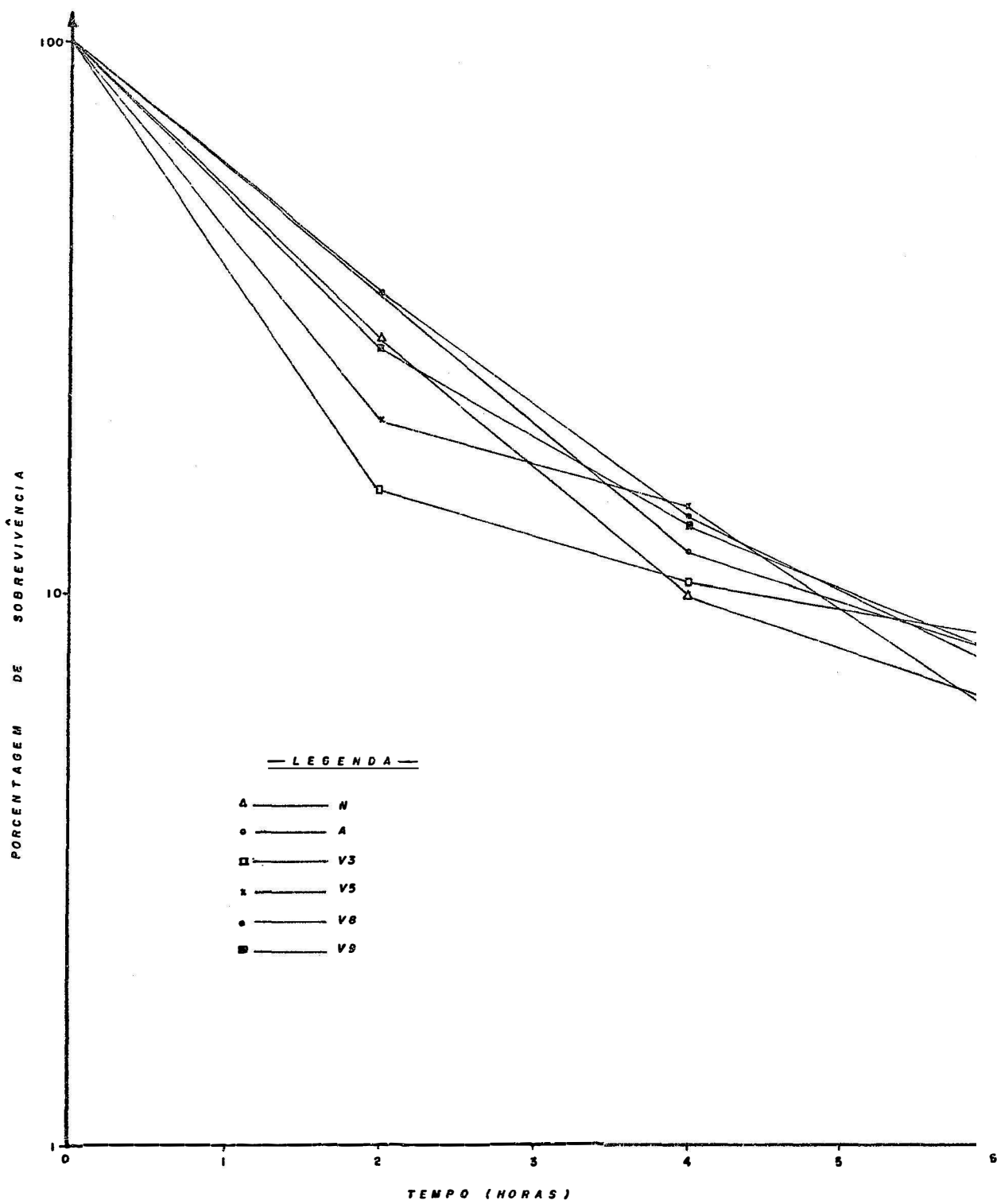


FIGURA 4: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA À ETIL METANO-SULFONATO
(CONCENTRAÇÃO DE 1.33 %)

4.2.1. Acriflavina.

Tabela III: Porcentagem de derivados morfológicos obtidos com acriflavina.

Linhagem	Melhorados		Deteriorados		Diversos		% total de derivados
	T ₁	T ₂	T ₁	T ₂	T ₁	T ₂	
N	0	0	0	0	0	0	0
A	0	3,12	0	1,75	0	0	4,87
V3*	0	0,32	0	0,21	0	0,21	0,74
V5*	0	0,97	0	0,77	0	0	1,74
V8*	0	0	0	2,16	10	25,18	27,34
V9*	0	0	0	3,89	0	0,35	4,24
Total	0	4,41	0	8,78	10	25,74	

T₁ = Testemunha

T₂ = Tratamento

*Valores da testemunha extraídos de Azevedo (1971a).

4.2.2. Etil-metano-sulfonato.

Tabela IV: Porcentagem de derivados morfológicos obtidos com EMS.

Linhagem	Melhorados		Deteriorados		Diversos		% total de derivados
	T ₁	T ₂	T ₁	T ₂	T ₁	T ₂	
N	0	0	0	4,29	0	7,14	11,43
A	0	6,44	0	6,72	0	11,76	24,92
V3*	0	0,71	0	3,55	0	3,55	7,81
V5*	0	2,02	0	3,14	0	1,12	6,28
V8*	0	2,04	0	32,19	10	5,10	39,33
V9*	0	1,78	0	6,22	0	0	7,90
Total	0	12,99	0	56,11	10	28,67	

T₁ = Testemunha

T₂ = Tratamento

* Valores da testemunha extraídos de Azevedo (1971a).

Foram selecionados dez derivados morfológicos, sendo apenas um proveniente do tratamento com acriflavina; os nove restantes sofreram tratamento com EMS.

Para a nomenclatura das novas linhagens, obedeceu-se àquela adotada por Azevedo (1971a), dando seqüência na numeração, exceto para os derivados da linhagem N. Assim, as novas linhagens receberam as designações abaixo:

<u>Origem</u>	<u>Tratamento</u>	<u>Derivados</u>
N		N ₁
		N ₂
A	EMS	V33
		V34
V3	acriflavina	V3.4
V5	EMS	V5.3
V8	EMS	V8.2
		V8.3
V9	EMS	V9.6
		V9.7

A morfologia dos derivados pode ser observada nas Figuras de número 5 a 10.

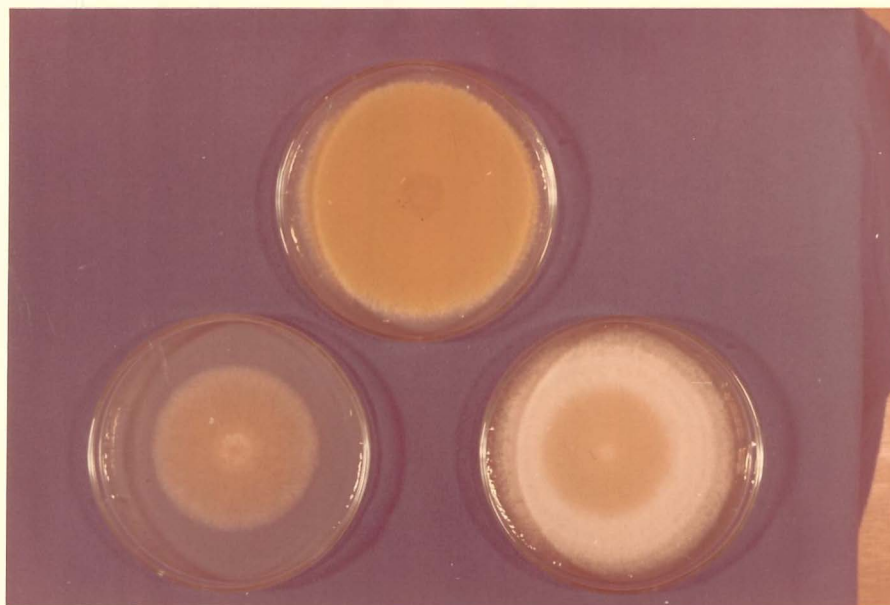


Figura 5: Linhagem N e seus derivados: N_1 (à esquerda) e N_2 (à direita).

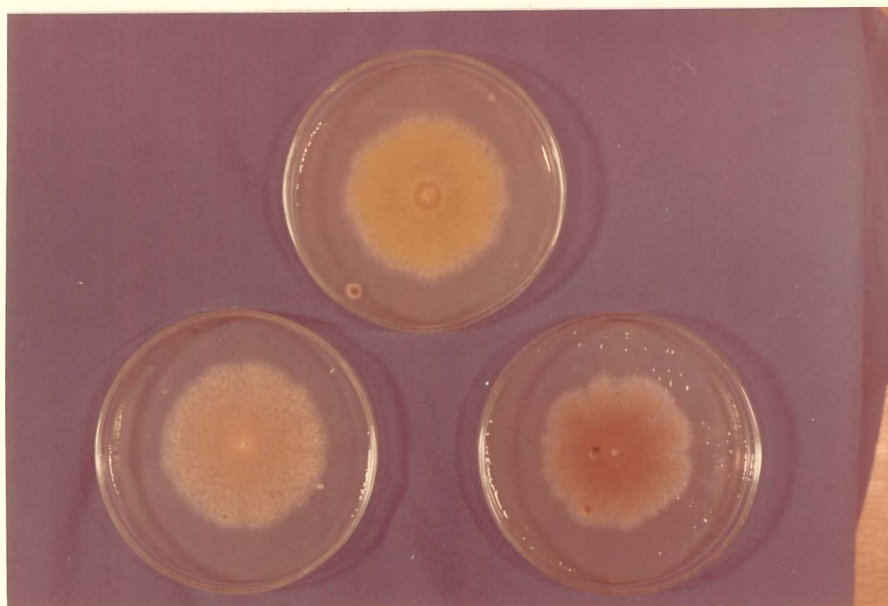


Figura 6: Linhagem A e seus derivados: V33 (à esquerda) e V34 (à direita).

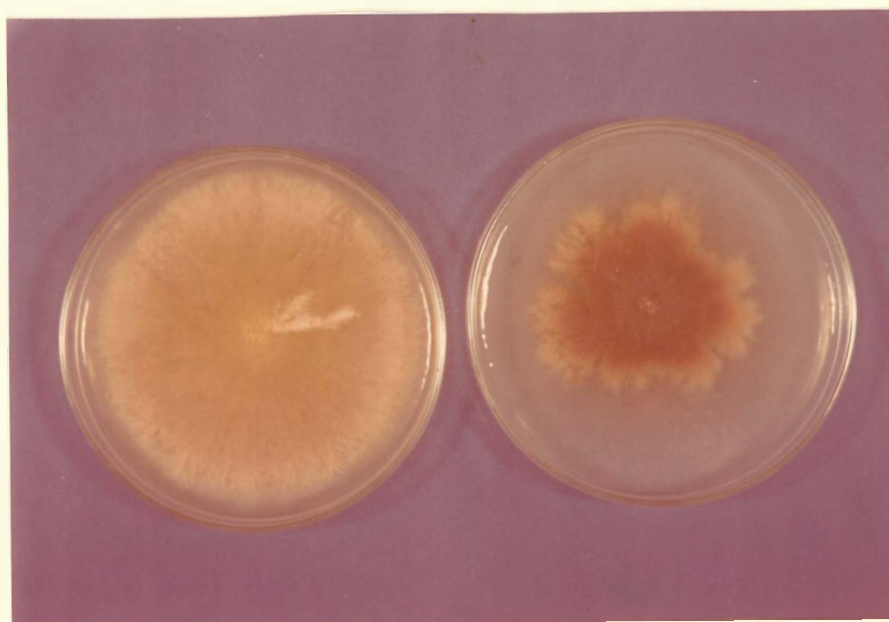


Figura 7: Linhagem V3 (à esquerda) e V3.4 (à direita).

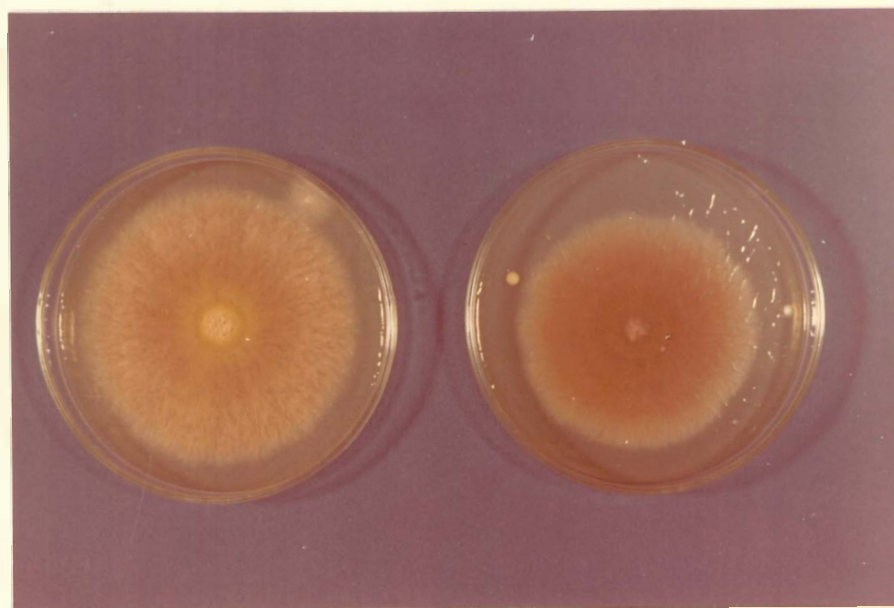


Figura 8: Linhagem V5 (à esquerda) e V5.3 (à direita).

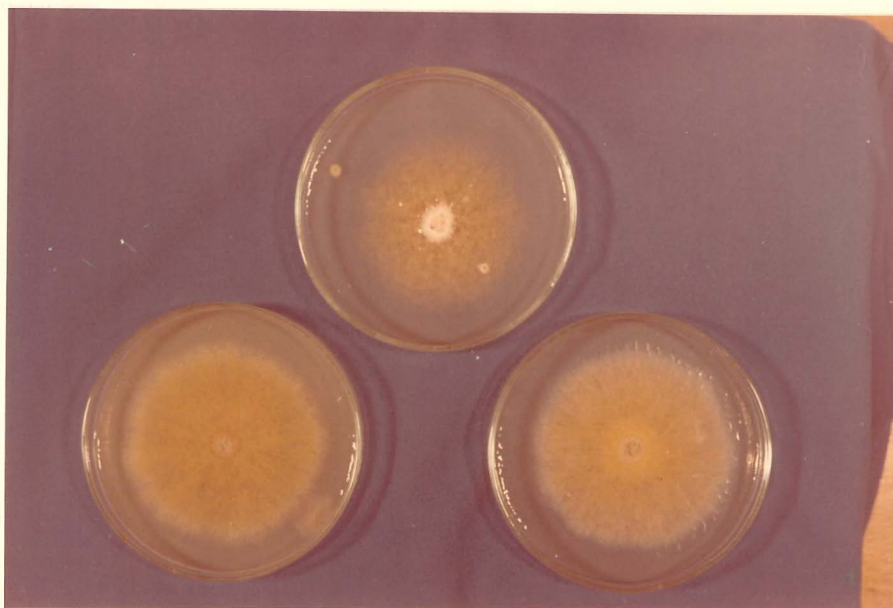


Figura 9: Linhagem V8 e seus derivados: V8.3 (à esquerda) e V8.2 (à direita).

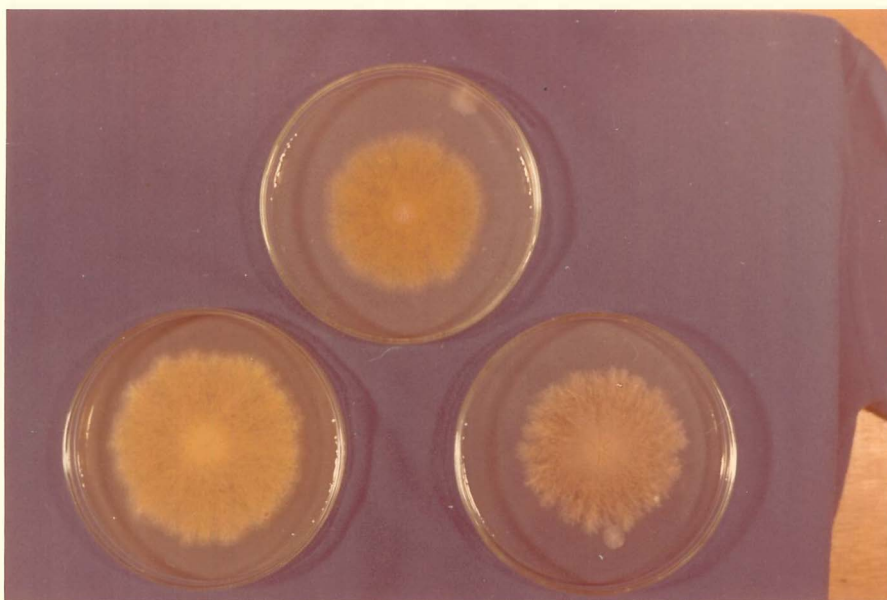


Figura 10: Linhagem V9 e seus derivados: V9.6 (à esquerda) e V9.7 (à direita).

4.3. Instabilidade mitótica através da produção de setores.

O número de setores produzidos pelas diversas linhagens fornece indicações da instabilidade das mesmas. Foi efetuada a inoculação de dez placas para cada linhagem analisada e a contagem dos setores produzidos em cada caso está sumarizada na Tabela V.

Tabela V: Produção de setores dos derivados morfológicos.

<u>Derivados</u>	<u>Contagem de setores</u>
N ₁	0
N ₂	0
V33	2
V34	3
V3.4	bordos irregulares; setores múltiplos
V5.3	bordos irregulares; setores múltiplos
V8.2	9
V8.3	0
V9.6	bordos irregulares; setores múltiplos
V9.7	bordos irregulares; setores múltiplos

As linhagens V3.4 e V9.6 apresentam crescimento inicial com característica "crinkled" acentuada, de limites bem definidos. Após este crescimento inicial, há perda desta característica e o crescimento se mantém aparentemente normal. As linhagens V5.3 e V9.7 também apresentam característica "crinkled" acentuada; entretanto, esta característica se mantém, produzindo bordos irregulares nas extremidades devido ao crescimento mais rápido de alguns setores. Os diversos setores produzidos não apresentam limites definidos, impossibilitando a contagem correta.

4.4. Análise genética.

4.4.1. Análise mitótica.

Foram isolados setores haplóides a partir dos diplóides formados entre as linhagens sob análise e a linhagem MSE. Os setores foram classificados em normais e deteriorados, sendo que os primeiros incluem aqueles que apresentam conídios de coloração branca e(ou) amarela e os deteriorados apresentam coloração de marrom à púrpura em vários graus ou caráter mutante. A análise mitótica dos diplóides forneceu os dados que constam nas Tabelas de número VI a XV.

Tabela VI: Análise mitótica do diplóide N_1 //MSE.

Grupo de ligação	Marcadores	Deteriorados	Normais
I	pro ⁺ paba ⁺	1	10
	pro paba	3	2
II	w ⁺	4	3
	w	0	9
III	gal ⁺	4	2
	gal	0	10
IV	pyro ⁺	4	0
	pyro	0	12
V	fac ⁺	1	9
	fac	3	3
VI	s ⁺	4	8
	s	0	4
VII	nic ⁺	2	2
	nic	2	10
VIII	ribo ⁺	4	0
	ribo	0	12

Tabela VII: Análise mitótica do diplóide N_2 //MSE.

Grupo de ligação	Marcadores	Deteriorados	Normais
I	pro ⁺ paba ⁺	0	11
	pro paba	1	0
II	w ⁺	1	0
	w	0	11
III	gal ⁺	1	8
	gal	0	3
IV	pyro ⁺	1	4
	pyro	0	7
V	fac ⁺	0	9
	fac	1	2
VI	s ⁺	1	6
	s	0	5
VII	nic ⁺	0	0
	nic	1	11
VIII	ribo ⁺	0	5
	ribo	1	6

Tabela VIII: Análise mitótica do diplóide V33//MSE.

Grupo de ligação	Marcadores	Deteriorados	Normais
I	pro ⁺ paba ⁺	7	11
	pro paba	0	6
II	w ⁺	*	0
	w	*	17
III	gal ⁺	2	7
	gal	5	10
IV	pyro ⁺	3	6
	pyro	4	11
V	fac ⁺	4	8
	fac	3	9
VI	s ⁺	4	13
	s	3	4
VII	nic	4	13
	nic	3	4
VIII	ribo ⁺	7	0
	ribo	0	17

* Não distinguíveis.

Tabela IX: Análise mitótica do diplóide V34//MSE.

Grupo de ligação	Marcadores	Deteriorados	Normais
I	pro ⁺ paba ⁺	2	19
	pro paba	0	4
II	w ⁺	*	2**
	w	*	21
III	gal ⁺	2	23
	gal	0	0 ***
IV	pyro ⁺	0	16
	pyro	2	7
V	fac ⁺	1	9
	fac	1	14
VI	s ⁺	2	22
	s	0	1
VII	nic ⁺	2	11
	nic	0	12
VIII	ribo ⁺	2	0
	ribo	0	23

Não distinguíveis.

** Os dois setores são amarelos e não duplicados; a perda da duplicação pode ter ocorrido em estágio anterior à haploidização.

*** Determinante letal da linhagem MSE.

Tabela X: Análise mitótica do diplóide V3.4//MSE:

Grupo de ligação	Marcadores	Deteriorados	Normais
I	pro ⁺ paba ⁺	1	16
	pro paba	0	1
II	w ⁺	*	0
	w	*	17
III	gal ⁺	1	15
	gal	0	2
IV	pyro ⁺	0	5
	pyro	1	12
V	fac ⁺	0	0
	fac	1	17
VI	s ⁺	0	16
	s	1	1
VII	nic ⁺	1	2
	nic	0	15
VIII	ribo ⁺	0	11
	ribo	1	6

* Não distinguível.

Tabela XI: Análise mitótica do diplóide V5.3//MSE.

Grupo de ligação	Marcadores	Deteriorados	Normais
I	pro ⁺ paba ⁺	0	8
	pro paba	0	3
II	w ⁺	0	0
	w	0	11
III	gal ⁺	0	9
	gal	0	2
IV	pyro ⁺	0	7
	pyro	0	4
V	fac ⁺	0	3
	fac	0	8
VI	s ⁺	0	0
	s	0	11
VII	nic ⁺	0	0
	nic	0	11
VIII	ribo ⁺	0	6
	ribo	0	5

Tabela XII: Análise mitótica do diplóide V8.2//MSE.

Grupo de ligação	Marcadores	Deteriorados	Normais
I	pro ⁺ paba ⁺	0	11
	pro paba	0	5
II	w ⁺	0	0
	w	0	16
III	gal ⁺	0	11*
	gal	0	5
IV	pyro ⁺	0	9
	pyro	0	7
V	fac ⁺	0	9
	fac	0	7
VI	s ⁺	0	11*
	s	0	5
VII	nic ⁺	0	0
	nic	0	16
VIII	ribo ⁺	0	10
	ribo	0	6

Associação dos marcadores genéticos dos grupos de ligação III e VI.

Tabela XIII: Análise mitótica do diplóide V8.3//MSE.

Grupo de ligação	Marcadores	Deteriorados	Normais
I	pro ⁺ paba ⁺	0	16
	pro paba	0	0
II	w ⁺	0	0
	w	0	16
III	gal ⁺	0	16
	gal	0	0*
IV	pyro ⁺	0	10
	pyro	0	6
V	fac ⁺	0	7
	fac	0	9
VI	s ⁺	0	14
	s	0	2
VII	nic ⁺	0	0
	nic	0	16
VIII	ribo ⁺	0	11
	ribo	0	5

* Determinante letal da linhagem MSE.

Tabela XIV: Análise mitótica do diplóide V9.6//MSE.

Grupo de ligação	Marcadores	Deteriorados	Normais
I	pro ⁺ paba ⁺	0	18
	pro paba	0	8
II	w ⁺	0	0
	w	0	26
III	gal ⁺	0	20
	gal	0	6
IV	pyro ⁺	0	13
	pyro	0	13
V	fac ⁺	0	13
	fac	0	13
VI	s ⁺	0	21
	s	0	5
VII	nic ⁺	0	0
	nic	0	26
VIII	ribo ⁺	0	10
	ribo	0	16

Tabela XI: Análise mitótica do diplóide V9.7//MSE.

Grupo de ligação	Marcadores	Deteriorados	Normais
I	pro ⁺ paba ⁺	0	15
	pro paba	0	3
II	w ⁺	0	0
	w	0	18
III	gal ⁺	0	0
	gal	0	18*
IV	pyro ⁺	0	9
	pyro	0	9
V	fac ⁺	0	4
	fac	0	14
VI	s ⁺	0	0
	s	0	18*
VII	nic ⁺	0	7
	nic	0	11
VIII	ribo ⁺	0	11
	ribo	0	7

Associação dos marcadores dos grupos de ligação III e VI.

Os resultados da análise mitótica dos diplóides mostram um grande número de alterações nos diversos grupos de ligação. Na Tabela XVI encontram-se os grupos de ligação que não apresentam segregação normal dos marcadores genéticos. A ausência de marcadores genéticos de um determinado grupo de ligação entre os segregantes mitóticos é relacionada com a existência de letais. As mutações responsáveis pelo caráter morfológico estão tentativamente localizadas nos grupos de ligação, sendo representadas por letras minúsculas da respectiva linhagem.

As alterações na segregação de marcadores genéticos da linhagem testadora (MSE) não foram consideradas.

Tabela XVI: Sumário da análise mitótica dos diplóides. Tipos de alterações e seus respectivos grupos de ligação nas linhagens analisadas.

Linhagem	Determinante de deterioração	Associação	Letal
N ₁		IV-VIII	
N ₂		I-II	VII
V33	VIII		
V34	VIII		
V3.4	II		
V5.3	VI ou VII		VII ou VI
V8.2	VII	III-VI	
V8.3	I ou VII		VII ou I
V9.6	VII		
V9.7	III e VI		

Todas as linhagens de V33 à V9.7 não apresentaram segregação do marcador genético (w) do grupo de ligação II.

4.4.2. Análise meiótica.

A análise meiótica foi utilizada com duas finalidades principais: verificar o tipo de segregação do novo caráter das linhagens selecionadas e obter a distância relativa da mutação em relação a um marcador genético conhecido.

Os resultados da análise de segregação meiótica, obtidos de acordo com o item 3.10.3., encontram-se na Tabela XVII.

Tabela XVII: Resultados de segregação meiótica.

Cruzamento	Segregantes		Total	Proporção esperada	χ^2
	Normais	Deteriorados			
N ₁ x MSE	237	118	355	2:1	0,001 n.s
N ₂ x MSE	65	62	127	1:1	0,071 n.s
V33 x MSE	53	61	114	1:1	0,561 n.s
V34 x MSE	143	179	322	1:1	4,025*
V3.4 x MSE	87	100	187	1:1	0,904 n.s
V5.3 x MSE	57	58	115	1:1	0,008 n.s.
V8.2 x MSE	97	50	147	2:1	0,031 n.s.
V8.3 x MSE	104	97	201	1:1	0,244 n.s.
V9.6 x MSE	101	83	184	1:1	0,880 n.s.
V9.7 x MSE	110	193	303	1:2	1,203 n.s.

n.s. = não significativo.

significativo ao nível de 5% de probabilidade.

O valor de recombinação da mutação sob análise, em relação a um marcador conhecido, foi calculado após o conhecimento dos resultados de análise mitótica. Desta forma, foram testados apenas os marcadores genéticos situados no grupo de ligação em que foi detectada a mutação. O reconhecimento dos recombinantes pode ser baseado num tipo de esquema como o da Figura 5, utilizando-se por exemplo o marcador nic8, que requer adição de ácido nicotínico ao meio de cultura e v, que determina um caráter morfológico qualquer.

		<u>Ascosporos</u>	<u>Fenótipo</u>
$\frac{\text{nic8} \quad +}{\text{-----}}$ \cdot \cdot \cdot $\frac{+ \quad \cdot \quad v}{\text{-----}}$	P	$\frac{\text{nic8} \quad +}{\text{-----}}$	Normal; requer ácido nicotínico.
		$\frac{+ \quad v}{\text{-----}}$	Deteriorado; não requer ácido nicotínico.
	R	$\frac{\text{nic8} \quad v}{\text{-----}}$	Deteriorado; requer ácido nicotínico.
		$\frac{+ \quad +}{\text{-----}}$	Normal; não requer ácido nicotínico.

Figura 5: Esquema do reconhecimento fenotípico dos recombinantes meióticos. P = parentais; R = recombinantes.

O valor de recombinação (c) é dado por:

$$c = \frac{\text{número de recombinantes}}{\text{número total de ascosporos}}$$

O desvio padrão (s) é calculado pela fórmula:

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

p = frequência de recombinantes

N = número total de ascosporos

Tabela XVIII: Fenótipos e frequências observadas de colônias obtidas do cruzamento V34 x MSE.

Aspecto	Prototrofia para riboflavina	Frequência observada
Normal	+	5
Deteriorado	+	8
Normal	-	51
Deteriorado	-	14
T o t a l		78

$$\text{Valor de } c = \frac{19}{78} = 0,2436 \text{ ou } 24,36\%$$

$$s = 4,29$$

Tabela XIX: Fenótipos e frequências observadas de colônias obtidas do cruzamento V9.7 x MSE.

Aspecto	Prototrofia para tiosulfato de sódio	Frequência observada
Normal	+	34
Deteriorado	+	18
Normal	-	44
Deteriorado	-	2
T o t a l		98

$$\text{Valor de } c = 0,3652 \text{ ou } 36,53\%$$

$$s = 4,81$$

Os valores de recombinação das linhas restantes não puderam ser obtidos devido principalmente ao desenvolvimento anormal dos segregantes meióticos em placas de análise, o que impossibilitou uma leitura correta. Os fatores que afetaram a germinação normal de tais conídios não foram analisados.

4.4.3. Cruzamento de morfológico x morfológico.

Com a finalidade de localizar com maior precisão as mutações que conferem o caráter morfológico, as linhagens obtidas foram cruzadas com outras que possuem o determinante morfológico no mesmo grupo de ligação. Na Tabela XX estão indicados os cruzamentos efetuados e o grupo de ligação envolvido.

Tabela XX: Cruzamentos de morfológico x morfológico.

<u>Cruzamentos</u>	<u>Grupo de ligação envolvido</u>
V8.2 x V10	VII
V9.6 x V10	VII
V9.7 x V9	III

A linhagem V9.7 apresenta também o grupo de ligação VI associado ao caráter morfológico mas, devido à dificuldade de se obter uma linhagem com determinante morfológico neste grupo de ligação, tal cruzamento não foi efetuado. Os demais cruzamentos das linhagens indicadas na Tabela XX e das restantes não foram incluídos devido principalmente à esterilidade dos cruzamentos.

O valor de recombinação da mutação em relação ao determinante de deterioração foi calculado de acordo com o descrito no item 4.4.2.

Das quatro classes fenotípicas, três podem ser reconhecidas facilmente, apresentando o duplo morfológico uma morfologia que pode ser confundida com a de um morfológico

co simples. Desta forma, a frequência desta classe recombinante foi considerada igual à do recombinante que apresenta morfologia normal, assumindo-se que os recombinantes recíprocos devem ocorrer com igual frequência.

Os resultados obtidos dos cruzamentos são apresentados na Tabela XXI.

Tabela XXI: Resultados do cruzamento morfológico x morfológico.

<u>Cruzamentos</u>	<u>Parentais</u>	<u>Recombinantes</u>	<u>Total</u>	<u>Valor de recombinação</u>	<u>Desvio padrão</u>
V8.2 x V10	71	100	171	58,48	3,74
V9.6 x V10	158	192	350	54,86	2,65
V9.7 x V9	81	94	175	53,71	3,74

Os valores de recombinação encontrados estão ao redor de 50%, o que indica a não ligação entre os marcadores morfológicos.

5. Discussão.

5.1. Mutagênicos.

5.1.1. Acriflavina.

Pelos dados da Tabela I, pode-se notar que a concentração ótima para produzir 10% de sobrevivência mantém-se ao redor de 10 mcg/ml. Resultados semelhantes foram obtidos por Ball e Roper (1966) para obtenção de variantes morfológicas.

Diversos casos de instabilidade estudados relacionam a ocorrência de elementos genéticos estranhos ao genoma com os processos de instabilidade e estes elementos teriam comportamento semelhante a episossomos (Green, 1969; Peterson, 1970) e sabe-se também que inserção de DNA exógeno produz mutações em Escherichia coli (Taylor, 1963; Shapiro, 1969; Shimada e col., 1973) e Drosophila (Gershenson, 1965). Em Aspergillus nidulans, Azevedo (1971a) também associa os processos de instabilidade com ocorrência de DNA exógeno. Desde que acriflavina é um mutagênico que induz a eliminação de elementos extracromossômicos (Hirota e Iijima, 1957), há possibilidades de ser igualmente eficiente na produção de colônias melhoradas por eliminação de material genético extra das linhagens deterioradas. Para que tal fenômeno ocorra é necessária a presença de elemento genético extracromossômico e na forma livre, pois sabe-se que linhagens Hfr e profagos de bactérias lisogênicas não são susceptíveis à eliminação por corantes de acridina (Hirota, 1960; Bertani, 1957).

Pelos dados da Tabela III observa-se que, de forma geral, não há aumento considerável na produção de variantes melhorados em relação aos demais tipos. Apenas a linhagem A mostra uma porcentagem efetivamente maior de variantes melhorados. A origem de setores melhorados a partir da linhagem duplicada é explicada por Nga e Roper (1968) por perda total ou parcial do segmento em duplicata, produzindo principalmente colônias de conídios amarelos por perda do marcador y^+ situado no segmento duplicado. As perdas são na maioria dos casos intersticiais, sugerindo a possível ocorrência de um processo intracromossômico durante o período de divisão celular. No geral, a por

centagem de variantes deteriorados obtidos é maior que a de melhorados. Na realidade, as diferenças podem ainda ser maiores, pois a porcentagem de deteriorados constitui uma sub-estimativa. Isto ocorre devido a sua reduzida taxa de crescimento em competição com os melhorados. Por outro lado, a análise genética de V3.4, resultante do tratamento com acriflavina, apresenta o determinante genético da deterioração condicionando uma acentuada deterioração no fenótipo e instabilidade em alto grau. Efetivamente, a ação da acriflavina mostrou-se negativa no presente trabalho, quanto à possível eliminação de material genético extra. McClintock (1965) também relata os resultados negativos com uso de acriflavina em linhagem com o elemento transponível Ac.

Na coluna "diversos" da Tabela III, nota-se ainda uma alta porcentagem de variantes derivados de V8. Estes derivados são exclusivamente de um tipo semelhante ao disômico para o grupo de ligação III, cujo fenótipo foi descrito por Upshall (1971) e Käfer e Upshall (1973). A ocorrência de aneuplóides com uso de acridinas é também registrada por Ball e Roper (1966), que atribuem a origem desses aneuplóides principalmente a distúrbios na replicação dos cromossomos, à semelhança do que ocorre com a replicação dos fatores F em Escherichia coli (Stouthamer e col., 1963).

Com relação à curva de sobrevivência (Figura 3), observa-se que a linhagem haplóide apresenta um decréscimo na porcentagem de sobrevivência com o aumento da concentração de acriflavina numa relação linear. Isto não ocorre nas demais linhagens que apresentam um nível de resistência maior, principalmente entre 20 a 40 mcg/ml. D'Arce (1972) utilizou linhagens dissômicas, haplóides e diplóides e verificou que alguns dissômicos possuíam resistência intermediária, entre linhagens haplóides e diplóides, à luz ultra-violeta. No presente caso, a maior resistência das linhagens pode ser atribuída à existência de segmentos em duplicata.

5.1.2. Etil-metano-sulfonato.

Os dados da Tabela II mostram que o tempo de tratamento ótimo para produzir 10% de sobrevivência com EMS a 1,33%, situa-se entre 5 e 6 horas de tratamento.

O etil-metano-sulfonato é reconhecida - mente um eficiente mutagênico em fungos (Malling e Serres, 1968; Duarte, 1971). Tem sido frequentemente usado em Neurospora crassa e seu mecanismo de ação ao nível molecular é produzir transições, transversões e deleções de bases nitrogenadas! Em Aspergillus nidulans mostrou-se um mutagênico eficiente na produção de derivados morfológicos, como se observa pelos dados da Tabela IV. Todos os tipos de derivados aparecem com uma porcentagem maior do que aqueles resultantes do tratamento com acriflavina. Os variantes deteriorados surgem com maior frequência e isto se deve principalmente à linhagem V8, que produz cerca de 57% do total. É interessante notar que a linhagem V8 produz, espontaneamente, derivados de um tipo exclusivo, possivelmente dissômico, mostrando uma nítida segregação preferencial (Azevedo e Roper, 1970). Com o uso de EMS houve produção de uma grande variabilidade nesta linhagem surgindo diversos tipos de derivados, com visível redução na porcentagem dos dissômicos.

Os derivados obtidos e selecionados para análise genética são em geral instáveis, excetos os derivados da linhagem N (Tabela V). Estes foram selecionados apenas por apresentarem morfologia distinta da linhagem original. O derivado V8.3 também não apresenta produção de setores e seu fenótipo é relativamente melhorado comparando-se com as demais linhagens.

A análise genética dos derivados morfológicos não nos oferece indicações precisas das alterações provocadas especificamente pelo mutagênico, pois espontaneamente as linhagens deterioradas originais sofrem variações em alta frequência. Entretanto, a ação da acriflavina e principalmente de EMS deve ser efetiva, desde que ocorrem alterações em diversos grupos de ligação numa mesma linhagem. É improvável que estas alterações possam ser exclusivamente espontâneas, atribuindo-se uma parte à ação do mutagênico.

A análise genética dos derivados analisados apresenta indicações de translocação não recíproca em duas linhagens. Com certa segurança podemos dizer que na linhagem N1, a quebra se deve à ação de EMS uma vez que é derivada de uma linhagem haplóide e estável. Entretanto, no caso da linhagem V8.2

a situação é diferente, pois as linhagens deterioradas podem sofrer quebras espontâneas (Azevedo e Roper, 1970).

Entre as dez novas linhagens selecionadas para análise apenas uma é proveniente do tratamento com acri flavina. O tratamento com este mutagênico produz diversos tipos de derivados, entretanto apresenta na maioria dos casos morfologia anormal, com tipos miceliais e cleistotécios em grande quantidade. Durante transferências sucessivas muitos derivados revertem ao tipo original. O mecanismo de fotoreativação descrito por Hanawalt e Haynes (1967) em Escherichia coli pode ser o responsável, uma vez que o tratamento se procedeu à obscuridade, para facilitar as manipulações. Alexander e col. (1972) sugerem que o fenótipo resultante da ação da acriflavina em Chlamydomo- reinhardi é apenas uma modificação fenotípica transitória. Ball e Roper (1966) também registram o aparecimento de colônias anormais e instáveis entre os derivados de tratamento com acridinas.

Os derivados resultantes do tratamento com EMS já não apresentaram estes problemas e puderam ser mantidos com relativa facilidade, razão pela qual a maioria dos derivados foi selecionada deste tratamento.

As linhagens N_1 e N_2 são derivadas da linhagem haplóide normal e suas características morfológicas não se enquadram nos aspectos gerais das linhagens deterioradas.

A linhagem N_1 é de coloração púrpura clara, conidiação escassa mas não apresenta evidências de instabilidade. A análise mitótica revelou a existência de ligação entre os marcadores dos grupos de ligação IV e VIII. Os segregantes de morfologia normal eram todos pyro ribo e os morfológicos pyro+ ribo+. Tal resultado pode ser atribuído a uma translocação não recíproca envolvendo os dois grupos de ligação mencionados, desconhecendo-se o sentido dessa translocação. Os dados de segregação meiótica (Tabela XVII) reforçam tal suposição, resultando a proporção de 2 normais: 1 deteriorado, havendo uma classe inviável que deve corresponder àquela com deficiência. O ponto de quebra da translocação não recíproca deve estar relacionado com o aparecimento do caráter morfológico.

A ocorrência de translocação não recíproca associada a alteração morfológica já foi descrita por outros autores, em Aspergillus nidulans. Ball (1967) descreveu reversão de linhagens meth (requisito nutricional para metionina) para meth+, sendo o ponto de quebra da translocação não recíproca associado à variação. Clutterbuck (1970) também registrou uma situação onde o ponto de quebra de uma translocação não recíproca foi associado à variação. Tal resultado foi atribuído ao efeito de posição, onde a extremidade eucromática do grupo de ligação VIII foi inserida na extremidade heterocromática do grupo de ligação III. Azevedo e Roper (1970) analisaram duas linhagens com deleções terminais e atribuíram às quebras a causa da modificação morfológica.

A linhagem N_2 apresenta segregação meiótica de 1 normal: 1 morfológico, indicando que a mutação responsável pelo caráter se comporta como um gene mendeliano simples. Por outro lado a análise mitótica relaciona dois grupos de ligação (I e II) com o caráter morfológico. Análises genéticas mais detalhadas como a micromanipulação de ascosporos poderia fornecer subsídios para determinar as alterações ocorridas. Um determinante letal foi localizado no grupo de ligação VII.

5.3. Linhagens deterioradas.

Exceto para os dois derivados morfológicos citados no ítem anterior, as demais linhagens se enquadram dentro das características gerais de deterioração.

Observa-se pelos resultados que há uma complexidade muito grande envolvendo as linhagens deterioradas e muitos aspectos deverão ser analisados num estágio posterior, para melhor elucidação dos fenômenos que atuam nos processos de instabilidade. A localização precisa dos determinantes que conferem o caráter morfológico não pôde ser estabelecida, sendo apenas revelada a sua associação com determinados grupos de ligação, através da análise mitótica. Em geral, as mutações originais determinadas por Azevedo e Roper (1970) e Azevedo (1971a) foram suprimidas.

A supressão da mutação original pode ser explicada por três mecanismos principais: mutação supressora em alguma região do genoma que impediria a expressão da mutação v

e neste caso uma nova mutação seria responsável pelo caráter morfológico; transposição da mutação original para outra região do genoma condicionando o novo caráter, e finalmente, deleção da mutação v. Qualquer dessas três suposições possuem apoio em outros exemplos. Assim, a ocorrência de supressores é relativamente comum para mutações envolvendo requisitos nutricionais em microrganismos. Supressão de caracteres morfológicos é encontrada em organismos superiores como Drosophila melanogaster (Rizki e col., 1970) e cevada (Jain, 1966). Casos de deleção de segmentos cromossômicos ou mesmo de cromossomos inteiros relacionados com diferenciação e sem alteração na viabilidade também são encontrados. Em Ascaris megalocephala há perda de extremidades heterocromáticas na linhagem somática (citado por Basile, 1971); Cyclops furcifer apresenta um caso semelhante, sendo que as perdas podem ser intersticiais sem quebras cromossômicas (Beermann, 1966) e casos de eliminação de cromossomos foram encontrados em Sciara (Crouse, 1960). Finalmente, quanto à transposição de elementos genéticos diversos casos são também citados (McClintock, 1965; Dawson e Smith-Keary, 1963; Green, 1969).

A supressão de caracteres nestes casos é de análise ainda um pouco prematura, mas algumas considerações podem ser feitas com relação às três suposições apresentadas.

A existência de genes supressores impedindo a expressão das mutações originais pode ser verificada através da recombinação e segregação, levando à formação de revertentes para o caráter morfológico. A frequência destes revertentes seria proporcional a distância genética entre o supressor e a mutação v original. Entretanto, a existência de genes supressores é de possibilidade remota, uma vez que os revertentes não surgem entre os recombinantes meióticos ou mitóticos. Se genes supressores estiverem realmente presentes, resta a possibilidade de estarem estreitamente ligados a mutação v e portanto, com possibilidade mínima de serem detectados.

A ocorrência de deleções em linhagens haplóides normalmente confere-lhes inviabilidade. Entretanto, nas linhagens deterioradas presume-se a existência de duplicações em tandem como as responsáveis pelas características de deterioração (Nga e Roper, 1968). Aceitando-se esta idéia, a deleção da mutação v, que corresponde as duplicações em tandem, não levaria

à inviabilidade da linhagem, mas retorno ao fenótipo melhorado. As linhagens analisadas não apresentam indícios de tais deleções pois as características de deterioração se mantêm.

O mecanismo de transposição é uma alternativa mais atraente, pois este fenômeno explica a supressão da mutação original simultaneamente com o aparecimento do novo fenótipo. Os dados da análise mitótica mostram que os determinantes de deterioração das linhagens analisadas estão, na maioria dos casos, situados em grupos de ligação diferentes das linhagens originais. Isto sugere, de forma indireta, a possível ocorrência de transposições, que é a idéia básica sugerida por Azevedo e Roper (1970) para explicar a instabilidade mitótica em Aspergillus nidulans. O mecanismo da transposição não é bem esclarecido em Aspergillus nidulans, mas há outros casos precedentes onde foram analisados maiores detalhes.

McClintock (1951) relaciona os processos de transposição de elementos genéticos com mecanismos de aberrações cromossômicas, principalmente do tipo quebra-fusão-ponte. A instabilidade se origina como consequência da modificação na organização do material que é transposto de uma locação para outra no complemento cromossômico. Os elementos seriam de natureza heterocromática, de origem desconhecida, e controlariam mecanismos específicos de ação gênica. Burns e Gerstel (1967) apresentam evidências citológicas bastante elucidativas da instabilidade de um bloco heterocromático relacionada com variação nas flores de Nicotiana. Em Aspergillus nidulans, estudos de natureza citogenética são de especial interesse para estudos de instabilidade mas não têm sido devidamente explorados, devido principalmente ao pequeno tamanho dos cromossomos (Elliot, 1960; Robinow e Caten, 1969). Entretanto, novas técnicas para detecção de regiões heterocromáticas têm sido descritas (Arrighi e Hsu, 1971) e a adaptação de técnicas deste tipo poderia nos fornecer algumas informações sobre os componentes cromossômicos de natureza eucromática e heterocromática em Aspergillus nidulans.

As linhagens V5.3, V8.2 e V9.6 apresentam evidências de que os determinantes de deterioração originais foram suprimidos enquanto V3.4 e V9.7 apresentam indicações de que os grupos de ligação originalmente envolvidos continuam

associados ao aparecimento do novo caráter morfológico.

Os resultados de segregação meiótica (Tabela XVII) mostram que, na maioria dos casos analisados, o fator responsável pelo caráter morfológico é transmitido como uma unidade do tipo mendeliana. A análise mitótica revela, por outro lado, uma complexidade muito grande, envolvendo alterações em diversos grupos de ligação (Tabela XVI). O grupo de ligação II das linhagens duplicadas nunca surge entre os segregantes mitóticos, devido possivelmente à seleção contrária em meio com pFA, pois possui o segmento duplicado neste grupo de ligação.

Além das alterações citadas, outros detalhes referentes à Tabela XVI serão descritos isoladamente para cada linhagem.

Os derivados da linhagem A, V33 e V34, apresentam o determinante genético da deterioração situado no grupo de ligação VIII e os demais grupos de ligação segregam normalmente. Estes dois casos se assemelham à linhagem V5 obtida por Azevedo e Roper (1970), que possui o determinante genético v5 no grupo de ligação VIII. O cruzamento entre essas linhagens, que possuem o mesmo grupo de ligação envolvido com o caráter deteriorado, poderia nos indicar se existe algum alelismo entre os determinantes genéticos v33, v34 e v5.

A linhagem V3.4 apresenta segregação de todos os marcadores genéticos, exceto para aquele do grupo de ligação II (w) e por exclusão, foi localizado neste grupo. A linhagem original V3 também apresenta o determinante de deterioração no grupo de ligação II e portanto, pode ser alelo de v3.4. O cruzamento de V3 x V3.4 poderia nos fornecer indicações sobre o alelismo existente entre v3 e v3.4. Um determinante letal foi localizado no grupo de ligação V.

A segregação meiótica de V5.3 é de 1 normal : 1 deteriorado e na análise mitótica dos setores normais há ausência de dois grupos de ligação: VI e VII. Portanto, um desses grupos de ligação deve estar relacionado com a presença de um letal. A localização precisa do determinante de deterioração e do letal não pôde ser efetuada porque setores deteriorados não foram analisados.

A linhagem V8.2 apresenta segregação de 2 normais: 1 deteriorado e tal resultado pode ser atribuído a

uma translocação não recíproca à semelhança do que foi descrito para N_1 . Entretanto, na linhagem V8.2 a alteração morfológica não está relacionada com tal translocação, uma vez que os segregantes normais são gal+ s+ e gal s. A situação é análoga àquela descrita por Käfer (1965) e Nga (1968), que analisaram diversas translocações e não registraram nenhuma alteração morfológica proveniente de quebras cromossômicas.

A linhagem V8.3 apresenta alterações em dois grupos de ligação: I e VII. Como não foram obtidos segregantes mitóticos deteriorados não se pôde determinar precisamente em qual dos dois grupos de ligação se encontra o determinante genético v8.3. Como a segregação meiótica é de 1 normal : 1 deteriorado, um dos grupos de ligação deve estar relacionado com a presença de um letal.

A análise mitótica de V9.6 revela o determinante genético de deterioração localizado no grupo de ligação VII. Esta linhagem apresenta características de instabilidade de interessantes e que poderiam ser analisadas posteriormente. Possui morfologia "crinkled" durante o período inicial de crescimento mas esta característica se perde após 48-72 horas de crescimento em algumas colônias, enquanto em algumas ela se mantém até atingir os bordos da placa. A morfologia "crinkled" se deve à existência de segmento em duplicata (Bainbridge e Roper, 1966) e a perda deste segmento ocorre provavelmente por um processo intracromossômico (Nga e Roper, 1969). Azevedo (1973) sugere que a perda dos segmentos pode estar sob controle de fatores de estabilidade que possivelmente controlam a recombinação genética.

Finalmente, a linhagem V9.7 apresenta dois determinantes genéticos relacionados com a morfologia, estando um deles, v9.7.1, localizado no grupo de ligação III e v.9.7.2 no VI. Como a segregação meiótica fornece a proporção de 2 deteriorados : 1 normal, possivelmente uma das classes deterioradas é inviável. A linhagem original V9 possui o determinante de deterioração v9 no grupo de ligação III mas não é alelo de v9.7.1, pois o cruzamento V9.7 x V9 produz recombinantes de morfologia normal.

Os cruzamentos efetuados a fim de se obterem dados de ligação com outros determinantes de deterioração

conhecidos, dão indicações de não ligação entre os determinantes. Faz-se necessária a síntese de linhagens com marcadores genéticos apropriados no grupo de ligação interessado, para obtenção de um mapeamento mais preciso. Tal mapeamento é de interesse prático para os estudos genéticos de Aspergillus nidulans, pois os mutantes morfológicos podem ser utilizados com vantagens em cruzamentos, dispensando as placas de análise para caracterização dos descendentes.

5.4. Letais.

O aparecimento de um grande número de letais nas linhagens deterioradas é um fenômeno interessante e merece estudos mais detalhados.

É conhecido que mutagênicos do tipo etil-metano-sulfonato induzem formação de letais em diversos organismos (Partington, 1963; Ehling e col., 1968; Mukai, 1970). Entretanto, nos casos aqui analisados, a letalidade não pode ser atribuída à ação do mutagênico, pois ela seria eliminada no estágio haplóide. Devem portanto, ter-se originado durante o período de formação do heterocário ou no estágio diplóide.

A formação de letais nas linhagens deterioradas tem sido frequentemente encontrada por Azevedo e Roper (1970) e Azevedo (1971a), que analisaram diversos casos. A análise da linhagem V5 e derivados, por exemplo, mostrou evidência de letais no grupo de ligação III ou V ou em ambos. Azevedo (1971b) analisou estes casos com maiores detalhes e propôs a existência de elementos transponíveis nestas linhagens. Estes elementos possuíam afinidades por certos grupos de ligação, podendo, em alguns casos, causar letalidade ou condicionar um requerimento nutricional. Gerhenson (1965) registrou também caso semelhante em Drosophila melanogaster, onde mutações letais foram atribuídas a moléculas de DNA exógeno que interferiam com regiões definidas do cromossomo.

Os letais encontrados nas diversas linhagens não foram especificamente relacionados com os grupos de ligação na maioria dos casos. O derivado N₂ apresenta um letal no grupo de ligação VII. V3.4 apresenta um letal no grupo de ligação V, enquanto a linhagem original V3 o apresentava no grupo de ligação IV. A análise mitótica de V5.3 revela a ausência de

segregação de marcadores pertencentes a três grupos de ligação; uma vez que o caráter morfológico se comporta como um gene mendeliano simples, dois grupos de ligação podem estar envolvidos com a formação de letais. A maior parte dos casos analisados não apresentam segregantes haplóides amarelos; possivelmente existe um letal no grupo de ligação II ou apenas este grupo de ligação é seletivamente eliminado em meio com p-fluorfenilalanina, já que possui um segmento duplicado. A linhagem MSE também apresenta dois determinantes letais em cruzamentos com as linhagens V34 e V8.3. Possivelmente esses letais foram formados por processos induzidos por elementos genéticos das linhagens deterioradas, já que a linhagem MSE é normal.

Uma análise mais detalhada destes letais pode ser efetuada através dos seus derivados. Se a sua formação é atribuída a elementos genéticos estranhos ao genoma, deve existir regiões de particular susceptibilidade à integração desses elementos. Dentro de uma determinada linhagem, os derivados devem apresentar uma certa coincidência quanto à localização desses letais, como encontrado por Azevedo (1971b).

Além dos fatores genéticos que atuam nos processos de instabilidade, sabe-se que fatores ambientais também se encontram associados. Mudanças de temperatura provocam alterações na frequência de mutações, sendo inversamente relacionadas (Demerec, 1935; Beale e Fabergé, 1942; Harrison e Fincham, 1964). Estudos dessa natureza já foram iniciados em Aspergillus nidulans (Lieber, 1973) e possivelmente trarão novos conhecimentos para melhor compreensão dos fenômenos de instabilidade.

6. Resumo e conclusões.

Os objetivos do presente trabalho, utilizando-se diversas linhagens de Aspergillus nidulans, podem ser resumidos nos seguintes itens:

- a. Obter derivados de fenótipo melhorado através da possível eliminação de material genético extra das linhagens deterioradas, com o uso de acriflavina.
- b. Induzir um padrão de instabilidade em diversas linhagens, com o uso de etil-metano-sulfonato.
- c. Analisar geneticamente os derivados morfológicos obtidos.

Quatro linhagens deterioradas (V3, V5, V8 e V9), uma linhagem duplicada (A) e uma linhagem haplóide (N) foram tratadas com os dois mutagênicos químicos, numa dose suficiente para produzir 10% de sobrevivência. Foram selecionados dez derivados morfológicos, sendo um proveniente do tratamento com acriflavina e o restante com EMS.

Os derivados morfológicos foram analisados geneticamente através das técnicas descritas por Pontecorvo e col. (1953), Roper (1952) e Morpurgo (1961).

Dos resultados obtidos, as seguintes conclusões gerais podem ser mencionadas:

1. A acriflavina revelou-se um mutagênico de ação bastante complexa, produzindo diversos tipos de derivados; contudo, não se mostrou eficiente na produção de derivados de fenótipo melhorado.
2. A linhagem V3.4, resultante do tratamento com acriflavina, apresentou o determinante de deterioração situado no grupo de ligação II, à semelhança da linhagem original V3, sendo transmitida como uma unidade mendeliana simples.
3. O etil-metano-sulfonato revelou-se um mutagênico eficiente na indução de instabilidade em linhagens com duplicação cromossômica, indicando o papel positivo das duplicações na origem da instabilidade.

4. Os derivados da linhagem normal não apresentaram características de instabilidade; na linhagem N_1 foi detectada a existência de uma translocação não recíproca associada à alteração morfológica e na linhagem N_2 há dois grupos de ligação envolvidos com o caráter morfológico.
5. Os derivados da linhagem A, V33 e V34, apresentaram instabilidade e ambos possuem o determinante de deterioração no grupo de ligação VIII.
6. Os derivados das linhagens deterioradas apresentaram, na maioria dos casos, supressão das mutações originais e os determinantes de deterioração mostraram uma locação diferente das linhagens originais. Estes determinantes possuem comportamento de um gene simples, exceto em dois casos, V8.2 e V9.7. O primeiro envolve uma provável translocação não recíproca (III-VI) e o segundo apresenta morfologia resultante da interação de dois determinantes de deterioração situados nos grupos de ligação III e VI.
7. A supressão das características morfológicas originais pode ser explicada pela transposição dos determinantes genéticos (ν) para outras regiões do genoma, causando o aparecimento de novas características.
8. Através da análise mitótica, foram encontrados determinantes letais em diversas linhagens. Sua origem possivelmente deve-se à presença de material genético extra no genoma.
9. Finalmente, podemos concluir dizendo que os processos de instabilidade mitótica em Aspergillus nidulans, são de natureza complexa e a análise genética clássica não nos oferece maiores esclarecimentos. Novas técnicas e novos métodos deverão ser desenvolvidos para explicar definitivamente esse fenômeno de instabilidade, que é conhecido em outros organismos e que possivelmente têm uma explicação comum.

7. Summary.

The purpose of the present research, using various strains of Aspergillus nidulans, can be summarized as follows:

- a) the attainment of fenotypic improved derivatives, through the possible elimination with acriflavine of extra-genetic material of the deteriorate strains.
- b) the induction of a pattern of instability in various strains with ethyl-methane-sulfonate (EMS).
- c) the genetic analysis of the morphologic isolates obtained.

Four deteriorated strains (V3, V5, V8 and V9), one duplicated strain (A) and one haploid strain (N) were treated with EMS and acriflavine to produce about 10% of survival. Ten morphologically deteriorated isolates were selected: one was obtained after treatment with acriflavine and the others after treatment with EMS.

It was observed that acriflavine had a very complex actuation in Aspergillus nidulans; it produced derivatives of various types, however was not efficient to produce improved derivatives. The isolated V3.4, like the strain V3, showed the mutation for morphological alteration located in the linkage group II and it was transmitted as a single mendelian unit.

The EMS showed to be a efficient mutagenic agent to produce morphologic derivatives through induction of instability in duplicated strains. The isolates of deteriorated strains showed supression of the original mutations and the location of the deterioration determinants were in different location than in the original strain. The supression of the original mutations can be explained as the transposition of the deterioration determinants to another region of the genome. This determinants behave as a single gene except in two cases: V8.2 and V9.7. The first one possibly has one non-reciprocal translocation and the second has the interaction of two mutations that were located in different linkage groups. The normal strain gave complex derivatives too, wich showed association of genetic markers in different linkage groups.

8. Literatura citada.

- ALEXANDER, N.J., GILHAM, N.W. & BOYNTON, J.E. (1972). Effects of acriflavine on Chlamydomonas reinhardi. Genetics, 71:1-2.
- APIRION, D. (1962). A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in microorganisms. Nature, London, 192: 959-961.
- ARRIGHI, F.E. & HSU, T.C. (1971). Localization of heterochromatin in human chromosome. Cytogenetics, 10: 81-86.
- AZEVEDO, J.L. (1971a). Mitotic non-conformity in Aspergillus. Ph.D. Thesis, University of Sheffield, England. 240 pp.
- AZEVEDO, J.L. (1971b). Não conformidade mitótica em Aspergillus nidulans. Setor deteriorado V5 e seus derivados. Relatório científico do Departamento e Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", nº 5: 12-22.
- AZEVEDO, J.L. (1973). Instability at mitosis in Aspergillus nidulans: sucessive and transposable genetic changes. Genetical Research, Cambridge, 16: 79-93.
- AZEVEDO, J.L. & ROPER, J.A. (1970). Mitotic non-conformity in Aspergillus nidulans: sucessive and transposable genetic changes. Genetical Research, Cambridge, 16: 19-93
- BAINBRIDGE, B.W. & ROPER, J.A. (1966). Observations on the effects of a chromosome duplication in Aspergillus nidulans. Journal of General Microbiology, 42: 417-424.
- BALL, C. (1967). Chromosome instability related to gene suppression in Aspergillus nidulans by acridines. Genetical Research, Cambridge, 7: 207-221.

- BARACHO, I.R., VENCOVSKY, R. & AZEVEDO, J.L. (1970). Correlation between size and hibrid or selfed state of the cleistothecia in Aspergillus nidulans. Transactions of the British Mycological Society, 54: 109-116.
- BARCLAY, P.C. & BRINK, R.A. (1954). The relation between modulator and activator in maize. Proceedings of the National Academy of Science. U.S.A., 40: 118-1126.
- BARNETT, W.E. & SERRES, F.J. (1963). Fixed genetic instability in Neurospora crassa. Genetics, 48: 717-723.
- BASILE, R. & GUIMARÃES, R.C. (1972). Aspectos biológicos e bioquímicos da diferenciação celular. Ciência e Cultura, 24: 1105-1149.
- BEERMANN, S. (1966). A quantitative study of chromatin diminution in embryonic mitosis of Cyclops furcifer. Genetics, 54: 567-576.
- BERTANI, L.E. (1957). The effect of the inhibition of protein synthesis on the establishment of lysogeny. Virology, 4: 53-71.
- BRINK, R.A. (1956). A genetic change associated with the R locus in maize wich is directed and potentially reversible. Genetics, 41: 872-889.
- BRINK, R.A. (1960). Paramutation and chromosome organization. Quarterly Review of Biology, 35: 120-137.
- BRINK, R.A. & NILAN, R.A. (1952). The relation between light variegated and medium variegated pericarp in maize. Genetics, 37: 519-544.
- BURNS, J.A. & GERSTEL, D.V. (1967). Flower colour variegation and instability of a block of heterocromatin in Nicotiana. Genetics, 57: 155-167.

- CATTANACH, B.M., ROLLARD, C.E. & ISAACSON, J.H. (1968). Ethyl methane sulfonate induced chromosome breakage in the mouse. Mutation Research, 6: 297-307.
- CLUTTERBUCK, A.J. (1970). A variegated position effect in Aspergillus nidulans. Genetical Research Cambridge, 16: 303-316.
- COE Jr., E.H. (1959). A regular and continuing conversion type phenomenon at the B locus in maize. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A., 45: 828-832.
- COE Jr., E.H. (1961). A test for somatic mutation in the origin of conversion type inheritance at the B locus in maize. Genetics, 46: 707-710.
- COX, E.C., DEGENEN, G.E. & SCHEPPE, M.L. (1972). Mutator gene studies in Escherichia coli: the mut S gene. Genetics, 72: 551-567.
- CROUSE, H.L. (1960). The controlling element in sex chromosome behavior in Sciara. Genetics, 45: 1429-1443.
- D'Arce, M.M.D.C. (1972). Contribuição ao estudo das aberrações cromossômicas numéricas em Aspergillus nidulans. Tese de mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Brasil, 50 pp.
- DAWSON, G.W.P. (1955). The inheritance of variegated flower colour in Delphinium ajacis. Heredity, 9: 409-412.
- DAWSON, G.W.P. & SMITH-KEARY, P.F. (1963). Episomic control of mutation in Salmonella typhimurium. Heredity, 18: 1-20.
- DEMEREK, M. (1931). Behavior of two mutable genes in Delphinium ajacis. Journal of Genetics, 24: 179-193.

- DEMEREK, M. (1941). Unstable genes in Drosophila. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 9: 145-150.
- DORN, G.L. (1967). A revised map of the eight linkage group in Aspergillus nidulans. Genetics, 56: 619-631.
- DUARTE, F.M. (1968). Efeitos mutagênicos de alguns esteres de ácidos inorgânicos em Aspergillus nidulans. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Brasil, 73 pp.
- EHLING, U.H., CUMMINGS, R.B. & MALLING, H.V. (1968). Induction of dominant lethal mutation by alkylating agents in male mice. Mutation Research, 5: 417-428.
- ELLIOT, C.G. (1960). The cytology of Aspergillus nidulans. Genetical Research, Cambridge, 1: 462-476.
- EMERSON, R.A. (1914). The inheritance of somatic variation in variegated ear of maize. American Naturalist, 48: 87-115.
- FABERGÉ, A.C. & BEALE, G.H. (1942). An unstable gene in Portulaca: mutation rate at different temperatures. Journal of Genetics, 43: 173-188.
- FINCHAM, J.R.S. (1973). Localized instabilities in plants - a review and some speculations. Genetics Supplement, 73:195-205.
- FISHBEIN, L., FLANN, W.G. & FALK, H.L. (1970). Chemical mutagenes. Academic Press. New York and London, 364 pp.
- FORBES, E. (1959). Use of mitotic segregation for assigning genes to linkage groups in Aspergillus nidulans. Heredity, 13: 67-80.
- GERSHENSON, S. (1965). Induction of lethal mutations in Drosophila melanogaster by DNA. Genetical Research, Cambridge, 6: 157-162.
- GOLDSTEIN, A. & SMOOT, J.S. (1955). A strain of Escherichia coli with an unusually high rate of auxotrophic mutation. Journal of Bacteriology, 70: 588-595.

- GREEN, M.M. (1967). The genetics of a mutable gene at the white locus of Drosophila melanogaster. Genetics, 56: 467-482.
- GREEN, M.M. (1969). Controlling element mediated transposition of the white gene in Drosophila melanogaster. Genetics, 429-441.
- GREEN, M.M. (1970). The genetics of a mutator gene in Drosophila. Mutation Research, 10: 535-363.
- GREEN, M.M. (1973). Some observations and comments on mutable and mutator gene in Drosophila. Genetics Supplement, 73:187-194.
- GREENBLATT, J.M. (1966). Transposition and replication of modulator in maize. Genetics, 53: 361-369.
- GREENBLATT, J.M. (1968). The mechanism of modulator transposition in maize. Genetics, 58: 585-597.
- HANAWALT, P.C. & HAYNES, R.H. (1967). The repair of DNA. Scientific American, 216: 36-43.
- HARLAND, S.C. (1937). The genetics of cotton. Increase mutability of a gene in Gossypium purpurascens as a consequence of hybridization with Gossypium hirsutum. Journal of Genetics, 34: 153-168.
- HARRISON, B.J. & FINCHAM, J.R.S. (1964). Instability at the pal locus in Antirrhinum majus. Heredity, 19: 237-258.

- HIROTA, Y. (1960). The effect of acridine dyes on mating type factors in Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A., 46: 57-64.
- HIROTA, Y. & IIJIMA, T. (1957). Acriflavine as an effective agent for eliminating F-factor in Escherichia coli K-12. Nature, London, 180: 655-656.
- HOCHMAN, B. (1971). Analysis of chromosome 4 in Drosophila melanogaster. Ethyl methane sulfonate induced lethals. Genetics, 67: 235-252.
- IMAI, Y. (1936). Geno- and plasmotypes of variegated Pelargoniums. Journal of Genetics, 33: 169-195.
- IMAI, Y. & IINUMA, Y. (1938). Variation in the flaked lines of Lathyrus coloratus. Journal of Genetics, 35: 421-430.
- IMAI, Y. & TABUCHI, K. (1938). Recurrent mutation in the flaked alleles of Pharbitis purpurea. Journal of Genetics, 35: 433-446.
- JACOB, F. & MONOD, J. (1961). Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. Journal of Molecular Biology, 2: 318-356.
- JAIN, M.L. (1966). Biochemical definition of yellow virescent and light green suppressor mutation in barley. Genetics, 45: 813-818.
- KAFER, E. (1960). High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in Aspergillus nidulans. Nature, London, 186: 619-620.
- KAFER, E. (1961). The process of spontaneous recombination in vegetative nuclei of Aspergillus nidulans. Genetics, 46: 1581-1609.
- KAFER, E. (1965). Origin of translocations in Aspergillus nidulans. Genetics, 52: 217-232.

- KAFER, E. & UPSHALL, A. (1973). The phenotypes of the eight disomics and trisomics of Aspergillus nidulans. Journal of Heredity, 64: 35-38.
- LIEBER, M. (1973). Environmental and genetic factors affecting instability at mitosis in Aspergillus nidulans. Ph.D. Thesis, University of Sheffield, England.
- LINDEN, D.B. (1963). Radiation induced modification of paramutation expression. Maize Genetics Cooperation News Letter, 37: 133.
- LINDEN, D.B. (1964). Heritability of radiation induced alterations of paramutation. Maize Genetics Cooperation News Letter, 38, 119-120.
- MALLING, H.V. & SERRES, F.J. (1968). Identification of genetic alterations induced by ethyl methanesulfonate in Neurospora crassa. Mutation Research, 6: 181-193.
- MAMPELL, K. (1945). Analysis of a mutator. Genetics, 30: 496-505.
- MAMPELL, K. (1946). Genic and non-genic transmission of mutator activity. Genetics, 31: 589-597.
- McCLINTOCK, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A., 36: 344-355.
- McCLINTOCK, B. (1951). Chromosome organization and genetic expression. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 16: 13-47.
- McCLINTOCK, B. (1956). Controlling elements and the gene. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 21: 197-216.
- McCLINTOCK, B. (1965). The control of gene action in maize. Brookhaven Symposia on Biology, 18: 162-182.

- MCCULLY, K.S. & FERBES, E. (1965). The use of p-fluorophenyl alanine with master strains of Aspergillus nidulans for assigning genes to linkage groups. Genetical Research, Cambridge, 6: 352-359.
- MORPURGO, G. (1961). Somatic segregation induced by p-fluorophenyl alanine. Aspergillus News Letter, 2: 10.
- MUKAI, T. (1970). Viability mutations induced by ethyl methane sulfonate in Drosophila melanogaster. Genetics, 65: 335-348.
- NASIM, A. & AUERBACK, C. (1967). The induction of replicating instabilities by mutagens in Schizosaccharomyces pombe. Mutation Research, 4: 1-14.
- NEWCOMBE, H.B. (1953). Radiation induced instabilities in Streptomyces. Journal of General Microbiology, 9: 30-36.
- NEWMAYER, D. (1965). Somatic instability in Neurospora resulting from a pericentric inversion. Genetics, 52: 462-463.
- NEWMAYER, D. & TAYLOR, C.W. (1967). A pericentric inversion in Neurospora with unstable duplication progeny. Genetics, 56: 771-791.
- NGA, B.H. (1968). Production and analysis of new translocations in Aspergillus nidulans. Aspergillus News Letter, 9: 16-17.
- NGA, B.H. & ROPER, J.A. (1968). Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in Aspergillus nidulans. Genetics, 58: 193-209.
- NGA, B.H. & ROPER, J.A. (1969). A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in Aspergillus nidulans. Genetical Research, Cambridge, 14: 63-70.
- PARTINGTON, M. & JACKSON, H. (1968). The induction of dominant lethal mutations in rats by alkane sulphonic esters. Genetical Research, Cambridge, 4: 333-345.
- PETERSON, P.A. (1961). Mutable a₁ of the En system in maize. Genetics, 46: 759-771.

- PETERSON, P.A. (1970). Controlling elements and mutable loci in maize: their relationship to bacterial episomes. Genetics, 41: 33-56.
- PONTECORVO, V., TARR-GLOOR, E. & FORBES, E. (1954). Analysis of mitotic recombination in Aspergillus nidulans. Journal of Genetics, 52: 226-237.
- PONTECORVO, F., ROPER, J.A., HEMMONS, L.M., McDONALD, R.D. & BUFTON, A.W.J. (1953). The genetics of Aspergillus nidulans. Advances in Genetics, 5: 141-238.
- RHOADES, M.M. (1941). The Genetic Control of Mutability in Maize. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 9: 138-144.
- RHOADES, M.M. & DEMPSEY, E. (1973). Chromatin elimination induced by the B chromosome of maize. Journal of Heredity, 64: 13-18.
- RIZSHI, T.M., SOLIMAN, A., RIZSKI, R.M., FRIEDMAN, T.B. & HEALY, S. K. (1970). Ultra structural effects of a suppressor mutation in Drosophila. Genetics, 64: 459-469.
- ROBINOW, C.F. & CATTEN, C.E. (1969). Mitosis in Aspergillus nidulans. Journal of Cell Science, 5: 403-431.
- ROPER, J.A. (1952). Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experientia, 8: 14-15.
- ROPER, J.A. & NGA, B.H. (1969). Mitotic non-conformity in Aspergillus nidulans: the production of hypodiploid and haploid nuclei. Genetical Research, Cambridge, 14: 127-136.
- SCHULTZ, J. (1936). Variegation in Drosophila and the inert chromosomes regions. Genetics, 22: 27-33.
- SERRES, F.J., BROCKMAN, H.E., BARNETT, W.E. & KOIMARK, H.G. (1971). Mutagens specificity in Neurospora crassa. Mutation Research, 12: 129-142.

- SHAPIRO, J.A. (1969). Mutations caused by the insertion of genetic material into the galactose operon of Escherichia coli. Journal of Molecular Biology, 40: 93-105.
- SHIMADA, K., WEISBERG, K. & GOTTESMAN, M. (1973). Escherichia coli mutants produced by the insertion of bacteriophage DNA. Genetics Supplement, 73: 81-83.
- SKAAR, P.D. (1956). A binary mutability system in Escherichia coli. Proceedings of National Academy of Science, U.S.A. 42: 245-249.
- SMITH-KEARY, D.F. (1958). An unstable mutation in Salmonella typhimurium. Nature, London, 181: 1672.
- STOUTHAMER, A.H., DE HAAN, P.G. & BULTEN, E.J. (1963). Kinetics of F-curing by acridine orange in relation to the number of F-particles in Escherichia coli. Genetical Research, Cambridge, 4: 305-317.
- TAYLOR, A.L. (1963). Bacteriophage induced mutation in Escherichia coli. Proceedings of National Academy of Science, U.S.A., 50: 1043-1051.
- TREFFERS, H.P., SPINELLI, V. & BELSER, N.O. (1954). A factor or mutator gene influencing mutation rates in Escherichia coli. Proceedings of National Academy of Science, U.S.A., 40: 1064-1071.
- UPSHALL, A. (1971). Phenotypic specificity of aneuploids states in Aspergillus nidulans. Genetical Research, Cambridge, 18: 167-171.
- von BORSTEL, R.C., QUAH, S.K., STEINBERG, C.M., FLURY, F. & GOTTLIEB, D.J.C. (1973). Mutants of yeast with enhanced spontaneous mutation rates. Genetics Supplement, 73:141-151.